

PROTEASES VIRAIS: IMPORTANTES ALVOS TERAPÊUTICOS DE COMPOSTOS PEPTIDOMIMÉTICOS

Estela Maris Freitas Muri*

Departamento de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Rua Mario Viana 523, Santa Rosa, 24241-000 Niterói – RJ, Brasil

Recebido em 23/04/2013; aceito em 30/09/2013; publicado na web em 24/10/2013

VIRAL PROTEASES: IMPORTANT TARGETS OF PEPTIDOMIMETIC COMPOUNDS. Proteases catalyze the hydrolysis of peptide bonds of proteins and peptides to produce smaller peptides and free amino acids. These enzymes are involved in physiologic processes such as blood coagulation and cellular death, and are related to life cycle of several viruses, such as hepatitis C, dengue, and AIDS. These features make most of proteases very important therapeutic targets for new pharmaceutical compounds. The development of peptidomimetics with improved pharmacokinetic properties is driving extensive research in the field of viral protease inhibitors. The present paper aims to highlight the design and synthesis of peptidomimetics that are able to inhibit viral proteases related to hepatitis C, dengue, and AIDS.

Keywords: viral proteases; peptidomimetics; inhibitors.

INTRODUÇÃO

Proteases representam uma classe de enzimas com importantes papéis em processos fisiológicos.¹ Além disso, elas possuem aplicação comercial, estando entre os três maiores grupos de enzimas industriais, sendo responsáveis por 60% da venda internacional de enzimas.²

Estas enzimas estão envolvidas em processos biológicos essenciais, como a coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos, entre outros.³ Várias etapas proteolíticas importantes ocorrem no mecanismo invasivo de tumores,⁴ assim como no ciclo de infecção de um grande número de vírus e microrganismos patogênicos.⁵ Estes fatos tornam as proteases um alvo quimioterápico valioso para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos.

Tradicionalmente as proteases ou peptidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas presentes em proteínas ou peptídeos, liberando peptídeos de tamanho variável ou aminoácidos livres.⁶ Na nomenclatura internacional de classificação de enzimas (EC), as peptidases pertencem à classe 3 e subclasse 3.4, que ainda está dividida em dois grandes grupos: as exo e as endopeptidases.⁷ As exopeptidases catalisam a quebra das ligações peptídicas nas extremidades N ou C terminal das cadeias polipeptídicas e, assim, podem ser denominadas de aminopeptidases ou carboxipeptidases, respectivamente. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas.⁸

As proteases podem ser classificadas também quanto à natureza química do sítio catalítico/mecanismo de ação, são elas: i) serina proteases; ii) cisteína proteases; iii) aspártico proteases; iv) treonina protease e v) metaloproteases. Cada classe de proteases tem seu conjunto particular de aminoácidos no sítio ativo. As serina proteases apresentam a tríade catalítica composta por Ser, His e Asp, as cisteína proteases mostram os aminoácidos Cys, Asp e His, as aspártico proteases, Asp e Asp e as metaloproteases apresentam um íon metálico no sítio ativo.⁹

As proteases se ligam de maneira específica ao substrato e este modo de ligação é representado pelo sistema de nomenclatura descrito por Schechter e Berger.¹⁰ De acordo com este sistema, os resíduos de aminoácidos (ou cadeias laterais) do substrato são nomeados da

terminação N para a C, como: $P_n, \dots, P_3, P_2, P_1, P_1', P_2', P_3', \dots, P_n'$ e os correspondentes sítios de ligação da enzima são nomeados como: $S_n, \dots, S_3, S_2, S_1, S_1', S_2', S_3', \dots, S_n'$ (Figura 1). A hidrólise da ligação peptídica ocorre entre P_1 e P_1' e a ligação é chamada “ligação cindível ou hidrolisável”. A numeração dos resíduos é também dada a partir da ligação cindível e o resíduo P_1 do substrato é chamado de resíduo de especificidade primária.¹⁰

A participação crucial de proteases nos ciclos de replicação de diversos vírus é hoje amplamente reconhecida, levando ao interesse de grandes indústrias farmacêuticas no desenvolvimento de inibidores destas enzimas.¹¹

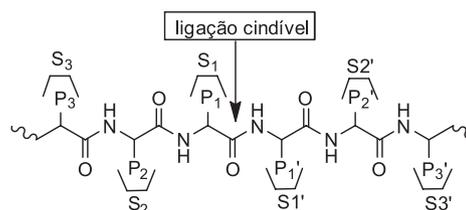


Figura 1. Sistema de nomenclatura de Schechter e Berger

DENGUE

A dengue é uma das doenças tropicais mais difundidas no mundo. A cada ano, cem milhões de pessoas infectam-se com o vírus da dengue (também chamado de DENV), principalmente nas cidades e zonas urbanas tropicais, enquanto cerca de 2,5 bilhões de pessoas sofrem com o risco de infecção.¹²

A dengue é uma doença febril aguda, que pode ser de curso benigno ou grave, dependendo da forma como se apresenta: infecção inaparente, dengue clássica (DC), febre hemorrágica da dengue (FHD) ou síndrome do choque da dengue (SCD). O vírus da dengue (do tipo RNA) é um arbovírus, com quatro sorotipos conhecidos, 1, 2, 3 e 4, sendo que a infecção com um deles não confere imunidade à infecção pelo outro.¹³

