

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 900**

51 Int. Cl.:

**C07J 5/00** (2006.01)

**C07J 63/00** (2006.01)

**A61P 31/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2011 E 11306138 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 2567965**

54 Título: **Derivados del ácido 3-O-(3',3'-dimetilsuccinil)-betulínico**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.12.2015**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)  
3, rue Michel-Ange  
75016 Paris, FR y  
UNIVERSITE PARIS DESCARTES (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BOUAZIZ, SERGE;  
CORIC, PASCALE;  
BOULANGER, PIERRE;  
HONG, SAW-SEE;  
TURCAUD, SERGE;  
SOUQUET, FLORENCE;  
CHAZAL, NATHALIE y  
BRIANT, LAURENCE**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 553 900 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Derivados del ácido 3-O-(3',3'-dimetilsuccinil)-betulínico.

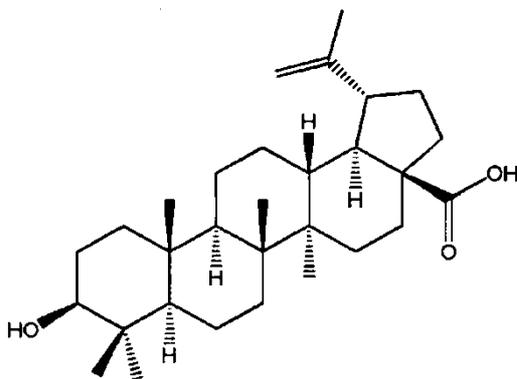
5 La presente invención se refiere a derivados del ácido 3-O-(3',3'-dimetilsuccinil)-betulínico, a un procedimiento para su preparación, y a su utilización en el tratamiento de una infección con un retrovirus tal como VIH.

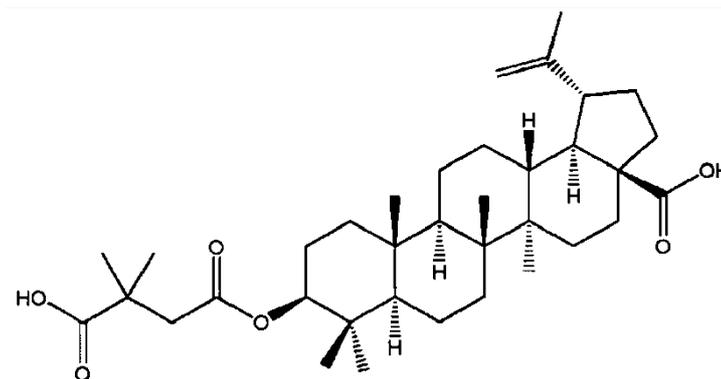
10 La mayoría de los inhibidores farmacéuticos anti-VIH-1 se centran en las actividades enzimáticas catalizadas por la transcriptasa inversa (RT), la integrasa (IN) o la proteasa (PR), y han provocado la aparición de cepas del VIH-1 multirresistentes. De este modo, la comunidad científica se ha visto implicada en el descubrimiento de nuevas dianas para combatir el SIDA, y en el desarrollo de nuevas moléculas dirigidas contra estas dianas. El ensamblaje del precursor Gag de VIH-1 (Pr55Gag) y las etapas de maduración de la replicación del virus representan dianas atractivas para el diseño de nuevas moléculas que puedan inhibir la replicación retroviral.

15 La poliproteína Gag es necesaria y suficiente para el ensamblaje de pseudopartículas similares a virus (VLP). Durante o subsiguientemente al ensamblaje de toda la partícula del VIH-1, Gag se escinde mediante la PR en cuatro proteínas maduras: matriz (MA), cápside (CA), nucleocápside (NC) y p6. Se liberan dos péptidos espaciadores extra, SP1 y SP2, que separan CA/NC y NC/p6 respectivamente. Este proceso de maduración está regulado en el tiempo: la primera escisión se produce entre SP1 y NCp7, que conduce al producto intermedio MA-CA-SP1, que entonces se escinde en MA y CA-SP1 precursora (p25). La escisión de p25 se produce tarde en el ciclo de vida del virus, y genera la CA madura (p24) y el péptido SP1. Esta es una etapa crucial para la formación apropiada de partículas víricas maduras e infecciosas.

25 Recientemente, se ha demostrado que la inhibición en el sitio de escisión de CA-SP1 provoca la producción de partículas víricas defectuosas y no infecciosas. Además, la región que rodea al dominio de CA-SP1 desempeña un papel importante en la morfogénesis del virión. Se han llevado a cabo en diferentes aislados del VIH-1 y otros lentivirus de primates mutaciones de restos en la unión de CA-SP1 o en el péptido SP1, que muestran un grado elevado de conservación en sus cuatro restos N-terminales. Se ha sugerido que estas mutaciones bloquean la etapa de procesamiento y dan como resultado la producción de viriones con núcleos aberrantes. El péptido SP1 desempeña un papel crucial en el ensamblaje y en las etapas de maduración de la replicación del VIH-1, puesto que se ha mostrado que la incorporación del dominio SP1 en el término C de CA permite a Gag multimerizarse.

35 La acumulación de partículas víricas inmaduras y no infecciosas debido a precursores poliproteínicos no procesados o parcialmente procesados se puede provocar mediante una nueva clase de antivirales derivados del ácido betulínico. Un miembro importante de esta familia de fármacos antivirales es el ácido 3-O-(3',3'-dimetilsuccinil)-betulínico, abreviado DSB, conocido como YK-FH312 o PA-457, y usado en la clínica como Bevirimat™. Se sintetiza a partir de ácido betulínico (BA), que se extrae de las hojas de *Syzgium claviformum*. En el intervalo nanomolar, DSB interfiere con la escisión proteolítica mediada por PR del sustrato poliproteico Pr55Gag en la unión de los dominios de cápside (CA) y nucleocápside (NC), dando como resultado partículas con un mayor contenido de CAp25 (CAp25 = CAp24 + SP1) y menor infecciosidad. En el intervalo micromolar y en un sistema heterólogo, DSB tiene un efecto negativo sobre el ensamblaje y salida de partículas semejantes a virus (VLP) formadas de Pr55Gag.





ácido betulínico

ácido 3-O-(3',3'-dimetilsuccinil)-betulínico (DSB)

5 El DSB, el inhibidor de la maduración del VIH primero de la clase, muestra sin embargo una baja eficacia debido al polimorfismo natural de su diana, la unión de CA-SP1 en la poliproteína Gag, y debido a la baja biodisponibilidad. El documento US 2004/0204389 describe una serie de compuestos derivados de DSB. En particular, se describen compuestos derivados de DSB con diversas cadenas en la posición C28.

10 En el contexto de la presente invención se ha descubierto que es posible obtener agentes anti-VIH con mayor solubilidad y eficacia en la inhibición de la maduración, así como en la inhibición del ensamblaje, mediante la sustitución de la posición C-28 de DSB con cadenas particulares.

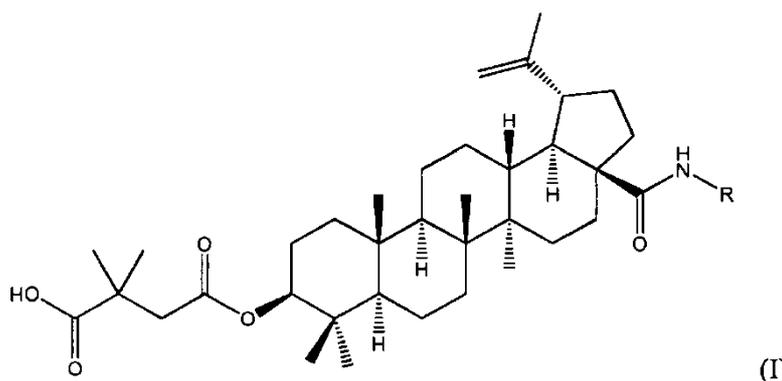
15 Estos derivados triterpénicos se evaluaron para determinar su capacidad para inhibir la replicación del VIH-1 bloqueando la escisión mediada por proteasa (PR) en la unión de CA-SP1.

También se evaluó la producción de virus a partir de células 293T transfectadas con el tipo salvaje del VIH-1 en presencia de estos compuestos, y se reveló su función como inhibidor de la modulación.

20 Paralelamente, se aplicó una cuantificación a base de luciferasa de la producción de VLP mediante células de insecto a estos nuevos derivados, y mostraron su inhibición del ensamblaje vírico.

25 Los resultados muestran que en el intervalo nanomolar los nuevos compuestos, y en particular el compuesto 16, son inhibidores de la maduración, y que a mayores dosis (micromolar), inhiben el ensamblaje de las partículas. Esta propiedad dual es nueva y esencial, en estrecha relación con la naturaleza de los sustituyentes en la posición C28.

La presente invención se refiere así a compuestos de la siguiente fórmula (I):



30 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, un estereoisómero o una mezcla de estereoisómeros en cualquier proporción, en particular una mezcla de enantiómeros, y particularmente una mezcla racémica,

35 en los que R es como se cita en la reivindicación 1.

En el contexto de la presente invención, la expresión "farmacéuticamente aceptable" pretende significar lo que es útil para la preparación de una composición farmacéutica, y lo que es generalmente seguro y no tóxico para un uso farmacéutico.

40 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" pretende significar, en el contexto de la presente invención, una sal

de un compuesto que es farmacéuticamente aceptable, como se define anteriormente, y que posee la actividad farmacológica del compuesto correspondiente. Tales sales comprenden:

(1) hidratos y solvatos,

(2) sales de adición de ácidos formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico y fosfórico, y similares; o formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, bencenosulfónico, fumárico, glucoheptónico, glucónico, glutámico, glicólico, hidroxinaftoico, 2-hidroxi-etanosulfónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, mucónico, 2-naftalenosulfónico, propiónico, succínico, dibenzoil-L-tartárico, tartárico, p-toluenosulfónico, trimetilacético y trifluoroacético, y similares, y

(3) sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto se sustituye por un ion metálico, tal como un ion de metal alcalino, un ion de metal alcalino-térreo, o un ion de aluminio; o se coordina con una base orgánica o inorgánica. Las bases orgánicas aceptables comprenden dietanolamina, etanolamina, N-metilglucamina, trietanolamina, trometamina, y similares. Bases inorgánicas aceptables comprenden hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio de hidróxido de sodio.

En el contexto de la presente invención, "estereoisómeros" pretende designar diastereoisómeros y enantiómeros. Por lo tanto, son isómeros ópticos. Los estereoisómeros que no son imágenes especulares entre sí se denominan así "diastereoisómeros", y los estereoisómeros que son imágenes especulares no superponibles se denominan "enantiómeros".

Un átomo de carbono enlazado a cuatro sustituyentes no idénticos se denomina un "centro quiral".

Una mezcla equimolar de dos enantiómeros se denomina mezcla racémica.

El término "alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)", como se usa en la presente invención, se refiere a una cadena hidrocarbonada saturada lineal o ramificada que contiene de 1 a 10 átomos de carbono.

El término "alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)", como se usa en la presente invención, se refiere a una cadena hidrocarbonada saturada lineal o ramificada que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, incluyendo, pero sin limitarse a, metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, t-butilo, n-pentilo, n-hexilo, y similar.

R representa un grupo  $-(CHR^2)-(CHR^3)_n-X$ , en el que:

- n representa 1,

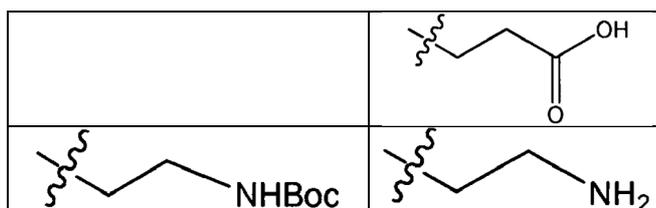
X representa un grupo COOH o NHR<sup>1</sup>, representando R<sup>1</sup> un átomo de hidrógeno o un grupo -Alk, -C(O)-Alk o -C(O)O-Alk, representando Alk un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), y

- R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> representan, independientemente entre sí, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), preferiblemente un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), opcionalmente sustituido con un grupo COOH o NHR<sup>1</sup>.

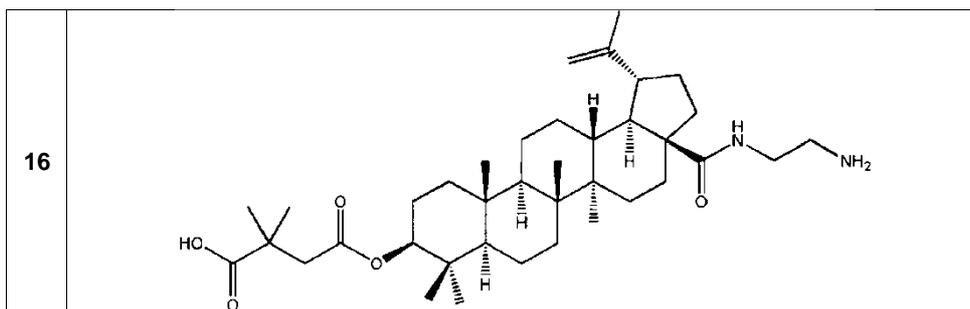
Preferentemente, al menos R<sup>2</sup> o R<sup>3</sup> representa un átomo de hidrógeno.

En la definición de R anterior, R<sup>1</sup> puede representar ventajosamente un átomo de hidrógeno o un grupo -C(O)O-Alk, en particular R<sup>1</sup> puede representar H o un grupo Boc (*tert*-butiloxicarbonilo).

En particular, R se selecciona de los siguientes grupos:



El compuesto de fórmula (I) se selecciona preferentemente del siguiente compuesto



La presente invención se refiere también a los compuestos mencionados anteriormente de fórmula (I) como un medicamento.

5 Estos compuestos pueden ser útiles para el tratamiento de una infección con un retrovirus tal como VIH, y en particular VIH-1.

La invención también se refiere a la utilización de un compuesto de fórmula (I) para la preparación de un medicamento destinado a ser usado en el tratamiento de una infección con un retrovirus tal como VIH, y en particular VIH-1.

La invención también se refiere a un procedimiento para tratar una infección con un retrovirus tal como VIH, y en particular VIH-1, que comprende administrar a una persona que lo necesite una cantidad eficiente de al menos un compuesto de fórmula (I).

15 La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar destinadas a la administración oral, sublingual, subcutánea, intramuscular, intravenosa, transdérmica, local o rectal. El principio activo se puede administrar en formas unitarias para administración, mezclado con vehículos farmacéuticos convencionales, a animales o a seres humanos. Las formas unitarias adecuadas para administración comprenden las formas para administración oral, tales como comprimidos, cápsulas de gelatina, polvos, gránulos y disoluciones o suspensiones orales, las formas para administración sublingual y bucal, las formas para administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intranasal o intraocular, y en las formas para administración rectal.

Cuando una composición sólida se prepara en forma de comprimidos, el principio activo principal se mezcla con un vehículo farmacéutico tal como gelatina, almidón, lactosa, estearato de magnesio, talco, goma arábiga y similar. Los comprimidos se pueden revestir con sacarosa o con otros materiales adecuados, o se pueden tratar de tal manera que pueden tener una actividad prolongada o retrasada y liberan continuamente una cantidad predeterminada de principio activo.

Una preparación en cápsulas de gelatina se obtiene mezclando el principio activo con un diluyente y vertiendo la mezcla obtenida en cápsulas de gelatina blandas o duras.

Una preparación en forma de un jarabe o un elixir puede contener el principio activo junto con un edulcorante, un antiséptico, o también un potenciador del sabor o un agente colorante adecuado.

Los polvos o gránulos dispersables en agua pueden contener el principio activo mezclado con agentes dispersantes o agentes humectantes, o agentes de suspensión, y con correctores del sabor o edulcorantes.

Para administración rectal, se usan supositorios que se preparan con aglutinantes que funden a la temperatura rectal, por ejemplo manteca de cacao o polietilenglicoles.

45 Para administración parenteral, intranasal o intraocular, se usan suspensiones acuosas, disoluciones salinas isotónicas o disoluciones estériles e inyectables que contienen agentes dispersantes y/o agentes humectantes farmacológicamente compatibles.

El principio activo también se puede formular en forma de microcápsulas, opcionalmente con uno o más aditivos portadores.

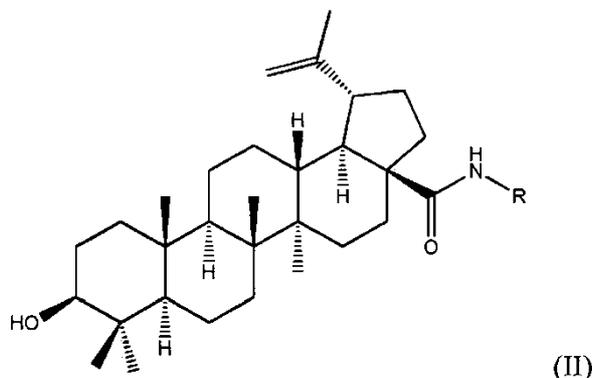
Los compuestos de la invención se pueden usar en una composición farmacéutica a una dosis que oscila de 0,01 mg a 1000 mg por día, administrada en una sola dosis una vez al día o en varias dosis a lo largo del día, por ejemplo dos veces al día. La dosis administrada diariamente comprende ventajosamente entre 5 mg y 500 mg, y más ventajosamente entre 10 mg y 200 mg. Sin embargo, puede ser necesario usar dosis fuera de estos intervalos, que

resultan evidentes para el experto en la materia.

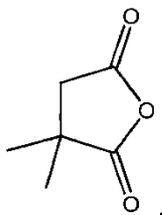
La presente invención también se refiere a un procedimiento como se cita en la reivindicación 7 para preparar un compuesto de fórmula (I) según la presente invención, que comprende las siguientes etapas sucesivas:

5

(i) hacer reaccionar un compuesto de la siguiente fórmula (II):



10 con anhídrido 2,2-dimetilsuccínico de la siguiente fórmula:



y

15 (ii) opcionalmente, cuando R comprende un grupo  $\text{NHR}^1$ , desproteger este grupo  $\text{NHR}^1$  para producir un grupo  $\text{NH}_2$ .

Etapas (i):

20 R representa un grupo  $-(\text{CHR}^2)-(\text{CHR}^3)_n-\text{X}$ , en el que:

- n representa 1,

25 X representa un grupo  $\text{COOH}$  o  $\text{NHR}^1$ , representando  $\text{R}^1$  un grupo  $-\text{Alk}$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{Alk}$  o  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{Alk}$ , representando Alk un grupo alquilo ( $\text{C}_1-\text{C}_6$ ), y

-  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  representan, independientemente entre sí, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo ( $\text{C}_1-\text{C}_8$ ), preferiblemente un grupo alquilo ( $\text{C}_1-\text{C}_4$ ), opcionalmente sustituido con un grupo  $\text{COOH}$  o  $\text{NHR}^1$ .

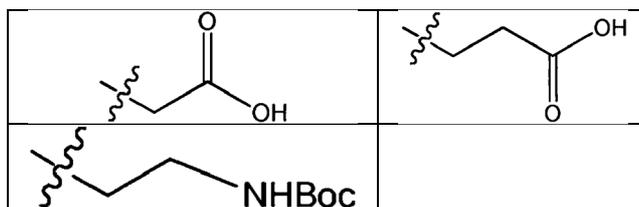
30

Preferentemente, al menos  $\text{R}^2$  o  $\text{R}^3$  representa un átomo de hidrógeno.

En la definición de R anterior,  $\text{R}^1$  puede representar ventajosamente un grupo  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{Alk}$ , tal como un grupo Boc (*tert*-butiloxicarbonilo).

35

En particular, R se selecciona de los siguientes grupos:



La reacción de la etapa (i) se puede llevar a cabo en presencia de DMAP (N,N-dimetilaminopiridina) en piridina,

principalmente a reflujo.

La reacción conduce a una mezcla de derivados de ácido 3-O-(2',2'-dimetilsuccinil)- y 3-O-(3',3'-dimetilsuccinil)-betulínico. Los productos de esta mezcla se pueden separar mediante cromatografía ultrarrápida para producir el compuesto deseado de fórmula (I) (un derivado de ácido 3-O-(3',3'-dimetilsuccinil)-betulínico.

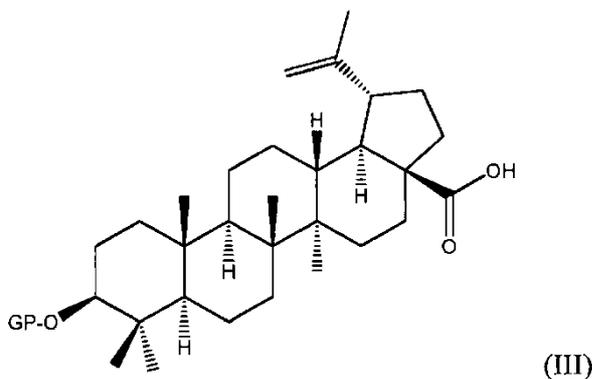
Etapa (ii):

Esta etapa de desprotección, si es necesaria, es bien conocida por un experto en la materia.

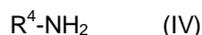
Preferentemente, el grupo  $R^1$  será en este caso un grupo  $-C(O)O-Alk$ , tal como un grupo Boc. La etapa de desprotección del grupo Boc se puede llevar a cabo haciendo reaccionar en primer lugar el compuesto con trifluorometanosulfonato de *tert*-butildimetilsililo en presencia de 2,6-lutidina para dar un carbamato de *tert*-butildimetilsililo, es decir, el grupo  $-NH-C(O)-SiMe_2tBu$ . Después, la eliminación del grupo *N-tert*-butildimetilsililoxicarbonilo se puede lograr mediante tratamiento con iones fluoruro, que se pueden proporcionar mediante  $n-Bu_4NF$ , en un disolvente tal como THF. Otra posibilidad es escindir el enlace de *N*-Boc en presencia de HCl en un disolvente tal como THF.

El compuesto de fórmula (II) se puede preparar como se cita en la reivindicación 8 mediante las siguientes etapas sucesivas:

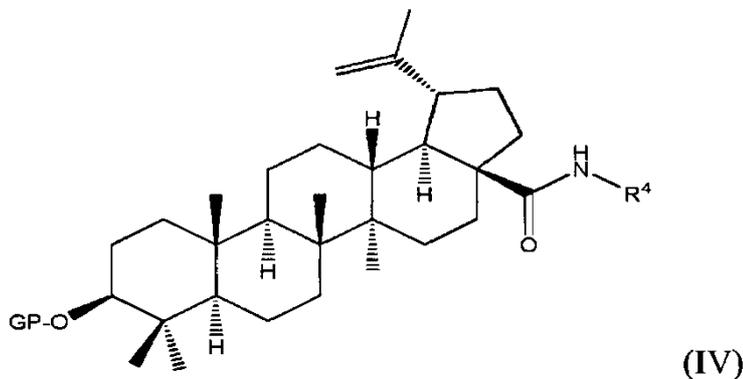
(a) acoplar un compuesto de fórmula (III)



en la que GP representa un grupo O-protector, tal como un grupo acetilo, con una amina de la siguiente fórmula (IV):



para producir un compuesto de la siguiente fórmula (IV):



en la que  $R^4$  y GP son como se definen anteriormente, y

(b) desproteger el grupo hidroxilo y, cuando sea apropiado, el grupo  $-COO-Alk^1$  y/o  $NHR^1$  del compuesto de fórmula (IV) obtenido en la etapa (a) previa para producir un compuesto de fórmula (II).

Etapa (a):

R<sup>4</sup> representa un grupo  $-(CHR^2)-(CHR^3)_n-X$ , en el que:

- n representa 1,

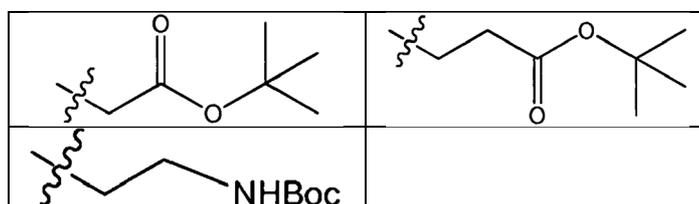
X representa un grupo COO-Alk<sup>1</sup> o NHR<sup>1</sup>, representando R<sup>1</sup> un grupo -Alk, -C(O)-Alk o -C(O)O-Alk, representando Alk y Alk<sup>1</sup>, independientemente entre sí, un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), y

- R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> representan, independientemente entre sí, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), preferentemente un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), opcionalmente sustituido con un grupo COO-Alk<sup>1</sup> o NHR<sup>1</sup>.

Preferentemente, al menos R<sup>2</sup> o R<sup>3</sup> representa un átomo de hidrógeno.

En la definición de R<sup>4</sup> anterior, R<sup>1</sup> puede representar ventajosamente un grupo -C(O)O-Alk<sup>1</sup>, tal como un grupo Boc (*tert*-butiloxycarbonilo). Alk<sup>1</sup> puede representar ventajosamente un grupo *tert*-butilo.

En particular, R<sup>4</sup> se selecciona de los siguientes grupos:



La expresión "grupo O-protector", como se usa en la presente invención, se refiere a un sustituyente que protege a los grupos hidroxilo frente a reacciones indeseables durante procedimientos de síntesis, tales como aquellos grupos O-protectores descritos en Greene, "Protective Groups In Organic Synthesis", (John Wiley & Sons, Nueva York (1981)). Los grupos O-protectores comprenden grupos alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), tales como metilo, etilo, *tert*-butilo; ésteres de metilo sustituidos, por ejemplo metoximetilo (MOM), benciloximetilo, 2-metoxietoximetilo, 2-(trimetilsilil)etoximetilo, bencilo y trifenilmetilo; éteres tetrahidropiraniolo; éteres de etilo sustituidos, por ejemplo, 2,2,2-tricloroetilo; éteres de sililo, por ejemplo, trimetilsililo, t-butildimetilsililo (TBS) y t-butildifenilsililo; y ésteres preparados haciendo reaccionar el grupo hidroxilo con un ácido carboxílico, por ejemplo acetilo, propionilo, benzoilo y similar. En particular será un grupo acetilo.

El acoplamiento se puede llevar a cabo mediante acoplamiento peptídico bien conocido por el experto en la materia.

El acoplamiento peptídico se llevará a cabo ventajosamente en presencia de un agente de acoplamiento, tal como diisopropilcarbodiimida (DIC), diciohexilcarbodiimida (DCC), hidrocioruro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC), carbonildiimidazol (CDI), hexafluorofosfato de 2-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TBTU), hexafluorofosfato de O-(7-azobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU) o hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolodionofosfonio (PiBOP); opcionalmente asociado con un acoplamiento auxiliar, tal como N-hidroxi-succinimida (NHS), N-hidroxi-benzotriazol (HOBt), 3,4-dihidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazol (HOObt), 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HAt) o N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo NHS).

Ventajosamente, el acoplamiento peptídico se llevará a cabo en presencia de PyBOP y una base tal como diisopropiletilamina (DIEA).

El compuesto de fórmula (III) se puede preparar además a partir de ácido betulínico mediante una etapa de protección del grupo hidroxilo.

Preferiblemente, el grupo O-protector será un grupo acetilo. Este grupo se puede introducir en el ácido betulínico mediante reacción con anhídrido acético en piridina.

#### 50 Etapas (b):

La etapa de desprotección del grupo O-protector se puede llevar a cabo mediante procedimientos bien conocidos por el experto en la materia.

55 En el caso en el que GP represente un grupo acetilo, la etapa de desprotección se puede llevar a cabo mediante saponificación, principalmente en presencia de hidróxido sódico, principalmente en un disolvente tal como una mezcla de tetrahidrofurano y metanol.

En estas condiciones de reacción, el grupo -COO-Alk<sup>1</sup> también se desprotege para conducir al grupo -COOH

deseado.

La invención se pondrá más claramente de manifiesto a partir de los siguientes ejemplos y figuras, proporcionándose dichos ejemplos únicamente a título ilustrativo de la invención.

## Figuras

Figura 1: Efecto del compuesto sobre la producción de partículas víricas y procesamiento de Gag en lisado viriónico. Se observa acumulación de p25 en presencia de 1, 2, 12, 16 y 15.

Figura 2: Análisis mediante EM de sección delgada de viriones producidos a partir de células tratadas con BA (1), DSB (2), 12, 16, 15. Se transfectaron células 293T con pNL4-3 y no se trataron (A) o se trataron (B, C, D, E, F) con BA (1), DSB (2), 12, 16 y 15. Dos días después de la transfección, las células se fijaron y se analizaron mediante EM de sección delgada. La flecha discontinua en A indica núcleos cónicos maduros; las flechas en B, C, D, E y F indican la capa densa en electrones, con forma de media luna, dentro de la membrana viral que resulta de la inhibición del procesamiento de p25. (Barra:  $\approx 100$  nm).

Figura 3: Dependencia del empaquetamiento de LucVpr respecto del dominio p6 de Gag. Análisis mediante ultracentrifugación isopícnica en gradiente de densidad de sacarosa-D<sub>2</sub>O de VLP extracelulares aisladas de medio de cultivo de células Sf9. (a), Transferencia Western de las fracciones de gradientes analizadas mediante SDS-PAGE. La transferencia se hizo reaccionar con anticuerpo policlonal anti-Gag y con anticuerpo IgG anticonejo marcado con fosfatasa. Línea m, marcadores de masa molecular previamente teñidos (PageRuler™; Fermentas Inc.). La posición de VLP (fracciones 10-13; 1,12-1,15 en densidad) se indica en la parte superior del panel. (b), La actividad de luciferasa se ensayó en cada fracción de gradiente, y se expresó como unidades de luz relativas (RLU). Símbolo en blanco, células Sf9 que expresan LucVpr sola; símbolos en negro, células Sf9 que coexpresan LucVpr y Pr55Gag de longitud completa o Gag sin p6 (Gag $\Delta$ p6). Cada fracción de gradiente se evaluó para determinar la actividad de luciferasa. Los valores de la densidad se indican en la escala de la derecha.

Figura 4: Cuantificación del ensamblaje y salida de VLP usando ensayo de luciferasa. Células que coexpresan Pr55Gag y LucVpr no se trataron (control 0) o se trataron con DSB en DMSO durante 24 h a 24 h pi, a concentraciones crecientes como se indica. VLP se aislaron del medio de cultivo a 48 h pi mediante ultracentrifugación isopícnica en gradiente de densidad de sacarosa-D<sub>2</sub>O, y se evaluaron para determinar la actividad de luciferasa, expresada como unidades de luz relativas (RLU).

Figura 5: Evaluación de la actividad inhibidora de BA, PA-457, 12, 15 y 16 sobre el ensamblaje de VLP, usando un ensayo a base de empaquetamiento de Vpr con luciferasa.

Alícuotas de células Sf9 coinfectadas con AcMNPV-Pr55Gag y AcMNPV-LucVpr a MOI iguales se trataron a 24 h pi con dosis crecientes de cada inhibidor durante 24 h. Las células y el medio de cultivo se cosecharon a 48 h pi, y las VLP se aislaron del medio de cultivo. Los sedimentos celulares y las VLP se procesaron entonces para el ensayo de luciferasa, y los valores de la relación de la actividad de luciferasa asociada a VLP incorporadas a las células, en porcentaje del control (inhibidor 0), se representaron gráficamente frente a las concentraciones de DSB. En las muestras de control, la fracción de luciferasa incorporada por las VLP fue habitualmente 5 a 7% de la actividad total recuperada. Por ejemplo, en el experimento ilustrado aquí, la actividad recuperada fue  $35,5 \times 10^6$  RLU en sedimentos celulares, frente a  $2,5 \times 10^6$  en VLP extracelulares. Obsérvese que la curva de inhibición de 17, que se asemejó a la de 12, no se representó por razones de claridad.

## Ejemplos

### I. Síntesis de los compuestos

Los productos se caracterizaron mediante espectroscopía de masas de alta resolución (HRMS) y mediante RMN (resonancia magnética nuclear). Se usó la convención de IUPAC para numerar los átomos de carbono. La asignación completa de las resonancias de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se logró mediante experimentos de RMN 1D y 2D, correlación heteronuclear de un solo cuanto (<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC), correlación heteronuclear a múltiples enlaces (<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HMBC), espectroscopía de correlación <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (COSY) y espectroscopía de correlación total (TOCSY).

Los espectros de RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, DEPT135, DQF-COSY, TOCSY, HSQC y HMBC se registraron con un espectrómetro de RMN Bruker AVANCE 400 a 400,13 MHz (SF) para <sup>1</sup>H y 100,623 MHz (SF) para <sup>13</sup>C con sonda inversa de 5 mm a temperatura ambiente. Los diferentes compuestos estaban en disoluciones 10 mM en 0,5 ml de C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N en tubos de RMN de 5 mm. Todos los desplazamientos químicos estaban en ppm ( $\delta$ ). Los espectros de RMN <sup>1</sup>H se realizaron con una anchura espectral (SW) de 4084,97 Hz, y los espectros de RMN <sup>13</sup>C con SW de 22522,52 Hz con desacoplamiento de <sup>1</sup>H con secuencia de pulso WALTZ; el tipo de carbono (es decir, C, CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>) se determinó usando experimentos de DEPT135. Todos los experimentos bidimensionales se realizaron usando secuencias de pulso estándar con el programa de software de Bruker XWIN-NMR vs 3.0. Los espectros de DQF-COSY y TOCSY se registraron con 2048 puntos en la dimensión F2 y 512 incrementos en la dimensión F1. Cada

incremento se obtuvo con 40 barridos y se usó una anchura espectral de 4084,97 Hz, un retraso de reciclaje de 2 s y un tiempo de mezclamiento de 80 ms para los experimentos de TOCSY. Los espectros de HSQC se obtuvieron con la constante de acoplamiento de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  de un enlace ajustada a 145 Hz, un desacoplamiento de  $^{13}\text{C}$  GARP WALTZ, 2048 puntos en la dimensión F2 y 256 incrementos en la dimensión F1, con un retraso de relajamiento de 2 s. La anchura espectral se ajustó a 10964,91 Hz en la dimensión F2 y 4084,97 Hz en la dimensión F1. Los experimentos de HMBC se realizaron con 40 barridos para cada 256 incrementos de F1, 2048 puntos de datos en F2. Se ha usado una anchura espectral de 4084,97 Hz y 22522,52 Hz en las dimensiones de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  respectivamente.