Grandes esforços estão sendo feitos ao redor do mundo para o desenvolvimento de vacinas e fármacos contra o DENV. Desde a década de 1970, a Organização Mundial de Saúde (OMS) tem patrocinado diversos estudos que ampliam os conhecimentos sobre a imunidade dos sorotipos e a fisiopatologia da FHD/SCD, que são

*e-mail: estelamuri@yahoo.com.br

essenciais para o desenvolvimento de vacinas seguras e efetivas contra a dengue. Existem várias dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra o DENV, mas o principal problema é que a infecção por um sorotipo não confere imunidade contra os demais, ou seja, há necessidade de uma vacina tetravalente, dificultando o seu desenvolvimento.¹⁴ Outro problema é a falta de um modelo animal para testes de efetividade das vacinas. Embora os modelos mais utilizados, ratos e macacos, sejam infectados pelo DENV, esses animais não apresentam uma patologia semelhante à dos humanos, elevando assim os custos das pesquisas devido à dificuldade para se avaliar a proteção vacinal.¹⁵ Devido à ausência de uma vacina ou droga eficaz contra o DENV, o tratamento utilizado até o momento é sintomático contra a febre e a reposição de fluido plasmático devido ao extravasamento dos capilares nos pacientes com FHD e SCD.¹⁶

O ssRNA (RNA fita simples) do DENV codifica, além de diversas proteínas estruturais (C, E, prM), 7 proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Essas proteínas são extremamente importantes para a formação do complexo de replicação viral. Além disso, duas regiões não traduzidas (NTR) presentes em cada extremidade dos genomas são importantes para as etapas de tradução e transcrição do genoma RNA.¹⁷

O primeiro evento de infecção do DENV na célula hospedeira consiste na tradução do RNA genômico em uma poliproteína. Com o processamento desta poliproteína viral, proteases da célula hospedeira e viral são recrutadas. Para hidrólise das ligações peptídicas da poliproteína na junção entre C-prM, prM-E, E-NS1 e NS4A-NS4B é utilizada a peptidase sinalase encontrada no retículo endoplasmático (RE) das células hospedeiras, e para hidrólise das ligações peptídicas na junção entre NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A e NS4B-NS5 é utilizada a serina protease viral NS3. Já a hidrólise na junção NS1-NS2A ocorre pela ação de uma protease ainda desconhecida localizada no RE.^{18,19}

A atividade serina protease na porção N-terminal da proteína NS3 dos flavivírus foi primeiramente proposta por Bazan e Fletterick²⁰ e Gorbalenya e colaboradores.²¹ Em 1993, Falgout e colaboradores demonstraram que a atividade proteolítica da NS3 era dependente da proteína NS2B composta de 40 resíduos que funciona como cofator essencial para atividade catalítica. A NS3 protease do DENV, responsável por hidrólise de ligações peptídicas, é considerada essencial ao processo de replicação e maturação do vírus da dengue. De acordo com a literatura, a NS3 protease é estruturalmente semelhante à tripsina e apresenta no seu sítio catalítico a tríade: His51 - Asp75 - Ser135.²²

Hepatite C

A hepatite é uma doença inflamatória que compromete os hepatócitos cuja evolução pode ser de portador assintomático até cirrose e carcinoma hepatocelular. Ela pode ser classificada como viral (causada por vírus), tóxica (causada pela reação ao álcool, drogas ou medicamentos) ou auto-imune, condição na qual ocorre a ação de células citotóxicas sobre o tecido hepático.

Em 1989, o vírus da hepatite C (HCV) foi reconhecido como agente infeccioso responsável por formas adquiridas de hepatites diferentes de A e B, chamada então de hepatite C, sendo hoje considerada uma doença silenciosa que infecta cerca de 3 milhões de indivíduos somente no Brasil.²³

O tratamento da hepatite C tem como objetivo a supressão sustentada da replicação do vírus, prevenindo a progressão da doença.²⁴ O uso da terapia combinada, interferon-alfa (IFN-alfa) e ribavirina (RBV), trouxe melhores taxas de resposta viral sustentada em comparação com a monoterapia com IFN, introduzida nos anos 90.²⁵

Em pacientes com HCV genótipo 1, o tratamento ideal é realizado com IFN peguilaço (PEG-IFN) e RBV e nos pacientes com

HCV genótipos 2 e 3, o tratamento pode ser realizado com IFN convencional e RBV. O processo de peguilaço do IFN envolve a adição de polietilenoglicol (PEG), produzindo o PEG-IFN, o qual apresenta uma absorção e eliminação mais lentas, permitindo que seja administrado uma vez por semana, em vez de três vezes, como ocorre com o IFN convencional.²³

O ssRNA (RNA fita simples) do HCV codifica diversas proteínas estruturais (C, E1, E2 e p7) e seis proteínas não-estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B).^{26,27} O ciclo do HCV é semelhante ao do DENV, ou seja, após a liberação do RNA viral no citoplasma, o mesmo é traduzido em uma grande poliproteína precursora que se insere na membrana do RE. Nesta etapa ocorre a clivagem desta poliproteína pelas proteases do hospedeiro e pelas proteases virais NS2 e NS3/4A.²⁸