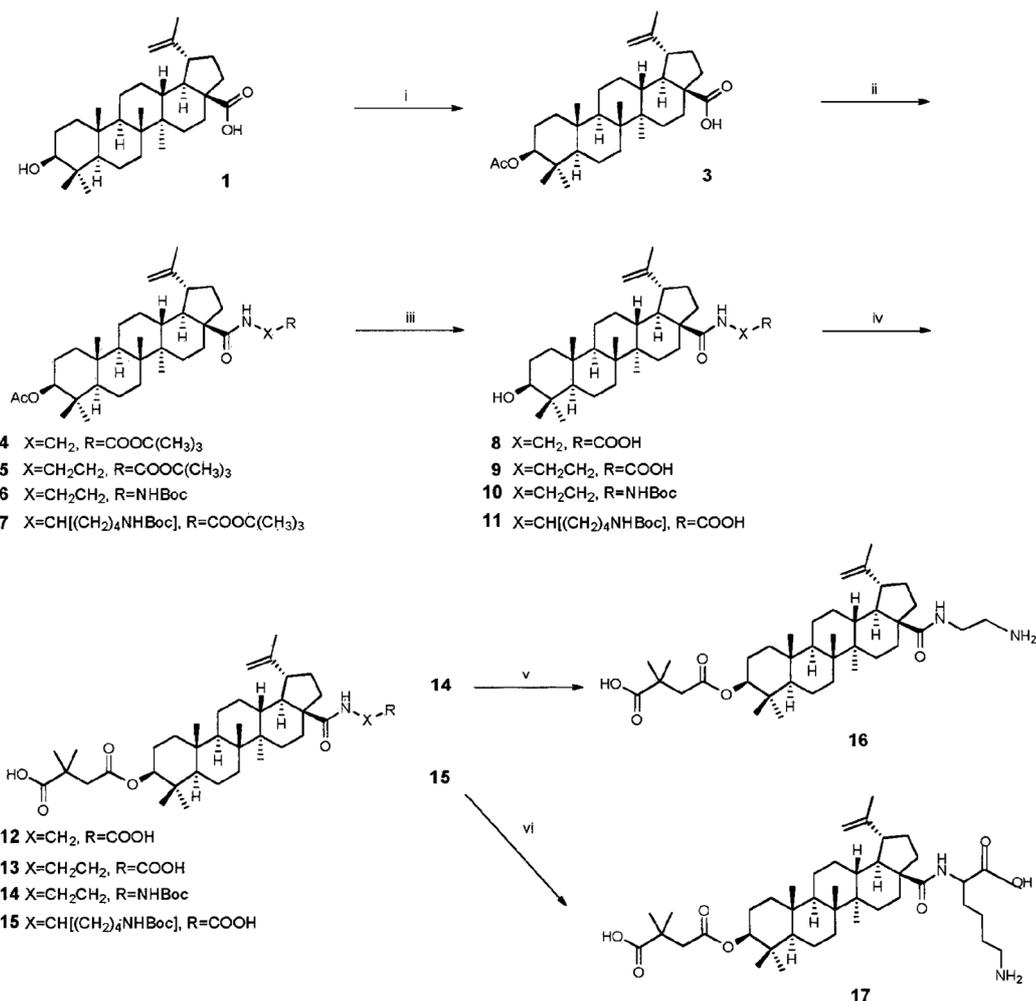
El Ácido betulínico, anhídrido acético, PyBOP, DIEA, DMAP, anhídrido 2,2-dimetilsuccínico, 2,6-lutidina, trifluorometanosulfonato de *tert*-butildimetilsililo se adquirieron de Aldrich. Todos los aminoácidos, procedentes de Bachem, estaban protegidos O-*t*Bu, y la cadena lateral de Lys se protegió como N-Boc.

En la parte experimental se han usado las siguientes abreviaturas:

Ac<sub>2</sub>O: anhídrido acético; *t*-BuMe<sub>2</sub>SiOTf: trifluorometanosulfonato de *tert*-butildimetilsililo; *n*Bu<sub>4</sub>NF: fluoruro de tetrabutilamonio; DEPT135: aumento sin distorsión por transferencia de polarización; DIEA: N,N-diisopropiletilamina; DMAP: 4-(dimetilamino)piridina; DMF: dimetilformamida; DMSO: dimetilsulfóxido; DQF-COSY: espectroscopía de correlación con filtro de doble cuanto; HMBC: correlación heteronuclear a múltiples enlaces; HSQC: correlación heteronuclear de un solo cuanto; MeOH: metanol; PyBOP: hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio; THF: tetrahidrofurano; TOCSY: espectroscopía de correlación total.

Los compuestos se han sintetizado según el siguiente esquema de reacción:

Esquema 1<sup>a</sup>



<sup>a</sup> Reactivos y condiciones: (i) Ac<sub>2</sub>O, piridina; (ii) PyBop, DIEA, NH<sub>2</sub>-X-R, rt, 72 h; (iii) NaOH 4M, THF/MeOH, rt, 12 h; (iv) anhídrido, DMAP, piridina, reflujo, 18 h; (v) 2,6-lutidina, *t*-BuMe<sub>2</sub>SiOTf, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30 mn, *n*-Bu<sub>4</sub>NF, THF, rt, 1 h; (vi)

HCl 6M, THF, rt, 1 h

I.a) Procedimiento general para sintetizar derivados (4-7).

5 A una mezcla de 3-O-Ac-BA (3) (200-300 mg, 0,4-0,6 mmoles) y DIEA (0,28-0,42 ml, 1,6-2,4 mmoles) en DMF (2-3 ml) se le añadieron sucesivamente PyBOP (0,31-0,47 g, 0,6-0,9 mmoles) y la amina NH<sub>2</sub>-X-R<sub>1</sub> apropiada (0,6-0,9 mmoles). La mezcla se agitó durante 72 h, y después se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml), se lavó con disolución acuosa de ácido cítrico (10%), con agua, con salmuera, y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. La capa orgánica se concentró a vacío, y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para proporcionar el producto intermedio deseado 4, 5, 6 o 7.

Éster *t*-butílico de *N*-(*O*<sup>3</sup>-acetil-betulinil)glicina (4): R<sub>f</sub>: 0,38 (tolueno/acetona 10/0,5); Rendimiento: 64% (158 mg); RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,75 (m, 1H, -CH en 5), 0,82 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 0,83 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 0,91 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 0,95 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1,09 (m, 2H), 1,10-1,45 (m, 11H), 1,47 (s, 12H, -CH<sub>3</sub>, *t*-Bu), 1,50-1,65 (m, 6H), 1,67 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1,75-2,0 (m, 3H), 2,03 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2,45 (dt, 1H, *J* = 3,5 Hz, *J* = 13 Hz), 3,10 (dt, 1H, *J* = 3,5 Hz, *J* = 11 Hz), 3,89 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 4,45 (t, 1H, *J* = 7,5 Hz), 4,58 (s, 1H, = CH), 4,73 (s, 1H, = CH), 6,10 (t, 1H, *J* = 5,2 Hz). RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14,6; 16,0; 16,2; 16,5; 18,2; 19,4; 20,9; 21,3; 23,7; 25,5; 27,9; 28,0; 29,4; 30,8; 33,6; 34,3; 36,5; 37,1; 37,6; 37,8; 38,3; 38,4; 40,7; 41,9; 42,5; 45,9; 46,7; 50,0; 50,5; 55,4; 55,7; 80,9; 82,0; 109,4; 150,9; 169,6; 171,0; 176,4.

Éster *t*-butílico de *N*-(*O*<sup>3</sup>-acetil-betulinil)-β-alanina (5): R<sub>f</sub>: 0,45 (tolueno/acetona 10/0,5); Rendimiento: 80% (300 mg); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N): δ 0,80 (m, 4H, -CH en 5, -CH<sub>3</sub> en 25), 0,87-0,9 (m, 7H, -CH<sub>3</sub> en 23 y 24, -CH en 1), 1,08 (1s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 27), 1,12 (1s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 26), 1,18 (m, 1H, -CH en 12), 1,19 (m, 1H, -CH en 11), 1,21 (m, 1H, -CH en 15), 1,33 (m, 1H, -CH en 9), 1,34 (m, 1H, -CH en 11), 1,35 (m, 1H, -CH en 6), 1,42 (m, 2H, -CH en 7), 1,45 (m, 1H, -CH en 6), 1,49 (s, 9H, -COOtBu), 1,5 (m, 1H, -CH en 21), 1,54 (m, 1H, -CH en 22), 1,6 (m, 2H, -CH en 1 y 16), 1,65 (m, 1H, -CH en 2), 1,7 (m, 1H, -CH en 2), 1,74 (m, 1H, -CH en 15), 1,77 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 30), 1,94 (m, 1H, -CH en 12), 2,08 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2,13 (m, 1H, -CH en 22), 2,21 (m, 1H, -CH en 21), 2,4 (m, 1H, -CH en 16), 2,77 (m, 1H, -CH en 2"), 2,85 (m, 1H, -CH en 2"), 3,08 (m, 1H, -CH en 13), 3,62 (m, 1H, -CH en 19), 3,7 (m, 1H, -CH en 1"), 3,85 (m, 1H, -CH en 1"), 4,7 (dd, 1H, -CH en 3, *J* = 4,5 MHz y 11,5 Hz), 4,78 (s, 1H, = CH), 4,94 (s, 1H, = CH), 8,35, 20 (C30); 21,6 (C2); 21,66 (C11); 24,5 (C2); 26,6 (C12); 28,5 (3C, *t*-Bu y C23); 30,3 (C15); 31,8 (C21); 34 (C16); 35,1 (C7); 36,3 (C2"); 36,5 (C1"); 37,7 (C10); 38 (C13); 38,5 (C4); 39 (C22 y C1); 41,6 (C8); 43,2 (C14); 47,65 (C19); 51,1 (C18); 51,3 (C9); 56,1 (C5); 56,3 (C17); 80,7 (C*t*-Bu); 81,2 (C3); 110,2 (C29); 152,1 (C20); 171,1 (C1"); 172,4 (C COOtBu); 177,4 (C28).

*N*-(*O*<sup>3</sup>-acetil-betulinil)-*N'*-Boc-etilendiamina (6): R<sub>f</sub>: 0,48 (tolueno/acetona 90/10); Rendimiento: 86% (330 mg); RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,77 (m, 1H), 0,83 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 0,84 (s, 6H, 2-CH<sub>3</sub>), 0,94 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 0,96 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1,09 (m, 1H), 1,10-1,41 (m, 8H), 1,47 (s, 9H, *t*-Bu), 1,49-1,65 (m, 8H), 1,68 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1,70-1,80 (m, 3H), 1,98 (m, 3H), 2,04 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2,45 (dt, 1H, *J* = 3,1 Hz, *J* = 12,5 Hz), 3,13 (dt, 1H, *J* = 4,4 Hz, *J* = 11 Hz), 3,27 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 3,34 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>), 4,46 (t, 1H, *J* = 7,0 Hz), 4,59 (s, 1H, = CH), 4,74 (s, 1H, = CH), 5,04 (m, 1H, -NH-CO-), 6,33 (m, 1H, -CO-NH).

Éster *t*-butílico de *N*<sup>2</sup>-(*O*<sup>3</sup>-acetil-betulinil)-*N*<sup>6</sup>-Boc-*L*-Lisina (7): R<sub>f</sub>: 0,28 (tolueno/acetona 95/5); Rendimiento: 73% (410 mg); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N): δ 0,80 (m, 4H, -CH en 5, -CH<sub>3</sub> en 25), 0,90 (m, 7H, -CH<sub>3</sub> en 23 y 24, -CH en 1), 1,09 (2s, 6H, -CH<sub>3</sub> en 27 y 26), 1,16 (m, 1H, -CH en 11), 1,17 (m, 1H, -CH en 12), 1,29 (m, 1H, -CH en 15), 1,32 (m, 1H, -CH en 11), 1,33 (m, 1H, -CH en 9), 1,42 (m, 3H, -CH en 6 y 7), 1,48 (s, 9H, -COOtBu y m, 1H, -CH en 6), 1,52 (m, 2H, -CH en 21 y 22), 1,55 (s, 9H, -NHBoc), 1,58 (m, 2H, -CH en 1 y 2), 1,69 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>, Lys), 1,70 (m, 3H, -CH en 18, -CH<sub>2</sub>δ Lys), 1,71 (m, 1H, -CH en 2), 1,78 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 30), 1,80 (m, 1H, -CH en 15), 1,86 (m, 1H, -CHβ Lys), 1,92 (m, 1H, -CH en 12), 2,07 (m, 1H, -CHβ Lys), 2,08 (s, 3H, -COCH<sub>3</sub>), 2,30 (m, 1H, -CH en 21), 2,33 (m, 1H, -CH en 22), 2,54 (m, 1H, -CH en 16), 3,03 (m, 1H, -CH en 13), 3,40 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>, Lys), 3,58 (m, 1H, -CH en 19), 4,7 (dd, 1H, -CH en 3, *J* = 5 Hz y 11,5 Hz), 4,75 (s, 1H, = CH), 4,91 (m, 2H, = CH y -CH<sub>α</sub> Lys), 7,55 (t, 1H, -NH-CO- *J* = 5 Hz), 8,22 (d, 1H, -CO-NH, *J* = 8 Hz). RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N): δ 15,3 (C27); 16,7 (C25); 17 (C26); 17,2 (C24); 19 (C6); 20 (C30); 21,6 (C2"); 21,7 (C11); 24,3 (CγLys); 24,5 (C2); 26,6 (C12); 28,4 (3C, *t*-Bu); 28,5 (C23); 29 (3C, Boc); 30,3 (C15); 30,5(CδLys); 31,9 (C21); 32 (CβLys); 34 (C16); 35,1 (C7); 37,8 (C10); 38,1 (C13); 38,5 (C4); 38,65 (C22); 39 (C1); 41,3 (CεLys); 41,6 (C8); 43,2 (C14); 47,6 (C19); 51,1 (C18); 51,3 (C9); 53,4 (CαLys); 56,1 (C5); 56,4 (C17); 78,4 (CBoc); 81,2 (C3); 81,3 (C*t*-Bu); 110,2 (C29); 152,1 (C20); 157,25 (C NHCOOtBu); 171,1 (C1"); 173,4 (C COOtBu); 177,3 (C28).

I.b) Procedimiento general para sintetizar derivados (8-11). A la disolución del producto intermedio 4, 5, 6 o 7 anterior (0,3 mmoles) en THF/MeOH (1/1,4 ml) se le añadió NaOH acuoso (4 M, 0,75 ml). Tras agitar durante 12 h a temperatura ambiente, la mezcla se acidificó con HCl 1N. El precipitado resultante se recogió, se lavó con agua y se secó a vacío para producir los compuestos correspondientes 8 y 9. Para el compuesto 10 y 11, la mezcla se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml), la capa orgánica se lavó con agua, con salmuera, y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, y después se concentró a vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para proporcionar el producto intermedio 8, 9, 10 u 11 deseado.

*N*-betulinil-glicina (8): Rendimiento: 83% (128 mg); RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>): δ 0,70 (m, 1H, -CH en 5), 0,77 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 0,83 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 0,93 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 0,98 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 0,99 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1,09 (m, 1H), 1,10-1,65 (m, 20H), 1,70 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1,90 (m, 3H), 2,40 (dt, 1H, *J* = 3,5 Hz, *J* = 13 Hz), 3,10 (dt, 1H, *J* = 3,5 Hz, *J* = 11 Hz), 3,20 (m, 1H), 4,05 (t, 2H, *J* = 7,5Hz), 4,61 (s, 1H, = CH), 4,75 (s, 1H, = CH), 6,14 (t, 1H, *J* = 5,2 Hz).

*N*-betulinil-β-alanina (9): Rendimiento: 89% (141 mg); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N): δ 0,86 (m, 1H, -CH en 5), 0,88 (m, 3H, -CH<sub>3</sub> en 25), 0,99 (m, 1H, -CH en 1), 1,04 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 24), 1,08 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 27), 1,16 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 26), 1,2 (m, 1H, -CH en 12), 1,24 (m, 2H, -CH en 11 y -CH en 15), 1,27 (m, 3H, -CH<sub>3</sub> en 23), 1,41 (m, 3H, -CH en 6 y -CH en 7), 1,42 (m, 1H, -CH en 9), 1,44 (m, 1H, -CH en 11), 1,5 (m, 2H, -CH en 21 y -CH en 22), 1,58 (m, 2H, -CH en 6 y -CH en 16), 1,68 (m, 1H, -CH en 1), 1,72 (m, 1H, -CH en 18), 1,8 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 30), 1,86 (m, 1H, -CH en 15), 1,89 (m, 2H, -CH en 2), 1,98 (m, 1H, -CH en 12), 2,13 (m, 1H, -CH en 22), 2,28 (m, 1H, -CH en 21), 2,44 (m, 1H, -CH en 16), 2,96 (m, 2H, -CH en 2''), 3,05 (m, 1H, -CH en 13), 3,46 (m, 1H, -CH en 3), 3,65 (m, 1H, -CH en 19), 3,93 (m, 1H, -CH en 1''), 3,98 (m, 1H, -CH en 1''), 4,77 (s, 1H, = CH), 4,93 (s, 1H, = CH), 8,36 (d, 1H, -CO-NH-, *J* = 7 Hz). RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N): δ 16,2 (C27); 17,8 (C24); 17,86 (C25); 17,92 (C26); 20,2 (C6); 21 (C30); 22,6 (C11); 27,6 (C12); 29,7 (C2); 30 (C23); 31,2 (C15); 32,8 (C21); 35 (C16); 36,2 (C7); 37,4 (C2''); 37,9 (C1''); 38,9 (C10); 39,2 (C13); 40,1 (C22); 40,6 (C1); 40,9 (C4); 42,6 (C8); 44,1 (C14); 48,7 (C19); 52,1 (C18); 52,4 (C9); 57,28 (C17); 57,34 (C5); 79,5 (C3); 110,1 (C29); 153,1 (C20); 177,5 (C3''); 178,1 (C28).

*N*-betulinil-*N'*-Boc-etilendiamina (10): R<sub>f</sub>: 0,48 (tolueno/acetona 80/20); Rendimiento 67% (210 mg); RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,70 (m, 1H, -CH en 5), 0,77 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 0,83 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 0,94 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 0,97 (s, 6H, 2-CH<sub>3</sub>), 1,09 (m, 1H), 1,10-1,40 (m, 9H), 1,45 (s, 9H, *t*-Bu), 1,50-1,65 (m, 7H), 1,69 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1,72 (m, 3H), 1,99 (m, 2H), 2,46 (dt, 1H, *J* = 3,5 Hz, *J* = 13 Hz), 3,20 (m, 6 Hz 3,20 (m, 1H), 4,60 (s, 1H, = CH), 4,74 (s, 1H, = CH), 5,01 (m, 1H, -NHCO-), 6,33 (m, 1H, -CO-NH-).

*N'*-betulinil-*N'*-Boc-*L*-Lisina (11): R<sub>f</sub>: 0,32 (n-heptano/acetato de etilo/ácido acético 10/10/0,25); Rendimiento 97% (277 mg); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N): δ 0,86 (m, 4H, -CH en 5, -CH<sub>3</sub> en 25), 1,02 (m, 1H, -CH en 1), 1,06 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 24), 1,10 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 27), 1,18 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 26), 1,20 (m, 1H, -CH en 12), 1,22 (m, 1H, -CH en 11), 1,26 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 23), 1,35 (m, 1H, -CH en 15), 1,42 (m, 1H, -CH en 11), 1,43 (m, 1H, -CH en 9), 1,48 (m, 1H, -CH en 6), 1,50 (m, 2H, -CH<sub>2</sub> en 7), 1,52 (m, 1H, -CH en 21), 1,53 (m, 1H, -CH en 22), 1,55 (s, 9H, -NH<sub>2</sub>Boc), 1,61 (m, 1H, -CH en 16), 1,67 (m, 1H, -CH en 16), 1,70 (m, 1H, -CH en 1), 1,75 (m, 1H, -CH en 18), 1,77 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 30), 1,80 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>δ Lys), 1,81 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>γ Lys), 1,88 (m, 2H, -CH<sub>2</sub> en 2), 1,91 (m, 1H, -CH en 15), 1,96 (m, 1H, -CH en 12), 2,05 (m, 1H, -CHβ Lys), 2,30 (m, 1H, -CHβ Lys), 2,36 (m, 1H, -CH en 21), 2,45 (m, 1H, -CH en 22), 2,58 (m, 1H, -CH en 16), 3,09 (m, 1H, -CH en 13), 3,43 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>ε Lys), 3,49 (m, 1H, -CH en 3), 3,65 (m, 1H, -CH en 19), 4,77 (s, 1H, = CH en 29), 4,92 (s, 1H, = CH en 29), 5,16 (m, 1H, -CH<sub>α</sub> Lys), 7,58 (m, 1H, -NHCO-), 8,25 (d, 1H, -CO-NH-, *J* = 8 Hz). RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N): δ 15,3 (C27); 16,85 (C24); 17 (C25); 17,1 (C26); 19,3 (C6); 20 (C30); 21,7 (C11); 24,5 (CγLys); 26,7 (C12); 28,8 (C2); 29,1 (3C, Boc); 29,2(C23); 30,4 (C15); 30,6 (CδLys); 31,9 (C21); 32,5 (CβLys); 34,2 (C16); 35,4 (C7); 38 (C10); 38,2 (C13); 38,8 (C22); 39,75 (C1); 40 (C4); 41,4 (CεLys); 41,7 (C8); 43,2 (C14); 47,7 (C19); 51,2 (C18); 51,6 (C9); 53 (CαLys); 56,4 (C5); 56,6 (C17); 78,4 (3CBoc); 78,6 (C3); 110,1 (C29); 152,2 (C20); 157,3 (C, NHCOO*t*-Bu); 176,6 (C, COOH); 177,4 (C28).

I.c) Procedimiento general para sintetizar derivados (12-15). Una mezcla del producto intermedio 8, 9, 10 u 11 anterior, anhídrido 2,2-dimetilsuccínico (10 equiv.) y DMAP (1 equiv.) en piridina anhidra (20 ml/mmoles) se puso a reflujo toda la noche. La mezcla se concentró entonces a vacío, y el residuo se cromatografió sobre gel de Si para producir el compuesto 12, 13, 14 o 15 deseado.

*N*-[β-(3-carboxi-3-metilbutanoiloxi)-lup-20,29-en-28-oi]l-glicina (12): R<sub>f</sub>: 0,23 diclorometano/metanol/ácido acético (10/0,1/0,02); Rendimiento 58% (80 mg); HRMS (ESI) calc. para C<sub>38</sub>H<sub>58</sub>N<sub>7</sub> [M-H]<sup>-</sup> 640,4219 encontrado 640,4232; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N): δ 0,73 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 25), 0,77 (m, 1H, -CH en 5), 0,89 (m, 1H, -CH en 1), 0,92 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 24), 0,96 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 23), 1,06 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 27), 1,12 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 26), 1,15 (m, 1H, -CH en 12), 1,15 (m, 1H, -CH en 11), 1,26 (m, 1H, -CH en 15), 1,30 (m, 2H, -CH en 9, -CH en 11), 1,30-1,40 (m, 4H, -CH<sub>2</sub> en 6, -CH<sub>2</sub> en 7), 1,52 (m, 1H, -CH en 1), 1,54 (m, 1H, -CH en 21), 1,55 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 5'), 1,59 (m, 1H, -CH en 22), 1,67 (m, 2H, -CH en 2, -CH en 16), 1,74 (m, 1H, -CH en 18), 1,77 (m, 1H, -CH en 2), 1,78 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 30), 1,93 (m, 1H, -CH en 12), 2,03 (m, 1H, -CH en 15), 2,38 (m, 1H, -CH en 21), 2,39 (m, 1H, -CH en 22), 2,59 (m, 1H, -CH en 16), 2,91 (d, 1H, -CH en 2', *J* = 15,5 Hz), 2,95 (d, 1H, -CH en 2', *J* = 15,5 Hz), 3,08 (m, 1H, -CH en 13), 3,66 (m, 1H, -CH en 19), 4,44-4,51 (dd, 2H, -CH<sub>2</sub> en 1'', *J* = 6 Hz, *J* = 17,5 Hz), 4,75 (s, 1H, -CH en 29), 4,77 (d, 1H, -CH en 3, *J* = 5 Hz), 4,96 (s, 1H, -CH en 29), 8,76 (t, 1H, -NHCO-, *J* = 5,5 Hz). RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N): δ 15,3 (C27); 16,7 (C25); 17 (C26); 17,3 (C24); 18,9 (C6); 20 (C30); 21,6 (C11); 24,6 (C2); 26,6 (C12); 26,7 (C5'); 28,5 (C23); 30,3 (C15); 31,8 (C21); 34 (C16); 35 (C7); 37,7 (C10); 38,1 (C13); 38,5 (C4); 39 (C1); 39,1 (C22); 41,3 (C3'); 41,6 (C8); 42,4 (C1''); 43,2 (C14); 45,6 (C2''); 47,7 (C19); 51,0 (C18); 51,2 (C9); 56,0 (C5); 56,4 (C17); 81,4 (C3); 110,3 (C29); 152,2 (C20); 172,1 (C1'); 174 (C6''); 177,9 (C28); 179,8 (C4').

*N*-[β-(3-carboxi-3-metilbutanoiloxi)lup-20,29-en-28-oi]l-β-alanina (13): R<sub>f</sub>: 0,27 n-heptano/acetato de etilo/ácido acético (10/10/0,5); Rendimiento 2,62% (166 mg); HRMS (ESI) calc. para C<sub>39</sub>H<sub>60</sub>N<sub>7</sub> [M-H]<sup>-</sup> 654,4375 encontrado 654,4375, calc. para C<sub>39</sub>H<sub>59</sub>N<sub>7</sub>Na [M-2H+Na]<sup>+</sup> 676,4195 encontrado 676,4186; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N): δ 0,74

(m, 1H, -CH en 5 y s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 25), 0,91 (m, 1H, -CH en 1), 0,94 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 24), 0,97 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 23), 1,04 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 27), 1,08 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 26), 1,17 (m, 2H, -CH en 11 y -CH en 12), 1,2 (m, 1H, -CH en 15), 1,30 (m, 2H, -CH en 9, -CH en 6), 1,31 (m, 1H, -CH en 11), 1,33 (m, 2H, -CH en 7), 1,4 (m, 1H, -CH en 6) 1,52 (m, 2H, -CH en 21 y -CH en 22), 1,55 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 5'), 1,58 (m, 2H, -CH en 1 y -CH en 16), 1,7 (m, 2H, -CH en 18 y -CH en 2), 1,81 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 30), 1,82 (m, 1H, -CH en 2), 1,85 (m, 1H, -CH en 15), 1,96 (m, 1H, -CH en 12), 2,16 (m, 1H, -CH en 22), 2,27 (m, 1H, -CH en 21), 2,47 (m, 1H, -CH en 16), 2,94 (d, 1H, -CH en 2', J = 15,5 Hz), 3,00 (d, 1H, -CH en 2', J = 15,5 Hz), 3,01 (m, 1H, -CH en 2''), 3,07 (m, 1H, -CH en 13), 3,67 (m, 1H, -CH en 19), 3,9 (m, 1H, -CH<sub>2</sub> en 1''), 4,03 (m, 1H, -CH<sub>2</sub> en 1'') 4,79 (m, 2H, -CH en 3 y -CH en -29), 4,97 (s, 1H, -CH en 29), 8,33 (t, 1H, -NH-CO-, J = 7 Hz). RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N): δ 15,2 (C27); 16,7 (C25); 16,9 (C26); 17,4 (C24); 18,9 (C6); 20 (C30); 21,7 (C11); 24,6 (C2); 26,6 (C12); 26,7 (C5'); 28,6 (C23); 30,3 (C15); 31,8 (C21); 34 (C16); 35 (C7); 35,7 (C2''); 36,7 (C1''); 37,7 (C10); 38,2 (C13); 38,5 (C4); 39 (C1); 39,1 (C22); 41,3 (C3'); 41,6 (C8); 43,2 (C14); 45,7 (C2'); 47,7 (C19); 51,1 (C18); 51,2 (C9); 56,1(C5); 56,3 (C17); 81,4 (C3); 110,2 (C29); 152,2 (C20); 172 (C1'); 175,4 (C6''); 177,2 (C28); 179,8 (C4').

15 N-[O<sup>3</sup>-(3-carboxi-3-metilbutiril)betulinil]-N'-Boc-etilendiamina (14): R<sub>f</sub>: 0,25 diclorometano/metanol/ácido acético (10/0,2/0,01); Rendimiento 82% (190 mg); RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,72 (m, 1H, -CH en 5), 0,77 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 0,78 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 0,79 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 0,89 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 0,92 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1,10 (m, 1H), 1,26 (s, 6H), 1,27-1,40 (m, 6H), 1,42 (s, 9H, t-Bu), 1,42-1,63 (m, 7H), 1,69 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1,72 (m, 2H), 1,99 (m, 2H), 2,46 (m, 1H), 2,57 (m, 2H), 3,08 (m, 1H), 3,31 (m, 9H), 4,42 (m, 1H), 4,55 (s, 1H, = CH), 4,69 (s, 1H, = CH), 5,17 (m, 1H, -NH-CO-), 5,28 (m, 1H, -CO-NH).

25 N<sup>2</sup>-[O<sup>3</sup>-(3-carboxi-3-metilbutiril)betulinil]-N<sup>6</sup>-Boc-L-lisina (15): R<sub>f</sub>: 0,31 n-heptano/acetato de etilo/ácido acético (10/10/0,25); Rendimiento 36% (106 mg); HRMS (ESI) calc. para C<sub>47</sub>H<sub>75</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M-H]<sup>-</sup> 811,5478 encontrado 811,5476; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N): δ 0,76 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 25), 0,82 (m, 1H, -CH en 5), 0,9 (m, 1H, -CH en 1), 0,96 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 24), 0,97 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 23), 1,08 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 27), 1,09 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 26), 1,15 (m, 2H, -CH en 12 y -CH en 11), 1,3 (m, 1H, -CH en 9), 1,32 (m, 1H, -CH en 15), 1,33 (m, 1H, -CH en 11), 1,36-1,46 (m, 4H, -CH<sub>2</sub> en 6, -CH<sub>2</sub> en 7), 1,53 (m, 1H, -CH en 21), 1,54 (m, 1H, -CH en 22), 1,55-1,59 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 5' y s, 9H, -NHBoc y m, 1H, -CH en 1), 1,67-1,7 (m, 2H, -CH en 2, -CH en 16), 1,73 (m, 1H, -CH en 18), 1,78 (m, 1H, -CH en 2), 1,78 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 30), 1,8 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>ε Lys), 1,83 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>δ Lys), 1,89 (m, 1H, -CH en 15), 1,95 (m, 1H, -CH en 12), 2,06 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>β Lys), 2,3 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>β Lys), 2,34 (m, 1H, -CH en 21), 2,43 (m, 1H, -CH en 22), 2,58 (m, 1H, -CH en 16), 2,9 (d, 1H, -CH en 2', J = 15,5 Hz), 2,98 (d, 1H, -CH en 2', J = 15,5 Hz), 3,07 (m, 1H, -CH en 13), 3,43 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>ε Lys), 3,63 (m, 1H, -CH en 19), 4,77 (s, 1H, -CH en 29), 4,78 (dd, 1H, -CH en 3, J = 5 Hz y J = 11,5 Hz), 4,92 (s, 1H, -CH en 29), 5,17 (m, 1H, -CH<sub>α</sub> Lys), 7,58 (m, 1H, -NH-CO-O), 8,26 (d, 1H, -CO-NH-, J = 8 Hz). RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N): δ 15,3 (C27); 16,7 (C25); 17 (C26); 17,4 (C24); 19 (C6); 20,0 (C30); 21,7 (C11); 24,5 (CγLys); 24,6 (C2); 26,4 (C5'); 26,6 (C12); 28,6 (C23); 29,1 (3C, Boc); 30,3 (C15); 30,6 (CδLys); 31,9 (C21); 32,4 (CβLys); 34,2 (C16); 35,1 (C7); 37,75 (C10); 38,1 (C13); 38,5 (C4); 38,8 (C22); 39 (C1); 41,3 (C3'); 41,4 (CεLys); 41,6 (C8); 43,2 (C14); 45,7 (C2'); 47,7 (C19); 51,1 (C18); 51,2 (C9); 53 (CαLys) 56,1 (C5); 56,5 (C17); 78,4 (COBoc); 81,4 (C3); 110,2 (C29); 152,2 (C20); 172,1 (C1'); 176,6 (C6''); 177,7 (C28); 179,8 (C4').

40 I.d) Procedimiento general para la síntesis del compuesto 16. A una disolución agitada en argón del derivado N-t-Boc 14 (0,19 mg, 0,26 mmoles) y 2,6-lutidina (91 μl, 0,78 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (1 ml) se le añadió gota a gota trifluorometanosulfonato de terc-butildimetilsililo (t-BuMe<sub>2</sub>SiOTf, 150 μl, 0,65 mmoles). La mezcla de reacción se agitó 30 min., y se paralizó con disolución acuosa saturada de cloruro de amonio (2 ml). La mezcla se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml), la capa orgánica se lavó con agua, con salmuera, y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. El disolvente se concentró a vacío, y el residuo se usó en la siguiente etapa sin purificación.

50 A una disolución agitada del derivado de N-(terc-butildimetilsililoxicarbonilo) en THF seco (0,5 ml) a temperatura ambiente se le añadió fluoruro de tetrabutilamonio (260 μl, disolución 1 M en THF, 0,26 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h, y se paralizó con disolución acuosa saturada de cloruro de amonio (2 ml). El precipitado resultante se recogió, se lavó con agua y se secó a vacío para producir el compuesto 16 correspondiente.

65 Ácido 4-((28-[(2-aminoetil)amino]-28-oxolup-20,29-en-3β-il)oxi)-2,2-dimetil-4-oxobutanoico (16): Rendimiento: 26% (45 mg); HRMS (ESI) calc. para C<sub>38</sub>H<sub>61</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M-H]<sup>-</sup> 625,4586 encontrado 625,4569; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N): δ 0,75 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 25), 0,77 (m, 1H, -CH en 5), 0,86 (m, 1H, -CH en 1), 0,93 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 24), 0,97 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 23), 1,03 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 27), 1,03 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 26), 1,12 (m, 1H, -CH en 12), 1,13 (m, 1H, -CH en 11), 1,17 (m, 1H, -CH en 15), 1,30 (m, 2H, -CH en 9, -CH en 11), 1,30-1,40 (m, 1H, -CH en 16), -CH<sub>2</sub> en 6, -CH<sub>2</sub> en 7), 1,48 (m, 1H, -CH en 21), 1,54 (m, 1H, -CH en 1), 1,55 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 5'), 1,55 (m, 1H, -CH en 22), 1,64-1,67 (m, 2H, -CH en 2, -CH en 16), 1,70 (m, 2H, -CH en 15, -CH en 18), 1,77 (m, 1H, -CH en 2), 1,77 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 30), 1,92 (m, 1H, -CH en 12), 2,14 (m, 1H, -CH en 21), 2,25 (m, 1H, -CH en 22), 2,67 (m, 1H, -CH en 16), 2,90 (d, 1H, -CH en 2', J = 15,5 Hz), 2,96 (d, 1H, -CH en 2', J = 15,5 Hz), 3,03 (m, 1H, -CH en 13), 3,28 (m, 2H, -CH<sub>2</sub> en 2''), 3,61 (m, 1H, -CH en 19), 3,87-3,81 (m, 2H, -CH<sub>2</sub> en 1''), 4,75 (s, 1H, -CH en 29), 4,77 (d, 1H, -CH en 3, J = 5 Hz), 4,93 (s, 1H, -CH en 29), 8,74 (m, 1H, -NH-CO-). RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N): δ 15,2 (C27); 16,7 (C25); 16,9 (C26); 17,4 (C24); 19 (C6); 20,0 (C30); 21,6 (C11); 24,6 (C2); 26,5 (C12); 26,7 (C5'); 28,5 (C23); 30,3 (C15); 31,8 (C21); 34,0 (C16); 35,0 (C7); 37,7 (C10); 38,1 (C13); 38,5 (C4); 39,0 (C22); 39,1 (C1); 41,0 (C1''); -41,4 (C3'); 41,5 (C8); 42,2 (C2''); 43,1 (C14); 45,7

(C2'); 47,7 (C19); 51,2 (C18); 51,3 (C9); 56,1 (C5); 56,5 (C17); 81,3 (C3); 110,2 (C29); 152,2 (C20); 172,1 (C1'); 177,7 (C28); 179,9 (C4').