A estrutura tridimensional do domínio NS3 protease do HCV, elucidada por cristalografia de raios-X, mostrou que ela possui dois subdomínios em folhas- β formando um barril típico de uma serina protease do tipo quimotripsina. Ela apresenta uma fenda de interação ao substrato localizada entre os subdomínios, importante para atividade proteolítica. Para que o processamento seja eficaz, a protease NS3 necessita de um cofator, o polipeptídeo NS4A, que é uma pequena proteína na qual alguns dos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos que o compõem têm a função de ancorar o complexo enzimático na membrana exterior do RE.²⁹ A NS3/4A apresenta no seu sítio catalítico a tríade formada por His57 - Asp81 - Ser139.^{30,31}

AIDS

Desde os primeiros casos descritos em 1981 (EUA), a AIDS espalha-se em sucessivas ondas de infecção por todas as regiões do globo, apesar dos rápidos avanços científicos que foram alcançados.³²

A infecção pelo HIV resulta em uma doença crônica e progressiva que pode levar à destruição do sistema imunológico. A evolução da doença é caracterizada por uma elevada taxa de replicação viral, que leva à emergência de variantes virais mais virulentas.³² Até o momento, já foram descritos dois tipos de vírus: HIV-1 e HIV-2, sendo o HIV-1 o mais virulento e disseminado pelo mundo. Este apresenta elevada variabilidade genética denominada *quasispecies*, no qual o vírus é considerado como subpopulações e não um genoma único cuja variabilidade está em torno de 6%, podendo chegar a 50% entre indivíduos de regiões geográficas diferentes. Já o HIV-2 parece ser menos patogênico e é encontrado, quase que exclusivamente, no oeste da África.³²

O HIV pertence ao grupo dos retrovírus citopáticos e não-oncogênicos, o qual necessita, para se multiplicar, de uma enzima denominada transcriptase reversa. Esta enzima é responsável pela transcrição do RNA viral em uma cópia de DNA, que pode, então, integrar-se ao genoma do hospedeiro, através da enzima integrase. Possui também uma enzima chamada de HIV protease, fundamental para a quebra de unidades proteicas em pequenas moléculas, permitindo uma montagem viral perfeita.^{33,34}

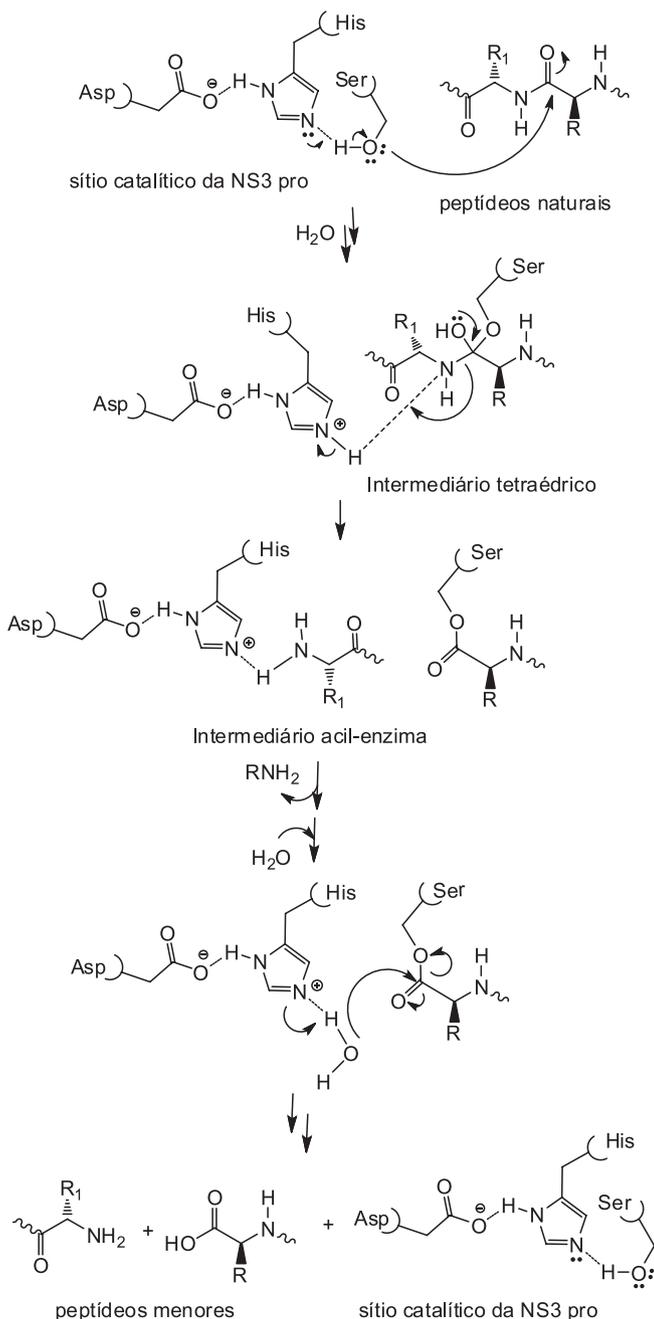
A protease do HIV-1 é responsável pela clivagem das proteínas precursoras em proteínas estruturais e enzimas que tem um papel essencial na replicação e maturação viral. Ela é um homodímero constituído de 2 monômeros com 99 resíduos cada, sendo seu sítio catalítico formado pela tríade catalítica: Asp-25, Thr-26 e Gli-27.³⁵