5 I.e) Procedimiento general para la síntesis del compuesto 17 (no según la presente invención). La protección N-Boc del producto 15 se escindió con HCl 6N en THF durante una hora. El compuesto 17 se obtuvo tras purificar mediante cromatografía ultrarrápida.

10 *N<sup>2</sup>-[3β-(3-carboxi-3-metilbutanoiloxi)lup-20,29-en-28-oi]]-L-lisina (17).* Rendimiento: 45% (20 mg); HRMS (ESI) calc. para C<sub>42</sub>H<sub>67</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M-H]<sup>-</sup> 711,4954 encontrado 711,4960; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 0,82 (m, 1H, -CH en 5), 0,85 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 24), 0,87 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 23), 0,92 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 25), 0,96 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 26), 0,99 (m, 1H, -CH en 1), 1,01 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 27), 1,04 (m, 1H, -CH en 12), 1,18 (m, 1H, -CH en 15), 1,25 (s, 3H, -CH<sub>3</sub> en 5'), 1,26 (m, 1H, -CH en 11), 1,35 (m, 1H, -CH en 21), 1,36 (m, 1H, -CH en 9), 1,38-1,52 (m, 9H, -CH<sub>2</sub> en 6, -CH<sub>2</sub> en 7, -CH en 11, -CH en 15, -CH en 22, -CH<sub>2</sub> en 3''), 1,56 (m, 1H, -CH en 16), 1,6 (m, 1H, -CH en 2), 1,64 (m, 1H, -CH en 18), 1,68 (m, 1H, -CH en 2), 1,7 (m, 6H, -CH<sub>3</sub> en 30, -CH en 12, 2H, -CH<sub>2</sub> en 4''), 1,72 (m, 1H, -CH en 1), 1,75 (m, 1H, -CH en 2''), 1,89 (m, 1H, -CH en 2''), 1,9 (m, 1H, -CH en 21), 1,93 (m, 1H, -CH en 22), 2,17 (m, 1H, -CH en 16), 2,53 (m, 1H, -CH en 13), 2,55 (d, 1H, -CH en 2', J = 15,5 Hz), 2,62 (d, 1H, -CH en 2', J = 15,5 Hz), 2,90 (t, 2H, -CH en 5'', J = 8 Hz), 3,06 (m, 1H, -CH en 19), 4,3 (m, 1H, -CH en 1''), 4,44 (dd, 1H, -CH en 3, J = 5 Hz y J = 10 Hz), 4,57 (s, 1H, -CH en 29), 4,7 (s, 1H, -CH en 29), 7,1 (m, 1H, -NH-CO-). RMN <sup>13</sup>C (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 15,2 (C27); 17 (C25); 17,1 (C26); 17,2 (C24); 19,4 (C6); 19,8 (C30); 22,3 (C11); 24,05 (C3''); 24,8 (C2); 26,2 (C5'); 27,2 (C12); 28,2 (C4''); 28,7 (C23); 30,9 (C15); 32,1 (C21); 32,7 (C2''); 34,4 (C16); 35,7 (C7); 38,4 (C10); 39 (C4); 39,2 (C13); 39,3 (C22); 39,8 (C1); 40,7 (C5''); 41,5 (C3'); 42,2 (C8); 43,7 (C14); 45,8 (C2'); 48,3 (C19); 51,4 (C18); 52,1 (C9); 54 (C1''); 57 (C5); 57,4 (C17); 82,8 (C3); 110,2 (C29); 152,4 (C20); 173,1 (C1'); 177,3 (C6''); 178,9 (C28); 180,8 (C4').

## 25 II. Ensayos biológicos

### Materiales y procedimientos:

#### Ensayos de inhibición de la infección.

30 La evaluación de la inhibición del VIH-1 se llevó a cabo usando células indicadoras MAGIC-5B, que expresan de forma estable el gen informador de β-galactosidasa clonado en dirección 3' del promotor de LTR del VIH-1. Las células se sembraron en placas a 8 x 10<sup>4</sup> células por pocillo, en placas de 24 pocillos, y se expusieron a VIH-1 (x ng p24). Cuarenta y ocho horas después de la infección, la infecciosidad vírica se monitorizó cuantificando la hidrólisis de o-nitrofenil β-D-galactopiranosido de lisados celulares (kit). La actividad de β-galactosidasa se normalizó según el contenido proteico total en el lisado celular. También se prepararon pocillos de control que contienen virus y células solamente (sin fármaco) y células solamente (sin virus ni fármaco).

40 La inhibición de la infección del 50% (IC50) se definió como la concentración del compuesto que redujo el nivel de infección del VIH-1 en 50% en comparación con los controles no tratados (Tabla 1).

#### Citotoxicidad.

45 La toxicidad celular de los diferentes compuestos se evaluó usando los ensayos de MTT. La concentración citotóxica del 50% (CC<sub>50</sub>) se definió como la concentración de los compuestos que redujo la viabilidad celular en 50% en comparación con aquella para los controles no tratados. El índice de selectividad (SI) se definió como la relación CC<sub>50</sub>:IC<sub>50</sub> (Tabla 1).

#### Análisis de microscopía electrónica.

50 Unas Células 293T se transfectaron en presencia o ausencia de BA, DSB, 12, 15 y 16 (5 μg/ml) con clones moleculares del VIH-1 (pNL4-3) usando el reactivo de transfección JetPei (QBiogen). Dos días después de la transfección, las células 293T se procesaron para la microscopía electrónica de capa fina según lo siguiente:

55 las células se fijaron *in situ* con 2,5% de glutaraldehído en tampón de cacodilato (pH 7,4) durante 60 min. a 4°C. Las células se fijaron entonces posteriormente con 2% de tetraóxido de osmio, se lavaron en tampón de cacodilato que contiene 0,5% de ácido tánico, y se embebieron en epon (Embed-812, Electron Microscopy Sciences Inc.). Las secciones se contratiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión Hitachi H7100.

#### Ensayo de inhibición de la maduración del VIH-1.

65 Se produjeron virus mediante transfección de clones moleculares del VIH-1 (pNL4-3) en células 293T mantenidas en presencia o ausencia de compuestos BA, DSB, 12, 15 y 16 en DMSO usando el reactivo de transfección JetPei (QBiogen). Dos días después de la transfección, los sobrenadantes que contienen virus se concentraron mediante ultracentrifugación a través de una capa de 20% de sacarosa a 25000 rpm durante 2h30. Los sedimentos víricos se

resuspendieron entonces en tampón de lisis RIPA [10 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM de EDTA, 100 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 0,1% de SDS, 0,25% de desoxicolato de sodio, 0,2% de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)]. Las proteínas víricas se cargaron en un gel de SDS-PAGE al 12,5%. Las proteínas transferidas a membrana de PVDF (Millipore) se revelaron usando suero con anticuerpo de cabra anti-CAP24 de VIH (AbD Serotec). El anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano picante se reveló mediante detección quimioluminiscente potenciada (Pierce Biotechnology, Inc).

#### Células y baculovirus recombinantes.

- (i) Células de insectos. Células de *Spodoptera frugiperda* Sf9 se mantuvieron como monocapas, y se infectaron con baculovirus recombinantes a una multiplicidad de infección (MOI) que oscila de 5 a 10 PFU/célula, como se describió previamente [1, 2].
- (ii) Clones de Gag. El gen *gag* del VIH-1, así como el gen de fusión de *luciferasa-vpr*, usados en el presente estudio, se insertaron en el genoma del virus de la nucleopoliedrosis multicápside de *Autographa californica* (AcMNPV) bajo el control de un promotor quimérico de polihedrina AcMNPV-GmMNPV, y los fenotipos de proteínas *Gag* recombinantes descritos con detalle en estudios previos [1, 2]. AcMNPV-Pr55Gag expresó la poliproteína *Gag* de tipo salvaje (WT) de longitud completa (Pr55Gag). El recombinante que expresa la versión N-miristoilada del mutante de supresión que carece del dominio carboxi-terminal p6, denominado como AcMNPV-GagΔp6(myr+) en estudios previos [3], se denominó simplemente como AcMNPV-GagΔp6 por razones de simplificación de acrónimos. En el mutante AcMNPV-GagA364V, el primer resto del dominio de SP1, la alanina, se mutó en valina, usando el procedimiento de solapamiento de PCR convencional. GagA364V es el prototipo de mutantes resistentes a la inhibición por DSB del procesamiento de Gag [4].
- (iii) Vpr. El clon de vaculovirus que expresa la proteína Vpr etiquetada con oligohistidina (AcMNPV-Vpr) se obtuvo de Nathaniel Landau vía Eric Cohen [5].
- (iv) Constructo de fusión luciferasa-Vpr (LucVpr). El plásmido que porta el gen *vpr* (aislado LAI) se obtuvo de Serge Benichou [6]. La secuencia del gen de luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) se aisló mediante PCR del plásmido pGL2 (plásmido de control nº de Cat. E1611; Promega). Tras la supresión de su codón de parada, se insertó en su extremo 3' una secuencia que codifica una etiqueta de 6-histidina y un ligador GSGS, y se fusionó al extremo 5' del gen *vpr*. El detalle de este constructo se comunicará cuando se solicite. El constructo de fusión final *luc(his)<sub>6</sub>-vpr* se insertó en AcMNPV para generar el recombinante AcMNPV-LucVpr. De manera importante, también se construyó la fusión del gen inverso *vpr-3'-luc(his)<sub>6</sub>*, pero se encontró que la proteína de fusión VprLuc fue incapaz de coempaquetarse con Pr55Gag en VLP. (iii) Vpr. El clon de vaculovirus que expresa la proteína Vpr etiquetada con oligohistidina (AcMNPV-Vpr) se obtuvo de Nathaniel Landau vía Eric Cohen.
- (iv) Constructo de fusión luciferasa-Vpr (LucVpr). El plásmido portador del gen *vpr* (aislado LAI) se obtuvo de Serge Benichou. La secuencia del gen de luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) se aisló mediante PCR del plásmido pGL2 (plásmido de control nº de Cat. E1611; Promega). Tras la supresión de su codón de parada, se insertó en su extremo 3' una secuencia que codifica una etiqueta de 6-histidina y un ligador GSGS, y se fusionó al extremo 5' del gen *vpr*. El constructo de fusión final *luc(his)<sub>6</sub>-vpr* se insertó en AcMNPV para generar el recombinante AcMNPV-LucVpr.

#### Aislamiento de partículas similares a virus (VLP) extracelulares.

Los sobrenadantes del cultivo de células Sf9 se aclararon mediante centrifugación de baja velocidad, después las VLP se recuperaron usando un procedimiento de dos etapas que comprende una centrifugación en gradiente por etapas de agarosa [7], seguido de una ultracentrifugación en gradiente lineal de D<sub>2</sub>O-sacarosa [8, 9]. (i) En la primera etapa, las VLP contenidas en el medio de cultivo celular se sedimentaron a través de una almohadilla de sacarosa (20%, p:v, en tampón de TNE; TNE: 100 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH 7,4, 1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA) a 30 krpm durante 1 h a 15°C en un rotor Kontron TST55.5 [8]. Las VLP sedimentadas de la etapa (i) se resuspendieron entonces suavemente en PBS (0,20-0,25 ml), y (ii) se analizaron adicionalmente mediante ultracentrifugación isopícnica en gradientes de sacarosa-D<sub>2</sub>O [8, 9]. Los gradientes lineales (volumen total de 10 ml, 30-50%, p:v) se centrifugaron durante 18 h a 28 krpm en un rotor Beckman SW41. La disolución de sacarosa al 50% se obtuvo en D<sub>2</sub>O tamponada a pH 7,2 con NaOH, y la disolución de sacarosa al 30% se obtuvo en 10 mM de Tris-HCl, pH 7,2, 150 mM de NaCl, 5,7 mM de Na<sub>2</sub>EDTA. Se recogieron alícuotas de 0,5 ml de la parte superior, y las fracciones se analizaron para determinar el contenido de proteína mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia, y mediante ensayo de luciferasa como se describe a continuación.

#### Ensayos de inhibición del ensamblaje de Gag.

Se infectaron alícuotas de células Sf9 (10<sup>6</sup>) con dos baculovirus recombinantes a igual multiplicidad de infección (MOI de 10 PFU/célula, cada uno). Uno expresó el precursor de Gag del VIH-1 (AcMNPV-Pr55Gag o control, AcMNPV-GagΔp6 al que se le suprimió p6), el otro la proteína Vpr de control (AcMNPV-Vpr) o la fusión LucVpr

(AcMNPV-LucVpr). A 24 h post-infección (pi), se añadieron cantidades crecientes de PA-457, 12, 16 o 15 en DMSO a los cultivos celulares infectados. Para evitar cualquier interferencia con un posible efecto del DMSO, éste se mantuvo constante en volumen en las diferentes muestras. En experimentos estándar, se diluyeron disoluciones madre de PA-457, 12, 16 o 15 (10 mg/ml en DMSO) con DMSO para obtener un intervalo de concentraciones de inhibidor desde 0,5 hasta 20 µg por alícuota de 2 µl de DMSO, y cada alícuota de 2 µl se añadió por volumen de 1 ml de monocapas de células que cubren el medio de cultivo. Las células se cosecharon a 48 h pi, y las VLP extracelulares liberadas en el medio de cultivo se cuantificaron usando ensayo de luciferasa. Las VLP envueltas en la membrana se sedimentaron y se resuspendieron en tampón de lisis KDT (KDT:0,1 M de tampón de fosfato de potasio, pH 7,8, 1 mM de DTT, que contiene 0,2% de Triton X100) durante 30 min. a 37°C con vórtice cada 10 min. La actividad de luciferasa asociada con VLP se midió como se describió previamente [10] usando un luminómetro Lumat LB-9501 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania). Digno de mención, se encontró que concentraciones finales de Triton X100 mayores que 0,2% en las muestras tienen un efecto perjudicial sobre la actividad enzimática de la luciferasa. Para compensar efectos negativos eventuales de los fármacos sobre la expresión de LucVpr, la actividad de luciferasa se midió en los lisados celulares correspondientes, obtenidos tras la lisis de las células sedimentadas con tampón KDT. Los resultados se expresaron como unidades de luz relativas (RLU) por µg de proteína. Los valores de la relación de la actividad de luciferasa intracelular asociada a VLP se representaron gráficamente frente a la concentración de inhibidor. La concentración inhibidora del 50% (IC<sub>50</sub>) se definió como la concentración de compuesto requerida para reducir esta relación en 50%, en comparación con la relación obtenida con células no tratadas a las que se atribuyó el valor de 100%.

#### Ensayos de citotoxicidad.

La toxicidad celular de los diferentes compuestos se evaluó usando los ensayos de MTT [11]. La concentración citotóxica del 50% (CC<sub>50</sub>) se definió como la concentración del compuesto que redujo la viabilidad celular en 50%, en comparación con la de los controles no tratados. El índice de selectividad (SI) se definió como la relación de CC<sub>50</sub> a IC<sub>50</sub>.

#### Electroforesis en gel y ensayos cuantitativos de proteínas.

La electroforesis en gel de poliacrilamida de muestras de proteínas desnaturizadas con SDS (SDS-PAGE), y el análisis de inmunotransferencia se han descrito con detalle en estudios previos [1, 2]. De forma breve, las proteínas se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% o 15% desnaturizante con SDS, junto con marcadores proteicos previamente teñidos (escalera proteica previamente teñida (PageRuler™; Fermentas Inc., Hanover, MD, o Dual Color™ Standards, BioRad) y se transfirieron eléctricamente a membrana de nitrocelulosa (Hybond™-C-extra; GE Healthcare Bio-Sciences). Las transferencias se bloquearon en leche desnatada al 50% en disolución salina tamponada con Tris (TBS) que contiene 0,05% de Tween-20 (TBS-T), se enjuagaron en TBS-T, se incubaron entonces sucesivamente con anticuerpos anti-Gag primarios de conejo o de ratón, y anticuerpos secundarios anti-IgG relevantes, a diluciones de trabajo que oscilan de 1:1.000 a 1:10.000. El anticuerpo policlonal anti-Gag del VIH-1 (obtenido en el laboratorio; [9]) se produjo en conejo mediante inyección de proteína Gag truncada en C expresada bacterianamente, fusionada a GST y purificada por afinidad, que consiste en el dominio MA de longitud completa y los primeros setenta y ocho restos del dominio CA (sitio Pst I; secuencia gag<sub>Lai</sub>). El anticuerpo monoclonal de ratón (mAb) anti-CAp24 (Epiclone #5001) y el mAb anti-MAp17 (Epiclone #5003) se obtuvieron de Cylex Inc. (Columbia, MD). El anticuerpo monoclonal de ratón anti-oligo-histidina se adquirió de Quiagen S.A. (Courtaboeuf, Francia). Los conjugados de IgG anti-conejo o anti-ratón marcados con fosfatasa se adquirieron de Sigma (St Louis, MO). Para la cuantificación inmunológica de VLP o del contenido de proteína VLP, la proteína transferida a la membrana se hizo reaccionar con su anticuerpo primario específico, después con proteína A marcada con <sup>125</sup>I (MP Biomedicals France, 67402 Illkirch; actividad específica 30 µCi/µg) usada a 20-30 µCi por 100 cm<sup>2</sup> de membrana, y se expuso a películas radiográficas (Kodak BioMax HE film™, Sigma-Aldrich, 38297-St Quentin-Fallavier). Los autorradiogramas se escanearon y se cuantificaron mediante análisis densitométrico, usando el analizador de imágenes VersaDoc y el programa Quantity One (BioRad), o las bandas de proteína se cortaron de las transferencias y se midió la radioactividad en un contador de centelleo (Beckman LS-6500), como se describió previamente [8, 9]. Alternativamente, la cuantificación de las proteínas en VLP también se llevó a cabo usando el radiomarcado de proteínas. Muestras de células infectadas con baculovirus se marcaron con <sup>35</sup>S-aminoácidos (ICN Pharmaceuticals France, 91898-Orsay; Tran<sup>35</sup>S-LABEL™; actividad específica >1.000 Ci/mmol), añadidos a 15 µCi/ml en medio libre de metionina durante 30 h a 18 h pi en ausencia o presencia de inhibidor en DMSO. Las VLP se recuperaron del medio de cultivo celular como se describió anteriormente, y las proteínas radioactivas se analizaron mediante SDS-PAGE y autorradiografía de geles secos.