MECANISMO CATALÍTICO DA SERINA PROTEASE

Dentre os diversos tipos de proteases, as serina proteases são, provavelmente, as mais cuidadosamente investigadas. Estas enzimas empregam a catálise ácido-básica geral e a catálise covalente para a

sua ação, onde o mecanismo catalítico inicia-se na tríade catalítica característica, His⁵⁷-Asp⁸¹-Ser¹³⁹, que está localizada no sítio ativo da enzima (Esquema 1).³⁶

A tríade é uma estrutura coordenada que consiste de três aminoácidos: histidina, aspartato e serina, onde cada aminoácido desempenha uma tarefa específica no processo de catálise. A cadeia lateral da Ser¹³⁹ (-CH₂-OH) é ativada por uma catálise básica mediada por Asp⁸¹ e His⁵⁷ através de interações por ligação hidrogênio (numeração dos resíduos referente à serina protease do HCV). A Ser do sítio ativo (nucleófilo ativado) ataca, então, a ligação amídica do substrato polipeptídico, formando um intermediário oxianión tetraédrico. Este intermediário se rompe pela eficiente transferência de próton da His para formar uma amina e um intermediário acil-enzima. A liberação da porção N-terminal e a introdução de uma molécula de H₂O levam ao ataque da carboxila do substrato, formando o fragmento C-terminal do substrato e regenerando a enzima (Esquema 1).³⁶



Esquema 1. Mecanismo catalítico da serina protease

MECANISMO CATALÍTICO DA ASPARTIL PROTEASE

Acredita-se que o mecanismo de ação das aspartil proteases também ocorra via catálise ácido-base. Os resíduos Asp 25 e Asp 25' são responsáveis por catalisar a hidrólise das ligações peptídicas. Um resíduo aspartil auxilia na adição de uma molécula de água à carbonila da amida do substrato, formando um intermediário tetraédrico que possui grande afinidade pelo sítio catalítico. Após a formação deste intermediário, ocorre a quebra da ligação C-N com a formação de um ácido carboxílico e uma amina primária.³⁷

PEPTÍDEOS E PEPTIDEOMIMÉTICOS

Embora muitos peptídeos naturais possuam propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas que permitam seu uso terapêutico, isto não é um fenômeno comum nesta classe de compostos. A baixa estabilidade química, a reduzida biodisponibilidade e a suscetibilidade frente a proteases limitam o uso destes peptídeos na clínica médica.³⁸ Outro problema que se adiciona a estes já descritos é a flexibilidade conformacional de fragmentos proteicos, os que atuam via interação com uma proteína receptora podem assumir estruturas tridimensionais de baixa afinidade pela mesma.

Uma alternativa ao uso dos peptídeos naturais é o desenvolvimento de compostos peptideomiméticos, os quais são estruturalmente semelhantes ao peptídeo natural, mas que tiveram suas estruturas modificadas de forma a conferir propriedades farmacológicas mais específicas e maior seletividade por um determinado sítio receptor.³⁹ Entretanto, para o planejamento de um peptideomimético é necessário compreender o papel desempenhado por seus diversos componentes estruturais.⁴⁰ A afinidade pelo receptor, por exemplo, encontra-se fortemente associada às cadeias laterais dos aminoácidos do peptideomimético, que interagem com grupamentos de caráter complementar na estrutura do receptor através de interações de natureza eletrostática, como ligações hidrogênio, dipolo-dipolo e forças de Van der Waals.⁴¹ Desta forma, o esqueleto básico de todo peptídeo, constituído por ligações amídicas (peptídicas) intercaladas por uma unidade metilênica ou metínica, pode ser alterado dando origem ao peptideomimético, desde que mantendo as cadeias laterais nas posições adequadas para a interação com o receptor. A substituição de ligações peptídicas por outras química e enzimaticamente mais estáveis irá conferir maior resistência frente a proteases, o que é crucial para o desenho de inibidores enzimáticos.^{42,43}

PEPTIDEOMIMÉTICOS INIBIDORES DE PROTEASES

Protease do DENV

Poucos inibidores da NS3 protease do vírus da dengue de natureza peptideomimética têm sido descritos na literatura, dentre eles está a aprotinina (um antifibrinolítico natural), um inibidor padrão de proteases incluindo tripsina, quimotripsina, plasmina, ativador tissular do plasminogênio e caliceína tissular e plasmática. A aprotinina apresentou um IC₅₀=65nM contra serina protease recombinante do DENV-2.⁴⁴

Algumas estratégias têm sido empregadas na pesquisa de inibidores da NS3/NS2B protease do DENV com vários graus de sucesso, dentre elas a síntese racionalmente planejada de peptideomiméticos e ciclopeptídeos,⁴⁵ *screening* virtual baseado na estrutura, *screening* de produtos naturais, entre outros.⁴⁶ Entretanto, somente poucos inibidores peptideomiméticos e compostos estruturalmente pequenos são descritos.⁴⁷

Na estratégia de síntese racionalmente planejada de peptideomiméticos, Yin e colaboradores descreveram o composto do tipo

aldeído **1** (Figura 2), o qual mostrou ser um inibidor reversível e competitivo, com um K_i de inibição igual a 5,8 μM contra a NS3 protease do DENV-2.⁴⁸ Um estudo de relação estrutura-atividade (SAR) foi realizado na tentativa de encontrar novos inibidores.⁴⁹ Neste estudo, o composto **1** serviu de protótipo para o entendimento das interações farmacofóricas inibidor-enzima e desenvolvimento de novas moléculas peptidomiméticas, as quais vieram a confirmar a preferência da enzima por resíduos básicos de Arg na porção terminal, especialmente na posição P_2 . Como resultado dos estudos de SAR obteve-se o tripeptídeo **2**, mais ativo, mostrando um $K_i=1,5\mu\text{M}$ (Figura 2).^{50,48}

Apesar de existirem vários métodos para a síntese em solução de peptídeos modificados em sua estrutura original,⁵¹ metodologias sintéticas em fase sólida (*solid-phase peptide synthesis*-SPPS), idealizadas por Bruce Merrifield na década de 1960, tornaram-se bastante atrativas. Através desta metodologia, peptídeos ou peptidomiméticos podem ser sintetizados pela fixação de um aminoácido a um suporte polimérico, seguida por uma sequência de reações sobre este aminoácido inicial, de forma a construir uma cadeia peptídica. A fixação à matriz polimérica permite reduzir o número de etapas de purificação no processo, aumentando assim o rendimento final do peptídeo desejado, além de permitir a automação do processo, o que possibilita a construção de uma biblioteca de compostos a serem testados através de *high-throughput screening*.⁵²

Devido a essas vantagens a série de compostos do tipo aldeído, incluindo o composto **1** mostrado acima, foi sintetizada em fase sólida utilizando a resina de Weinreb. Nesse método, a função aldeído foi liberada na última etapa, após a remoção em meio ácido do grupo protetor na cadeia lateral, minimizando a condensação entre a cadeia lateral guanidina da arginina e a função aldeído, que formaria um composto deidro cíclico inativo.⁵³

Na estratégia de *screening* virtual baseado na estrutura, um recente estudo de modelagem molecular realizado por Freceer e Miertus⁵⁴ utilizou-se de técnicas combinatórias para desenhar uma biblioteca de compostos peptidomiméticos utilizando a estrutura 3D da NS3/NS2B protease do DENV. Esta biblioteca virtual, composta por mais de 9.200 derivados desenhados tendo como modelo o aldeído **1** e resíduos de aminoácidos não naturais nas posições P_1 à P_4 , foi testada *in silico*. O composto **3** (Figura 2), considerado o mais promissor da busca virtual realizada, apresentou um K_i cerca de 50 vezes menor ($K_i^{\text{pre}}=0,1\mu\text{M}$) do que o composto modelo **1** e foi analisado em termos de interação enzima-inibidor e propriedades físico-químicas relacionadas a adsorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME).

Apesar de alguns inibidores já terem sido descritos na literatura com valores de IC_{50} em uma faixa menor que micromolar, as indesejadas características físico-químicas e alta toxicidade dos mesmos não permitiram posterior desenvolvimento.

O planejamento racional de inibidores específicos da NS3/NS2B protease do DENV tem se mostrado bastante difícil, devido à relativa planaridade do sítio ativo da enzima, fato que requer uma mudança conformacional substancial do fragmento NS2B, cuja estrutura tornou-se disponível muito recentemente, para que ocorra a ligação de um inibidor.⁵⁵

Protease do HCV

Desde a sua identificação em 1993, a serina protease NS3/4A do HCV tem sido alvo de intensos estudos para a descoberta de inibidores seletivos e potentes para a terapia de pacientes com hepatite C. O sucesso do desenvolvimento de inibidores da HIV protease demonstra que proteases virais podem ser excelentes alvos para o desenho de novas drogas baseadas na estrutura química.^{56,57} Entretanto, no caso da serina protease do HCV, a busca por pequenas moléculas, potentes,

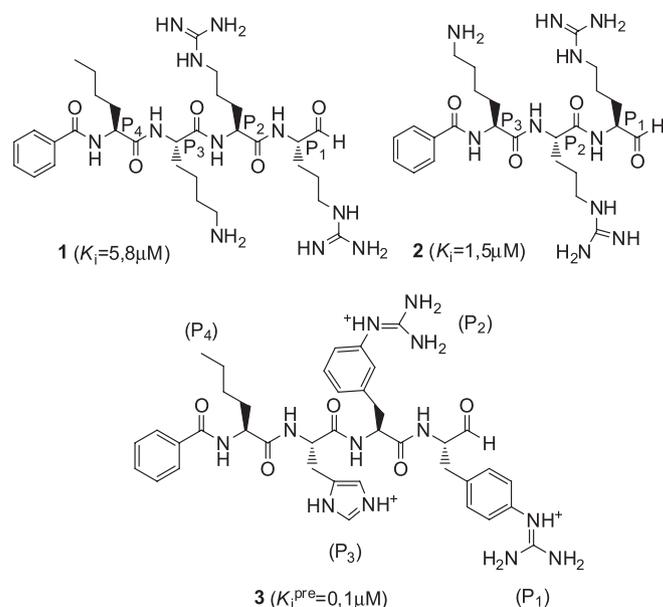


Figura 2. Peptidomiméticos derivados de aldeído como inibidores da NS3/NS2B protease do DENV

seletivas, que sejam bioativas por via oral, tem sido parcialmente dificultada pelo fato do sítio da ligação ao substrato ser razoavelmente plano e marcadamente hidrofóbico. Mesmo assim, progressos significantes têm sido feitos nos últimos anos para a identificação de novos inibidores da serina protease NS3/4A.²⁸