#### Microscopía electrónica y microscopía inmunoelectrónica.

Unas células Sf9 infectadas con baculovirus se cosecharon a 48 h pi, se sedimentaron, se fijaron con 2,5% de glutaraldehído en 0,1 M de tampón de fosfato, pH 7,5, se fijaron posteriormente con tetróxido de osmio (2% en H<sub>2</sub>O) y se trataron con disolución de ácido tánico al 0,5% en H<sub>2</sub>O. Las muestras se deshidrataron y se embebieron en Epon (Epon-812; Fulham, Latham, NY). Secciones ultrafinas se tiñeron con citrato de plomo alcalino al 2,5% y acetato de uranilo al 0,5% en etanol al 50%, y se tiñeron posteriormente con disolución de acetato de uranilo al 0,5% en H<sub>2</sub>O [8, 9]. Las rejillas se examinaron bajo un microscopio electrónico Jeol JEM-1400, equipado con una cámara

digitalizada ORIUS™ (Gatan France, 78113-Grandchamp). Para los análisis de EM estadísticos, se examinó un mínimo de 30 cuadrados de rejilla que contienen 10 a 20 secciones celulares cada uno para contar la germinación de VLP en la superficie celular, o la germinación en el compartimento vesicular intracelular.

5 Para la microscopía inmunoelectrónica, las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% en 0,1 M de tampón de fosfato pH 7,3 durante 4 h, se fijaron posteriormente con glutaraldehído al 1% en 0,1 M de tampón de fosfato pH 7,4 durante 4 h, después se enjuagaron toda la noche en 0,1 M de tampón de fosfato pH 7,3. Tras la deshidratación, las muestras se incluyeron en resina hidrófila LR White (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA; n° de Catálogo de EMS 14380), y se depositaron secciones ultrafinas sobre rejillas revestidas con níquel. Las rejillas se incubaron con anticuerpo de conejo anti-Gag (obtenido en el laboratorio; [9]) a una dilución de 1:50 en TBS durante 1 h a temperatura ambiente (RT). Tras enjuagar con TBS, las rejillas se incubaron posteriormente con anticuerpo de cabra etiquetado con oro coloidal de 6 nm anti-IgG de conejo (British Biocell International Ltd, Cardiff, UK; diluido hasta 1:50 en TBS) durante 30 min. a RT. Tras enjuagar con TBS, las muestras se tiñeron posteriormente con acetato de uranilo al 1% en H<sub>2</sub>O durante 1 min. a RT, se enjuagaron nuevamente con TBS, y se examinaron bajo el microscopio electrónico.

#### Reticulación química de Pr55Gag intracelular.

20 Unas lícuotas de células Sf9 infectadas con baculovirus recombinante ( $5 \times 10^5$  células) no tratadas o tratadas con 16 a 10 µg/ml durante 24 h a 24 h pi se centrifugaron a baja velocidad, se resuspendieron en 200 µl de PBS que contiene el reticulador suberato de bis(sulfosuccinimidilo) (BS3; Pierce Biotechnology, Rockford, IL) a molaridades crecientes, que oscilan de 0 a 50 mM [12], y se incubaron en este tampón durante 30 min. a temperatura ambiente (RT). Las muestras celulares se centrifugaron entonces, se resuspendieron y se lisaron en 200 µl de NaCl 0,015 M, tampón de fosfato 0,5 mM pH 7,3 que contiene BS3 a las mismas molaridades como en las mezclas originales, y se incubaron adicionalmente durante 30 min. a RT. Los lisados celulares se mezclaron con 30 µl de tampón de muestra con SDS concentrado 6 veces (6x) sin β-mercaptoetanol, se calentaron hasta 100°C durante 1 min., y las proteínas Gag se analizaron mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las transferencias Western (Amersham Hybond™-ECL; GE-Healthcare) se incubaron con suero de conejo policlonal anti-Gag (obtenido en el laboratorio; [9]) diluido hasta 1:3.000 durante 3 h a RT, seguido de anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma; dilución 1:10.000) durante 1 h a RT. Las transferencias se hicieron reaccionar entonces con sustrato quimioluminiscente SuperSignal® West Pico (Pierce Biotechnology), y los luminogramas se visualizaron usando el sistema de formación de imágenes Fusion X7 con el software Bio1D (Vuilbert-Lourmat, Marne-la-Vallée, Francia).

#### RESULTADOS:

35 Los compuestos según la invención se evaluaron para determinar su capacidad para inhibir el ensamblaje y/o maduración del VIH-1, y con respecto a las consecuencias sobre la infecciosidad vírica.

#### Capacidad para infectar células MAGIC-5B.

40 Para este fin, los virus producidos mediante transfección de clones moleculares NL4.3 del VIH-1 en células 293T mantenidas en presencia de los compuestos recientemente sintetizados 12, 13, 15 y 16 se analizaron para determinar su capacidad para infectar células MAGIC-5B en paralelo con BA (1) y DSB (2). Los datos de los bioensayos obtenidos se resumen en la Tabla 1.

45 Tabla 1. Eficiencia de la inhibición de la infección del VIH-1 de derivados del ácido betulínico <sup>(a)</sup>

Compuesto	IC <sub>50</sub> (µM)	CC <sub>50</sub> (µM)	SI <sup>(b)</sup>
BA	5,315	4,52	0,85
DSB	0,040	31,0	775,00
<b>(12) (ejemplo de referencia)</b>	0,160	49,5	309,37
<b>(15) (ejemplo de referencia)</b>	0,170	33,0	199,41
<b>(16)</b>	0,016	33,9	2118,75

50 <sup>(a)</sup> Los valores medios (m) para la actividad inhibidora del 50% (IC<sub>50</sub>) de la infección se dan como µM (m). Los valores medios (m) para la citotoxicidad (CC<sub>50</sub>) se dan como µM (m). <sup>(b)</sup> El índice de selectividad (SI) representó la relación CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>.

#### Conversión de p25 no escindida (CA-SP1) en p24 madura (CA).

55 Para elucidar adicionalmente el mecanismo de acción, las muestras víricas usadas para ensayos de infección se sometieron a caracterización bioquímica (Figura 1). El análisis de la conversión de p25 sin escindir (CA-SP1) en p24 madura (CA) reveló que los compuestos 2, 12, 15 y 16 inhiben la escisión de CA-SP1.

#### Análisis de la morfología del virus.

Para determinar si el defecto en el procesamiento de p25 a p24 inducido por BA, DSB, 12, 15 y 16 afectó a la morfología del virus, se llevó a cabo el análisis mediante EM. En ausencia de compuestos, las células transfectadas con pNL4-3 produjeron partículas víricas con la morfología madura clásica caracterizada por la presencia de núcleos cónicos condensados (Figura 2A). Por el contrario, los virus de células tratadas con DSB, 12, 15 y 16 carecieron de núcleos cónicos. En su lugar, estos viriones presentaron núcleos acéntricos esféricos, y se distinguieron además de las partículas no tratadas por la presencia de una capa densa en electrones adicional en el interior de la membrana vírica (Figura 2C, 2D, 2E, 2F). Por el contrario, BA tiene un efecto moderado sobre la inhibición de la maduración vírica. Tomados juntos, estos resultados indican que DSB, 12, 15 y 16 bloquean efectivamente la maduración apropiada de los viriones.

Los compuestos según la invención funcionan de este modo como inhibidores de la modulación, e inhiben la conversión de p25 (CA-SP1) en p24 (CA) en lisados viriónicos, conduciendo a un procesamiento defectuoso de Gag y a la producción de partículas morfológicamente anormales y no infecciosas.

#### Empaquetamiento de proteínas Vpr y luciferasa etiquetada con Vpr (LucVpr) en VLP de VIH-1 producidas en células de insecto.

Se ha encontrado que Vpr está coencapsidado con el precursor de Gag del VIH-1 (Pr55Gag) en relación aproximadamente equimolar a Pr55Gag, una estequiometría que se reevaluó posteriormente hasta una relación menor de 1 copia de Vpr por 7 moléculas de Gag [13]. Células Sf9 se coinfectaron con dos baculovirus recombinantes a multiplicidad igual (MOI 10 cada uno), uno que expresa Pr55Gag del VIH-1 y el otro Vpr o la proteína de fusión LucVpr. Las VLP recuperadas del medio de cultivo celular a 48 h pi se analizaron mediante SDS-PAGE y transferencia Western usando anticuerpos anti-Gag y anti-etiqueta de His. Ambas proteínas Vpr y LucVpr se empaquetaron eficientemente en VLP. También se observó una actividad enzimática de luciferasa asociada con VLP extracelulares recuperadas de células que coexpresan Pr55Gag y LucVpr, como se detalla a continuación. Esto sugirió que (i) la proteína de fusión LucVpr fue competente para el empaquetamiento en las VLP, y (ii) que el resto de luciferasa de LucVpr retuvo su actividad enzimática tras la fusión con Vpr. Puesto que se pudo portar algo de enzima luciferasa durante la purificación de las VLP, se diseñó el siguiente conjunto de experimentos para discriminar entre material adsorbido a VLP y material incorporado a VLP.

#### Especificidad de encapsidamiento de LucVpr en VLP: dependencia del dominio p6 de Gag.

Para determinar si la actividad de luciferasa que se encontró asociada con VLP de VIH-1 representó LucVpr encapsidada, y no contaminantes enzimáticos adsorbidos sobre VLP, se coinfectaron células Sf9 con AcMNPV-LucVpr y AcMNPV-GagΔp6, un baculovirus recombinante que expresó una versión del precursor de Gag del VIH-1 a la que se le suprimió p6. En estudios previos, se ha mostrado que el dominio p6 es indispensable para la germinación y salida de VLP de células de insecto infectadas con baculovirus recombinante, y, de forma interesante, que VLP constituidas por moléculas precursoras de Gag a las que se les suprimió p6 (GagΔp6 de 47 kDa) mostraron una forma más regular y una mayor esfericidad que las VLP constituidas de Pr55Gag de WT [3]. Las células Sf9 coinfectadas con AcMNPV-LucVpr y AcMNPV-Pr55Gag (precursor de Gag de tipo salvaje, de longitud completa) sirvieron como control positivo, y para el control negativo para la producción de VLP, se infectaron células Sf9 con AcMNPV-LucVpr solo.

El medio de cultivo celular de las células Sf9 que coexpresan LucVpr y Pr55Gag o GagΔp6 se recogió a 48 h pi, usando ultracentrifugación a través de una almohadilla de sacarosa seguida de una segunda etapa de ultracentrifugación en gradiente isopícnico [8, 9]. Las fracciones de los gradientes se analizaron para determinar el contenido de poliproteína Gag (Figura 3a), y se procesaron para el ensayo de luciferasa (Figura 3b). Las muestras de células que coexpresan Pr55Gag+LucVpr mostraron un pico de actividad de luciferasa que coincidió con la densidad aparente de VLP en densidad de sacarosa-D<sub>2</sub>O, a saber, 1,15-1,25 [8, 9]. En contraste con estas muestras de control, no se detectó actividad significativa de luciferasa en las fracciones que contienen VLP procedentes del medio de cultivo de células que coexpresan GagΔp6+LucVpr: el nivel de actividad de luciferasa observado fue comparable al nivel de fondo encontrado en el medio de cultivo de células infectadas con AcMNPV-LucVpr (Figura 3b). Este resultado sugirió que la actividad de luciferasa que se encontró asociada con VLP del VIH-1 encerrada en la membrana fue específica del empaquetamiento, y resultó de un proceso de empaquetamiento dependiente de p6 mediado por el resto Vpr de la proteína de fusión LucVpr.

#### Cuantificación del ensamblaje de VLP sobre la base de ensayo de luciferasa, según se aplica al inhibidor del ensamblaje prototipo PA-457.

Unas células Sf9 se coinfectaron con AcMNPV-Pr55Gag y AcMNPV-LucVpr (a una MOI de 10 cada una), y se añadió DSB al cultivo celular a 24 h pi a dosis crecientes, que oscilan de 0 a 10 µg/ml, y se mantuvieron durante 24 h. El medio de cultivo celular se cosechó entonces a 48 h pi, se sometió al análisis de ultracentrifugación de 2 etapas, y cada fracción de gradiente se sondó para la poliproteína Gag y la actividad de luciferasa, como anteriormente. Se observó que el pico de actividad de luciferasa asociada a VLP disminuyó progresivamente de una

manera dependiente de la dosis de DSB (Figura 4). Las fracciones de gradiente correspondientes al pico de actividad de luciferasa se reunieron, y las VLP contenidas en estas fracciones se sedimentaron, se lisaron y se ensayaron para determinar el contenido de luciferasa. La actividad de luciferasa se determinó paralelamente en los lisados celulares correspondientes, y los valores de la relación de la actividad de luciferasa intracelular asociada a VLP se representaron gráficamente frente a las concentraciones de DSB. La curva confirmó la disminución, dependiente de la dosis, de luciferasa asociada a VLP en presencia de DSB. Se correlacionó con la disminución progresiva de los niveles de VLP extracelulares, como se muestra mediante la señal de Pr55Gag en el análisis de transferencia Western. La expresión intracelular de Pr55Gag permaneció virtualmente sin cambios dentro de este intervalo de concentraciones de DSB, como ya se observó [8].

Estos datos sugirieron que un ensayo de luciferasa a base del empaquetamiento de VLP de la proteína de fusión LucVpr se pudo usar legítimamente para cuantificar la producción de VLP y evaluar la eficacia de los antivirales que actúan en la etapa del ensamblaje y de la germinación extracelular de las partículas víricas. Como se ejemplifica mediante este experimento particular, la inhibición del 50% de la formación de VLP se observó a una concentración de DSB de 2,2-2,5 µg/ml, que corresponde a una IC<sub>50</sub> de 3,8-4,2 µM. Este valor fue consistente con el valor de IC<sub>50</sub> de 8-10 µM previamente determinado usando un ensayo inmunorradioquímico de VLP [8], un procedimiento que no se pudo comparar con el ensayo de luciferasa, en términos de sensibilidad y linealidad de la respuesta a lo largo de un amplio intervalo de concentraciones enzimáticas.

Sin embargo, se concibió la posibilidad de que DSB (o cualquier miembro de esta clase de inhibidores) pueda interferir negativamente con funciones celulares implicadas indirectamente en el coempaquetamiento de LucVpr y Pr55Gag. Para abordar este aspecto, se marcaron cultivos celulares infectados con baculovirus con <sup>35</sup>S-metionina y <sup>35</sup>S-cisteína, las VLP marcadas con <sup>35</sup>S se purificaron mediante ultracentrifugación, y se analizó su contenido proteico usando SDS-PAGE y autorradiografía y transferencia Western. Las bandas de las proteínas Gag y Vpr se cortaron del gel, y su contenido de radioactividad respectivo se determinó mediante recuento por centelleo. Notablemente, Gag se evaluó como el contenido total de Gag, incluyendo todas las especies proteicas de Gag en nuestro cálculo, es decir, Pr55Gag, Pr41Gag, CAp24, y MAP17, y se corrigió para el contenido respectivo de restos de aminoácidos que contienen azufre en las diferentes especies proteicas. Se encontró una relación molecular promedio de 5,60 ± 0,68 copias de Gag por molécula de VPr (m ± SD; n = 8) en VLP producidas mediante células Sf9, un valor que estaba próximo al valor de 7:1 dado a conocer para viriones del VIH-1 liberados por células humanas [13].

Se aplicó el mismo protocolo a VLP aisladas de células Sf9 tratadas con PA-457 que coexpresan LucVpr y Pr55Gag. Cuando se representan frente a las dosis de DSB, las relaciones de Gag a LucVpr permanecieron virtualmente constantes, independientemente de la dosis de DSB, con un valor promedio de 4,92 ± 0,25 copias de Gag por molécula de LucVpr (m ± SD; n = 8). La ausencia de disminución significativa de la relación LucVpr:Gag en presencia de dosis crecientes de DSB excluyó por lo tanto una posible interferencia directa de DSB con la maquinaria de encapsidamiento de LucVpr, que podría dar como resultado valores aparentemente menores de la actividad de luciferasa a concentraciones elevadas de DSB.

La menor diferencia en los valores medios de las relaciones Vpr:Gag y LucVpr:Gag (5,60 ± 0,68 frente a 4,92 ± 0,25) no fue significativa al nivel de P = 0,05, y sugirió que la fusión de luciferasa al término N de Vpr no alteró significativamente la eficiencia del encapsidamiento de la proteína de fusión LucVpr, en comparación con Vpr no fusionada. Si se considera un valor promedio de 1 copia de Vpr o LucVpr por 5 moléculas de Gag (aprox. 20%), el empaquetamiento de Vpr y LucVpr en VLP producidas en células Sf9 fue tan eficiente como el empaquetamiento de Vpr en los viriones de VIH-1 (15% Vpr; [13]). Este punto importante validó nuestro procedimiento de cuantificación de las VLP usando ensayo de luciferasa a base de Vpr y el precursor de Gag del VIH-1 recombinante en el sistema de expresión de baculovirus-células de insecto.

#### Evaluación de los inhibidores potenciales del ensamblaje del VIH-1 usando el ensayo basado en el empaquetamiento de LucVpr.