Inibidores não-covalentes

Inibidores peptídicos lineares

Estudos iniciais na busca por um inibidor potente de HCV protease utilizaram a estratégia de planejamento de drogas baseada na estrutura. Esta estratégia originou-se a partir da inibição significativa da enzima pelos produtos peptídicos que são liberados da clivagem enzimática de vários substratos.⁴⁸ Desta forma, foram desenvolvidos diversos inibidores peptídicos e peptidomiméticos, como por exemplo, o hexapeptídeo **4**, o qual apresentou um $K_i=0,04\mu\text{M}$. Tendo **4** como protótipo, outras estruturas menores e menos carregadas foram obtidas, tal como o composto tripeptídico **5** com um $K_i=0,6\mu\text{M}$ (Figura 3).⁴⁸

Inibidores peptídicos macrocíclicos

Vários métodos de *despeptidização* têm sido usados na tentativa de melhorar o perfil farmacocinético de inibidores peptídicos, tais como o uso de aminoácidos não-naturais, uso de isómeros peptídicos e a macrociclização.³⁰ Os macrociclos, com estrutura e tamanho de anéis apropriados, podem se ligar mais fortemente a uma enzima de uma maneira rígida e pré-organizada, além de serem menos suscetíveis à hidrólise por proteases.⁵⁸

A estrutura de raios-X da NS3 protease revelou que as porções S_1 e S_3 estão bem próximas. Assim, pela ciclização dos resíduos P_1 e P_3 dos inibidores peptídicos (ex. o composto **6**, figura 3), vários inibidores macrocíclicos foram obtidos, os quais apresentaram bons perfis pré-clínicos levando-os aos testes clínicos. O ciluprevir (**7**) (BILN 2061 - Boehringer Ingelheim), um macrociclo de 15 membros, foi o primeiro composto inibidor de protease do HCV a entrar em testes clínicos (Figura 3). Os primeiros resultados foram promissores, mostrando um declínio rápido da carga viral plasmática em todos os pacientes com HCV genótipo 1 tratados, mas resultados subsequentes apresentaram certa toxicidade cardíaca em altas doses, além da baixa eficácia contra os genótipos 2 e 3, assim foi retirado de

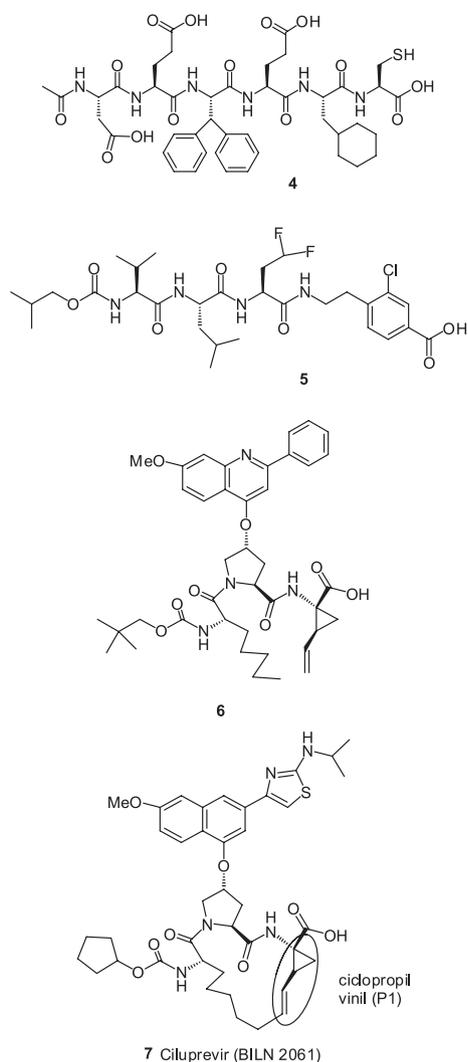


Figura 3. Estruturas de peptideomiméticos inibidores de HCV protease

estudo.⁵⁹ Estudos de SAR mostraram que a porção ciclopropil vinil na posição P₁ de **7** apresentou o melhor encaixe com a superfície enzimática, passando a ser elemento fundamental na estrutura de posteriores inibidores.

Inibidores covalentes

Inibidores macrocíclicos

Diversos inibidores macrocíclicos têm sido descritos através da utilização da estratégia de macrociclicação, nos quais a cadeia lateral P₂ foi ciclizada com o grupamento da extremidade P₃, originando os chamados macrociclos P₂-P₃, bem como aqueles denominados P₁-P₃, provenientes da ciclização dos aminoácidos nas respectivas posições. Dentre os macrociclos P₂-P₃ estão os derivados **8** e **9** (Figura 4) que, apesar de apresentarem elevada potência em testes enzimáticos, foram menos potentes em testes celulares com replicon. Já os macrociclos P₁-P₃ apresentaram melhores perfis de atividade no replicon celular.^{48,60}

Inibidores lineares

Na classe de inibidores covalentes lineares destacam-se os compostos do tipo ácido borônico/boronatos (ex. o composto **10**, figura 4) e os derivados do tipo α -cetoamidas. Essas funções têm sido investigadas como eletrófilos que, potencialmente, poderiam reagir com a hidroxila nucleofílica da serina do sítio ativo.⁵³

O telaprevir (**11**) (VX-950 - Vertex Pharmaceuticals, Inc.) (Incivek/Incivo[®])⁶¹ e o boceprevir (**12**) (SCH503034 - Merck Sharp & Dohme Co., Inc.) (Victrelis[®]) (Figura 4), representantes da classe das α -cetoamidas, foram aprovados para o tratamento do HCV genótipo 1 pelo FDA, EMA e ANVISA, dentre outras agências, em 2011. Apesar da boa atividade contra o genótipo 1 do HCV, a monoterapia com esses agentes resulta em rápida seleção de variantes droga-resistentes.⁶² Estudos de fase II e III mostraram que a combinação dessas drogas com PEG-IFN e ribavirina levou a uma substancial redução na frequência de mutantes resistentes.⁶³ Assim eles são empregados como um terceiro medicamento no tratamento de pacientes com hepatite C crônica (infectados com o genótipo 1), junto com o PEG-IFN e a ribavirina, visando a obtenção de maior resposta terapêutica.