BA, PA-457, 12, 15 y 16 se administraron a clls Sf9 coinfectadas con AcMNPV-Pr55Gag y AcMNPV-LucVpr a 24 h pi, y a concentraciones crecientes. El tratamiento farmacéutico se mantuvo durante otras 24 h, y las VLP liberadas en el medio de cultivo celular se sedimentaron a través de una almohadilla de sacarosa [8]. Las cantidades de VLP extracelulares recuperadas en los sedimentos a las 48 h obtenidas en presencia de los diferentes inhibidores se determinaron usando los ensayos de luciferasa. Tras la normalización a la actividad de luciferasa determinada en los lisados celulares correspondientes, los valores de la relación de la actividad de luciferasa asociada a VLP incorporada a las células se representaron gráficamente frente a las concentraciones de fármaco. 12 y 15, así como el compuesto líder PA-457, mostraron un efecto inhibitor neto sobre el ensamblaje de las VLP con algunas diferencias en su eficacia respectiva. 15 presentó la actividad inhibitora más elevada, oscilando IC<sub>50</sub> entre 1 y 2 µg/ml, con un valor medio a 1,9 µM, frente a 5,1 µM para DSB y 5,9 µM para ST-327 (Figura 5 y Tabla 2 más abajo). Los valores del índice de selectividad (SI) estaban en el mismo orden de magnitud para 15 y PA-457, pero 3 veces menor que DSB para 12 (Tabla 2).

Tabla 2. Eficiencia de la inhibición del ensamblaje de VLP de VIH-1 por derivados del ácido betulínico <sup>(a)</sup>

Compuesto	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	IC <sub>50</sub> (µM)	CC <sub>50</sub> (µM)	SI <sup>(b)</sup>
BA	18,0 ± 3,0	39,4	43,8	1,1
DSB	3,0 ± 1,0	5,1	93,5	18,7
12 (compuesto de referencia)	3,8 ± 1,6	5,9	31,1	5,3
15 (compuesto de referencia)	1,6 ± 0,5	1,9	24,7	13,0
16	NA <sup>(c)</sup>	NA <sup>(c)</sup>	120,0	ND <sup>(d)</sup>

<sup>(a)</sup> Los valores medios (m) para la actividad inhibidora del 50% (IC<sub>50</sub>) sobre el ensamblaje de las VLP se dieron como µg/ml (media, m ± SEM; n = 4), o como µM (m). Los valores medios para la citotoxicidad (CC<sub>50</sub>) solamente se dieron como µM.

<sup>(b)</sup> El índice de selectividad (SI) se dio mediante la relación CC<sub>50</sub>:IC<sub>50</sub>.

<sup>(c)</sup> NA, no aplicable.

<sup>(d)</sup> ND, no determinado.

Curiosamente, la curva de respuesta frente a la dosis de la inhibición del ensamblaje de VLP obtenida con 16 mostró una pendiente suave hasta 8 µg/ml, seguido de una meseta a una producción de VLP de 60-50% a concentraciones mayores que 10 µg/ml (que corresponden a una molaridad de 15,6 µM; Figura 5 y Tabla 2). Además, EP-39 mostró el nivel más bajo de citotoxicidad, en comparación con los otros fármacos, incluyendo BA (Tabla 2). La meseta observada en la curva de inhibición de 16 implicó la aparición de una producción residual de VLP positivas a luciferasa en presencia de dosis elevadas de 16. Este resultado fue en cierto modo inesperado, puesto que 16 inhibió la escisión de la maduración de CAp24-SP1 y disminuyó la infecciosidad vírica con una IC<sub>50</sub> media de 16 nM y una SI de alrededor de 2.000 [14], es decir, una eficiencia significativamente mayor en comparación a la del compuesto líder PA-457. Entonces se llevó a cabo un análisis posterior de los efectos biológicos de 16 para excluir posibles resultados de falsos negativos.

#### Propiedades biofísicas de partículas positivas a luciferasa producidas por células tratadas con 16.

Las VLP extracelulares recuperadas en el sedimento a las 48 h de medio de cultivo de células tratadas con 16 se analizaron mediante ultracentrifugación isopícnica en gradiente de densidad de sacarosa-D<sub>2</sub>O [8, 9], como en los experimentos de las figuras 3 y 4. Las VLP de control liberadas por células no tratadas se equilibraron a una densidad aparente de 1,15, consistente con la de partículas retrovíricas encerradas en la membrana [15]. Sin embargo, las VLP residuales producidas en presencia de 16 mostraron un pico más amplio de actividad de luciferasa, que corresponde a una densidad promedio de 1,17. Esto sugirió heterogeneidad y un cambio en la composición de las VLP de 16 en comparación con las VLP de control, con una diferencia en la relación de proteína a lípidos que consiste en una mayor proporción de proteínas frente a lípidos en VLP de 16. Nuestros próximos experimentos estuvieron dirigidos a elucidar este punto usando otro enfoque, basado en un análisis estructural.

#### Análisis estructural de las partículas de 16.

En un estudio previo, se ha demostrado que DSB añadido a cultivos celulares en el intervalo micromolar tuvo un efecto drástico sobre el ensamblaje vírico. A 10 µg/ml (17 µM), DSB abolió totalmente la germinación y salida de VLP desde células Sf9 infectadas con AcMNPV-Gag [8]. También bloqueó completamente el ensamblaje citoplásmico de partículas similares a núcleos formadas de precursor de Gag no N-miristoilada [8]. Por el contrario, las células Sf9 de control, infectadas con AcMNPV-Gag, no tratadas, se decoraron abundantemente con germinación de VLP desde la membrana plasmática [8, 9]. Para investigar adicionalmente la base molecular y celular para la diferencia en el efecto inhibidor entre los tres inhibidores PA-457, 12 y 15 por un lado, y 16 por otro lado, se examinaron mediante microscopía electrónica (EM) células Sf9 infectadas con AcMNPV-Gag tratadas con los diferentes fármacos a 5 y 10 µg/ml durante 24 h a 24 h pi. El patrón de microscopía electrónica (EM) mostró que las células tratadas con 12 y con 15 fue similar al de células tratadas con DSB a las mismas concentraciones: se observó un efecto inhibidor neto sobre el ensamblaje y germinación de VLP con 12 y 15.

Sin embargo, las células Sf9 que expresan Pr55Gag mostraron una respuesta diferente a 16, con tipos diferentes de patrones de EM que a menudo coexistieron en las mismas células. (i) Se observaron unas partículas densas en electrones de aprox. 100 nm de diámetro en el citoplasma, dispersas o dispuestas como pequeños agrupamientos rodeados por una membrana; (ii) también se acumularon partículas de 100 nm en grandes inclusiones citoplásmicas; (iii) también se observaron agregados irregulares de nanopartículas de aprox. 20 nm de diámetro en el citoplasma, y estas nanopartículas se inmunomarcaron con oro con anticuerpo anti-Gag. (iv) Ocasionalmente, se observaron partículas de 100 nm en el proceso de salida al medio extracelular, directa o indirectamente vía vesículas que se abren al medio.

Las partículas de 100 nm ensambladas en células tratadas con 16 difirieron estructuralmente de las partículas similares a núcleos intracitoplásmicas, no encerradas, de 100-130 nm de diámetro ensambladas por Pr55Gag no N-miristoilada [8, 9], y de las VLP encerradas en la membrana, extracelulares, liberadas por células que expresan Pr55Gag N-miristoilada. A gran aumento, las subestructuras eran discernibles, confirmando las partículas inducidas

por 16 el aspecto de mórulas. Las partículas similares a mórulas tuvieron un diámetro que oscila de 87 a 120 nm (diámetro medio,  $m \pm SD = 109,1 \pm 9,2$ , SD,  $n = 14$ ). Cada mórula parecía estar constituida por subunidades con forma de perla que se asemejan a las nanopartículas ya observadas en agregados irregulares, que oscilan de 14 a 27 nm de diámetro ( $m \pm SD = 19,4 \pm 3,2$ ;  $n = 17$ ). Se encontró que muchas partículas similares a mórulas tenían una forma irregular, y/o se encontraron en el proceso de desmantelamiento y liberación de nanopartículas aisladas.

#### Efecto de 16 sobre el mutante de dominio SP1 GagA364V.

GagA364V del VIH-1 es el prototipo de una serie de mutantes de Gag resistentes a PA-457 que muestran un patrón normal o subnormal de procesamiento de Gag mediado por PR en presencia de dosis inhibitoras de DSB [4]. En base a la resistencia a DSB conferida por A364V y otros mutantes de fenotipo similar, se ha supuesto que el resto de alanina en la posición 364 en la secuencia de Pr55Gag (posición 1 del dominio de SP1), y sus regiones de flanqueo en los dominios de CA y SP1, representan la diana principal de DSB [4]. Por lo tanto, se substituyó el resto de alanina por valina en el codón 364 en la secuencia de *gag* del clon baculovírico AcMNPV-Pr55Gag, a fin de analizar la sensibilidad del mutante GagA364V a 16 en términos de ensamblaje y germinación de VLP a partir de células que expresan GagA364V.

Inesperadamente, sin embargo, se descubrió que el mutante GagA364V fue inestable: los análisis de SDS-PAGE y de transferencia Western de los lisados de células que expresan GagA364V mostraron que las proteínas que reaccionan con el anticuerpo anti-Gag consistieron en una banda apenas visible a 55 kDa, la masa molecular de Pr55Gag de WT sin escindir, y una banda principal a 41 kDa. La especie Pr41Gag correspondió a los dominios de MA-CA, puesto que reaccionó con anticuerpos monoclonales tanto anti-MA como anti-CA. Se sabe que la supresión de los dominios de NC y p6 en Pr41Gag es perjudicial para el ensamblaje de VLP [1]. El análisis mediante EM de células que expresan GagA364V confirmó el patrón de la proteína Gag: se observaron VLP muy raras en el proceso de ensamblaje y germinación en la membrana plasmática o en vesículas citoplásmicas. El mutante GagA364V se verificó mediante secuenciación del ADN, que mostró la ausencia de codón de parada accidental en el extremo C-terminal del dominio de CA que podría explicar la aparición de la especie Pr41Gag. Los datos insinúan que se produjo una escisión prematura en o cerca de la unión de CA-SP1 de la poliproteína mutante GagA364V. Las proteasas de la célula hospedante fueron responsables de esta escisión, puesto que la PR del VIH-1 estaba ausente de nuestro sistema de expresión. La inestabilidad de GagA364V no nos permitió estudiar la posible influencia de la mutación Ala a Val en la posición 1 del dominio de SP1 en la inhibición del ensamblaje de VLP mediada por 16.

#### Reticulación química de Pr55Gag en células tratadas con 16 y células no tratadas.

Para analizar adicionalmente el mecanismo del efecto de 16 sobre el ensamblaje de la poliproteína Gag, se incubaron células Sf9 que expresan Pr55Gag, no tratadas y tratadas con 16 (10  $\mu\text{g/ml}$ ), con cantidades crecientes del reticulador químico BS3 a 48 h pi durante 30 min. a temperatura ambiente, y después se lisaron en medio hipotónico en presencia de BS3 usado en el mismo intervalo de concentraciones. El estado oligomérico de las proteínas Gag se evaluó mediante análisis de SDS-PAGE y transferencia Western, usando anticuerpo anti-Gag, anticuerpo complementario marcado con peroxidasa, y quimioluminiscencia potenciada (ECL). En muestras de control, no reticuladas, la proporción de Pr41Gag (el producto de escisión espontánea principal de Pr55Gag) fue mayor en células tratadas con 16 en comparación con células no tratadas. Esto sugirió que 16 modificó la conformación de Pr55Gag, y la hizo más sensible a proteasas celulares. En muestras reticuladas sin tratamiento con 16, la banda de monómeros de Pr55Gag disminuyó rápidamente a concentraciones de BS3 mayores que 10 mM de BS3, y de una manera dependiente de la dosis. La disminución fue menos pronunciada en muestras tratadas con 16. También se observaron diferencias en el patrón de los oligómeros de Pr55Gag entre células no tratadas y células tratadas con 16, como se evidencia en sobreexposiciones y agrandamientos de los luminogramas de las transferencias Western. Una banda discreta de proteína que reacciona con anti-Gag, que migra con una masa molecular aparente de 140-150 kDa y compatible con el estado de trímeros de Gag, se detectó a una concentración entre 2 y 10 mM de BS3 en muestras de control. Esta banda desapareció a concentraciones mayores de BS3, mientras que, paralelamente, el material que reacciona con anti-Gag de masa molecular elevada se hizo visible como una mancha dentro del gel espaciador o los pocillos de carga. Sin embargo, en muestras tratadas con 16, la banda de trímeros de Gag putativos alcanzó progresivamente un máximo a 25 mM de BS3, y todavía era detectable hasta 50 mM. Esto sugirió que 16 favoreció la aparición y/o la estabilidad y persistencia de trímeros de Gag, frente a oligómeros de mayor orden, en comparación con muestras de control. El patrón de reticulación de Gag *in situ* confirmó nuestra observación mediante EM, e indicó que el estado de oligomerización de Gag y el modo del ensamblaje de las partículas fueron diferentes en células no tratadas y en células tratadas con 16.

#### **Referencias:**

1. Carrière C, Gay B, Chazal N, Morin N, Boulanger P (1995) Sequence requirement for encapsidation of deletion mutants and chimeras of human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor into retrovirus-like particles. *J Virol* 69: 2366-2377.
2. Chazal N, Carrière C, Gay B, Boulanger P (1994) Phenotypic characterization of insertion mutants of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor expressed in recombinant baculovirus-infected cells. *J*

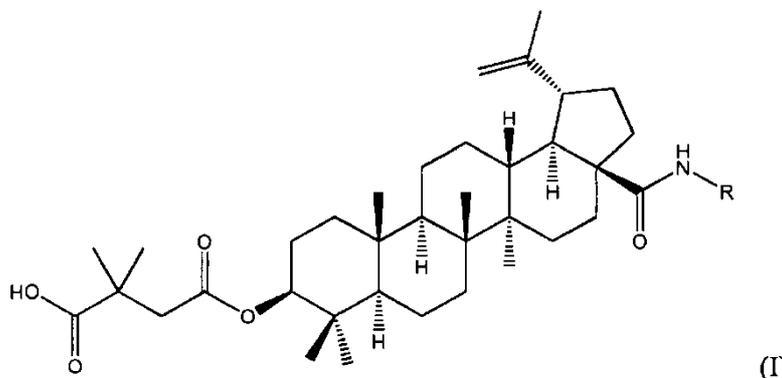
Viol 68: 111-122.

3. Gay B, Tournier J, Chazal N, Carrière C, Boulanger P (1998) Morphopoietic determinants of HIV-1 GAG particles assembled in baculovirus-infected cells. *Virology* 247: 160-169.
4. Aiken C, Chen CH (2005) Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals. *Trends Mol Med* 11: 31-36.
5. Yao XJ, Rougeau N, Duisit G, Lemay J, Cohen EA (2004) Analysis of HIV-1 Vpr determinants responsible for cell growth arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *Retrovirology* 1: 21.
6. Selig L, Pages J-C, Tanchou V, Prévéral S, Berlioz-Torrent C, *et al.* (1999) Interaction with the p6 domain of the Gag precursor mediates incorporation into virions of Vpr and Vpx proteins from primate lentiviruses. *J Virol* 73: 592-600.
7. Muriaux D, Mirro J, Harvin D, Rein A (2001) RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5246-5251.
8. DaFonseca S, Blommaert A, Coric P, Hong SS, Bouaziz S, *et al.* (2007) The 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl) derivative of betulinic acid (DSB) inhibits the assembly of virus-like particles in HIV-1 Gag precursor-expressing cells. *Antiviral Ther* 12: 1185-1203.
9. Huvent I, Hong SS, Fournier C, Gay B, Tournier J, *et al.* (1998) Interaction and co-encapsidation of HIV-1 Vif and Gag recombinant proteins. *J Gen Virol* 79: 1069-1081.
10. Hong SS, Karayan L, Tournier J, Curiel DT, Boulanger PA (1997) Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *EMBO J* 16: 2294-2306.
11. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
12. Knoller S, Shpungin S, Pick E (1991) The membrane-associated component of the amphiphile-activated, cytosol-dependent superoxide-forming NADPH oxidase of macrophages is identical to cytochrome b559. *J Biol Chem* 266: 2795-2804.
13. Müller B, Tessmer U, Schubert U, Kräusslich H-G (2000) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein is incorporated into the virion in significantly smaller amounts than Gag and is phosphorylated in infected cells. *J Virol* 74: 9727-9731.
14. Turcaud S, Chazal N, Coric P, Souquet F, Briand L, *et al.* (2011) Synthesis of new derivatives of Bevirimat, showing a higher activity against HIV-1 maturation. *J Med Chem*, submitted.
15. Wilk T, Gross I, Gowen BE, Rutten T, de Haas F, *et al.* (2001) Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 75: 759-771.

45

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la fórmula (I) siguiente:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un estereoisómero o una mezcla de estereoisómero en cualquier proporción, en particular una mezcla de enantiómeros, y particularmente una mezcla de racemato,

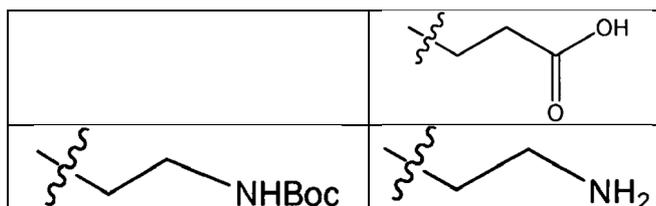
10 en el que R representa un grupo  $-(CHR^2)-(CHR^3)_n-X$ , en el que:

- n representa 1,
- X representa un grupo COOH o  $NHR^1$ , representando  $R^1$  un átomo de hidrógeno o un grupo -Alk, -C(O)-Alk o -C(O)O-Alk, representando Alk un grupo alquilo ( $C_1-C_6$ ), y
- $R^2$  y  $R^3$  representan, independientemente entre sí, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo ( $C_1-C_8$ ), preferentemente un grupo alquilo ( $C_1-C_4$ ), opcionalmente sustituido con un grupo COOH o  $NHR^1$ , representando preferentemente por lo menos  $R^2$  y  $R^3$  un átomo de hidrógeno

2. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que  $R^1$  representa un átomo de hidrógeno o un grupo -C(O)O-Alk, en particular un átomo de hidrógeno o un grupo *tert*-butiloxicarbonilo.

3. Compuesto según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que R se selecciona de entre los grupos siguientes:

25



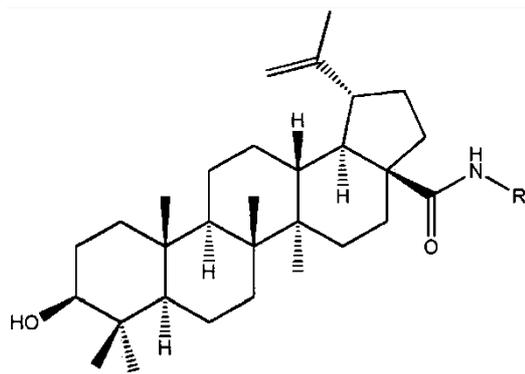
4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, como un medicamento.

30 5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su utilización en el tratamiento de una infección con un retrovirus, tal como el VIH, en particular el VIH-1.

6. Composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y por lo menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 7. Procedimiento para preparar un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las etapas sucesivas siguientes:

(i) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (II) siguiente:



en el que R representa un grupo  $-(CHR^2)-(CHR^3)_n-X$ , en el que:

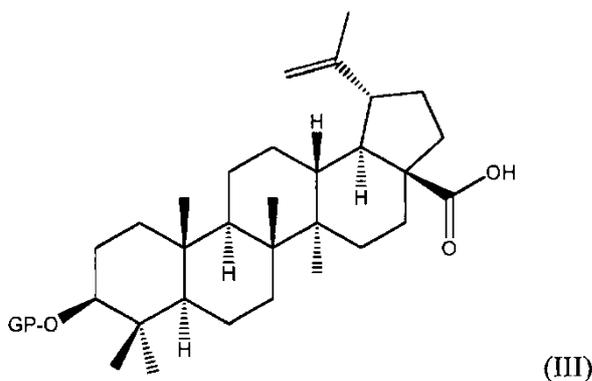
- 5
- n representa 1,
  - X representa un grupo COOH o  $NHR^1$ , representando  $R^1$  un grupo -Alk, -C(O)-Alk o -C(O)O-Alk, representando Alk un grupo alquilo ( $C_1-C_6$ ), y
  - 10 -  $R^2$  y  $R^3$  representan, independientemente entre sí, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo ( $C_1-C_8$ ), preferentemente un grupo alquilo ( $C_1-C_4$ ), opcionalmente sustituido con un grupo COOH o  $NHR^1$ ,

con anhídrido 2,2-dimetilsuccínico, y

- 15 (ii) opcionalmente, cuando R comprende un grupo  $NHR^1$ , desproteger este grupo  $NHR^1$  para producir un grupo  $NH_2$ .

8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que el compuesto de fórmula (II) se prepara según las etapas sucesivas siguientes:

- 20 (a) acoplar un compuesto de fórmula (III)



25 en el que GP representa un grupo O-protector tal como un grupo acetilo,

con una amina de la (IV) siguiente:



en la que  $R^4$  representa un grupo  $-(CHR^2)-(CHR^3)_n-X$ , en el que:

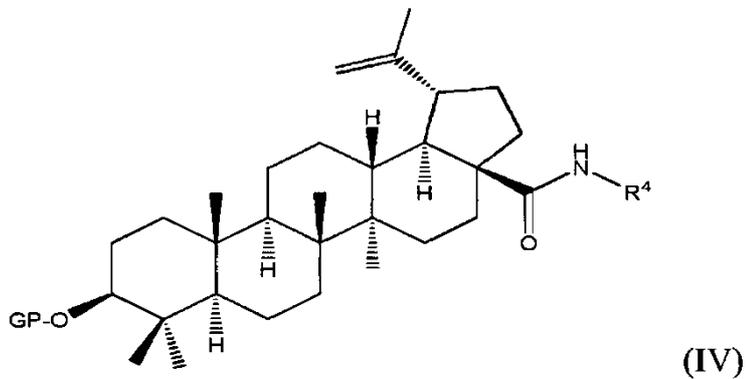
- n representa 1,
- 35 - X representa un grupo  $COO-Alk^1$  o  $NHR^1$ , representando  $R^1$  un grupo -Alk, -C(O)-Alk o -C(O)O-Alk, representando Alk y  $Alk^1$ , independientemente entre sí un grupo alquilo ( $C_1-C_6$ ), y
- $R^2$  y  $R^3$  representan, independientemente entre sí, un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo ( $C_1-C_8$ ), preferentemente un grupo alquilo ( $C_1-C_4$ ), opcionalmente sustituido con un grupo  $COO-Alk^1$  o  $NHR^1$ ,

40

representando  $R^1$  un grupo -Alk, -C(O)-Alk o -C(O)O-Alk, representando Alk y  $Alk^1$ , independientemente entre sí, un grupo alquilo ( $C_1-C_6$ ),

para producir un compuesto de la fórmula (IV) siguiente:

5



en el que  $R^4$  y GP son como se definen anteriormente, y

- 10 (b) desproteger el grupo hidroxilo y, cuando resulte apropiado, el grupo -COO- $Alk^1$  del compuesto de fórmula (IV) obtenido en la etapa (a) previa para producir un compuesto de fórmula (II).

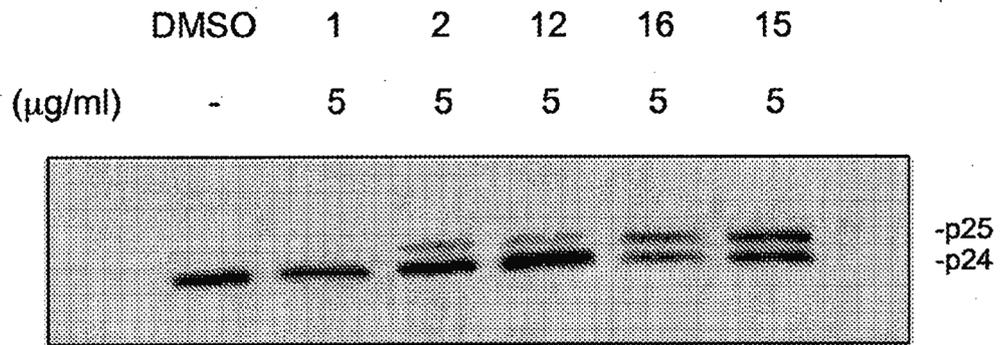


Figura 1

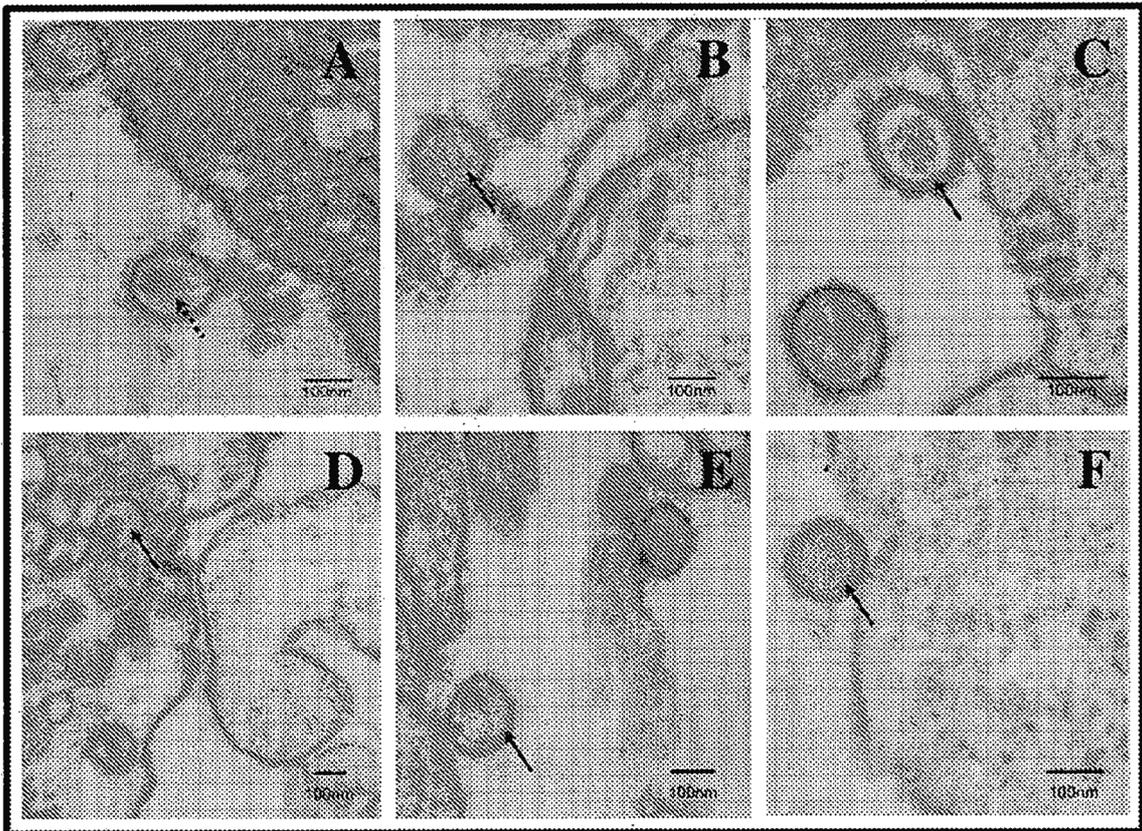


Figura 2

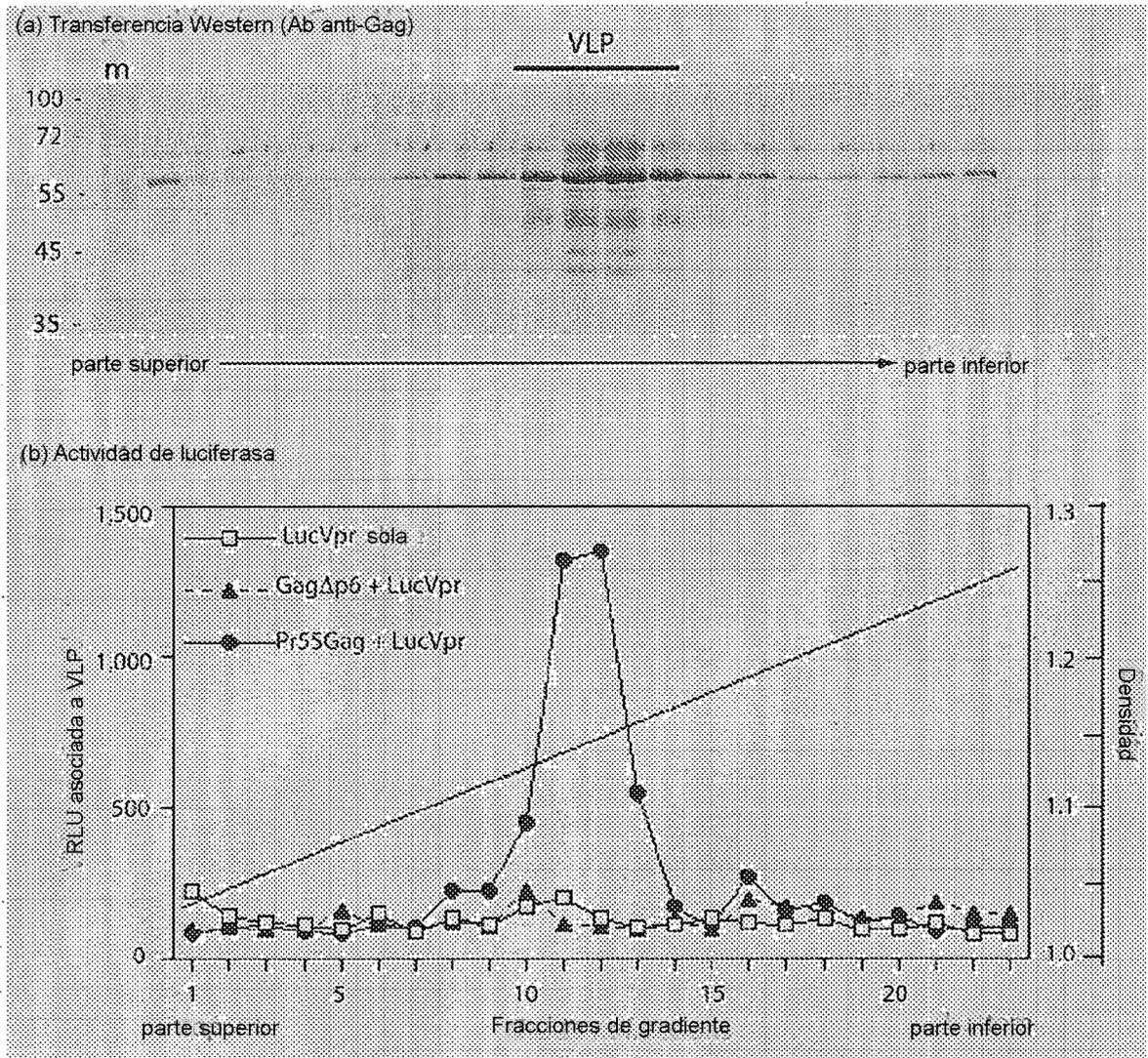


Figura 3

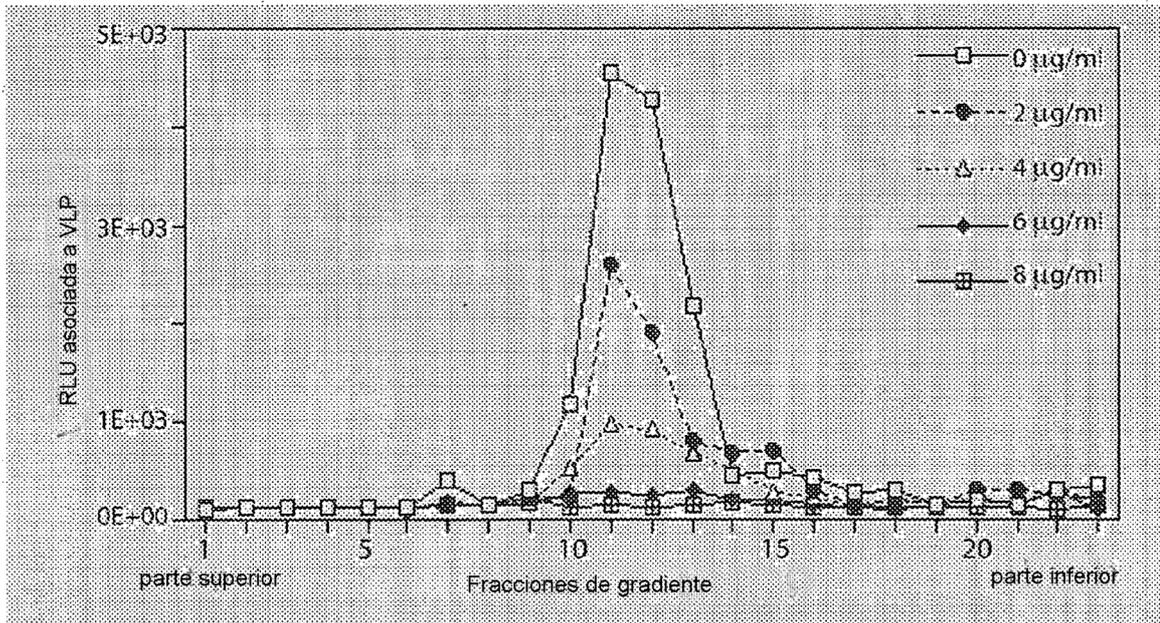


Figura 4

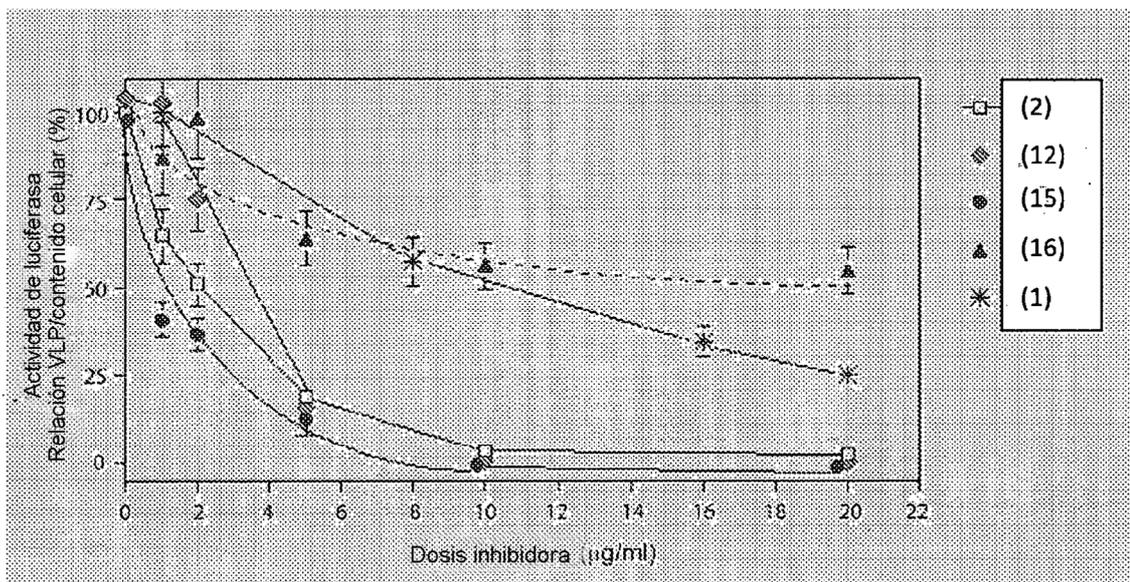


Figura 5