Vários outros agentes inibidores da protease NS3/4A estão em fases diferentes de testes clínicos, o que aumentará bastante as opções de tratamento em um futuro próximo.⁶⁴ Dentre eles estão o simeprevir (**13**) (TMC435350),⁶⁵ um inibidor macrocíclico não covalente e o faldaprevir (**14**) (BI201335),⁶⁶ um inibidor linear não covalente (Figura 4). Atualmente, ambos estão em estudos clínicos de fase 3.

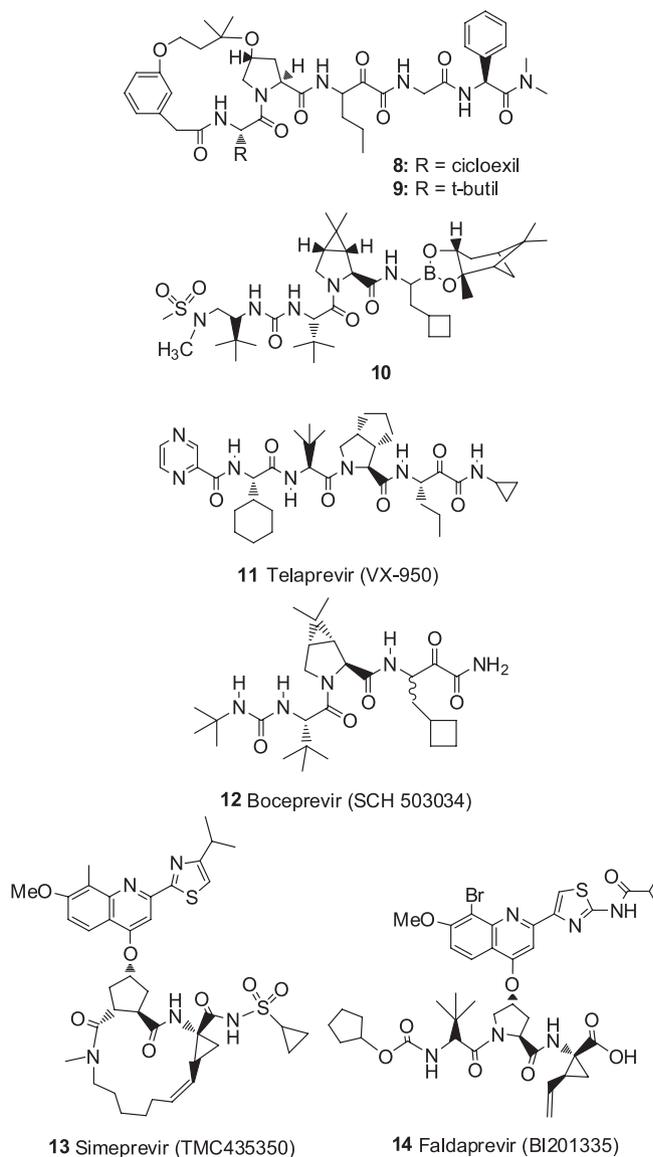


Figura 4. Inibidores da enzima HCV protease

Protease do HIV (HIV PR)

Dentre as três patologias em questão neste trabalho, a AIDS é a que mais avançou na comercialização de fármacos inibidores da protease. Nas últimas décadas, dez inibidores foram aprovados pelo FDA e outros se encontram em estágio de testes clínicos.^{56,57}

O saquinavir (**15**), desenvolvido pelo laboratório Hoffmann-La Roche, foi o primeiro inibidor da HIV PR aprovado pelo FDA, em dezembro de 1995. Atualmente outros fármacos são comercializados, dentre eles estão o ritonavir (**16**), indinavir (**17**), nelfinavir (**18**) e darunavir (**19**) (Figura 5). Ressalta-se que quase todos os fármacos inibidores da HIV PR são compostos peptidomiméticos, contendo um grupamento hidroxila planejada para interagir com a díade de resíduos Asp central.

A introdução da primeira geração de inibidores, os fármacos **16**, **17** e **18**, mudou a natureza da AIDS epidêmica de doença terminal para doença passível de tratamento.⁶⁷

O darunavir (**19**) (Prezista[®]), um dos mais recentes inibidores da HIV-1 PR, foi planejado com o objetivo de maximizar as interações hidrofóbicas e ligações hidrogênio com os resíduos do sítio S2 da protease, pela introdução do ligante bis-tetraidrofurano (bis-THF).⁶⁸ Kovalevsky e colaboradores⁶⁹ mostraram que o composto **19** possui dois sítios de ligação na enzima protease: um no próprio sítio ativo e outro em um dos *flaps* móveis do dímero. A existência deste segundo sítio de ligação sugere um mecanismo para a grande efetividade de **19** contra os vírus mutantes que são resistentes aos demais fármacos da classe.

Baseados no sucesso do desenvolvimento do darunavir, Ghosh e colaboradores planejaram novos peptidomiméticos do tipo ciclo-pentiltetraidrofurano (Cp-THF), como ligantes em P₂, substituindo a estrutura bis-THF presente em **19**. Os compostos desta série apresentaram valores de *K_i* na ordem de nM e pM.⁷⁰

Apesar da existência de vários fármacos no mercado para terapia anti-HIV, que provam inequivocamente que a HIV PR consiste em um alvo terapêutico importante, a terapia anti-HIV PR torna-se limitada devido ao surgimento de cepas virais mutantes resistentes a essas drogas. Esse fato justifica a necessidade da busca constante de novas estruturas capazes de superar e inibir as mutações enzimáticas.⁷¹

PLANEJAMENTO E SÍNTESE DE NOVOS INIBIDORES DE SERINA PROTEASE

A necessidade do desenvolvimento de fármacos mais eficazes para a terapia de infecções virais de grande impacto no sistema de saúde mundial, como a dengue, a hepatite C e AIDS, tem justificado o empenho de pesquisadores na área de síntese de moléculas peptidomiméticas voltadas para tais patologias virais.

Durante as últimas décadas muitos esforços têm sido feitos no sentido de desenvolver estratégias de planejamento e síntese de moléculas peptídicas e peptidomiméticas com conformações específicas, tais como: α -hélice, folhas β ou estendida, uma vez que a incorporação de aminoácidos com ângulos corretos de torção pode ser fundamental para a atividade e seletividade.⁴⁰ Recentemente, o enfoque maior tem se voltado para o planejamento, síntese e utilização de aminoácidos não-naturais mono ou bicíclicos, conformacionalmente restritos, para incorporação dos mesmos nas estruturas de inibidores enzimáticos peptidomiméticos.⁷²

Neste contexto, Muri e colaboradores vêm trabalhando na pesquisa de compostos peptidomiméticos como potenciais inibidores de serina protease do HCV e DENV. Eles utilizam, como cerne estrutural, o composto chamado isomanídeo (**20**) (Figura 6) devido à sua estrutura peculiar de éter bicíclico conformacionalmente restrita

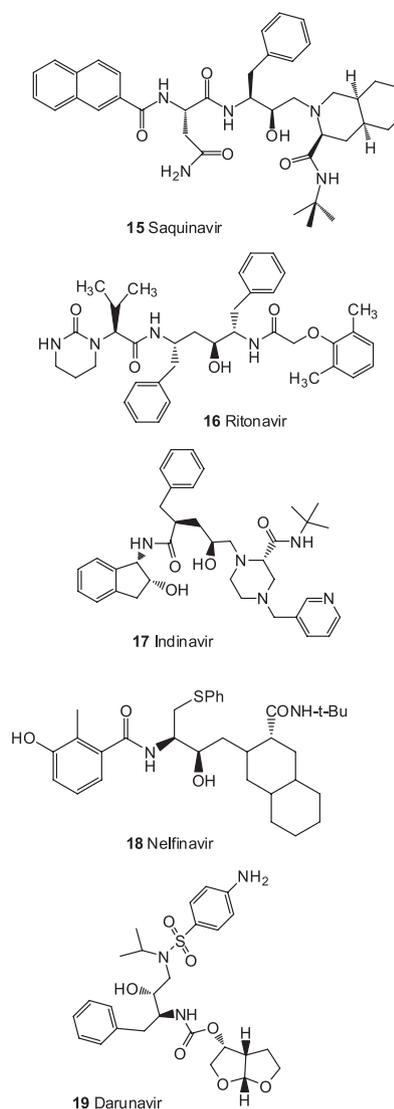


Figura 5. Inibidores da enzima HIV protease

do tipo em “U”, com uma estereoquímica definida, o qual apresenta características estruturais úteis em compostos peptidomiméticos, devido a sua capacidade de agir como um indutor do tipo folha β e reter o padrão de ligações hidrogênio da cadeia lateral peptídica.^{73,74}

O isomanídeo (**20**) é um carboidrato quirais, comercialmente disponível, o qual pode ser obtido industrialmente pela desidratação do D-manitol.⁷⁵ A estrutura simétrica, bicíclica, apresentando duas hidroxilas na posição *endo* o faz um bloco de construção atrativo para aplicações sintéticas.⁷⁶ O isomanídeo e seus derivados já vêm sendo utilizados por vários grupos de pesquisa, como catalisadores de transferência de fases em síntese assimétrica, como ligantes e auxiliares quirais, na síntese de líquidos iônicos quirais, bem como produtos de partida para a síntese de compostos de interesse farmacêutico.⁷⁷

Um dos primeiros trabalhos descritos por Muri e colaboradores consistiu na síntese da série de compostos (**22**) (Figura 6), a qual foi obtida pela reação de abertura de diversas oxazolonas com a mono-amina benzilada (**21**), obtida a partir do isomanídeo, em 4 etapas. Os derivados sintetizados foram testados farmacologicamente em modelo celulares do tipo replicon de HCV, no qual o composto com os substituintes, R₁=Ph e R₂=2-tienil, apresentou o melhor perfil de inibição com EC₅₀ = 35 μ M.⁷⁸

Com o intuito de otimizar o perfil farmacológico dos peptidomiméticos obtidos, o mesmo grupo de pesquisas planejou e sintetizou

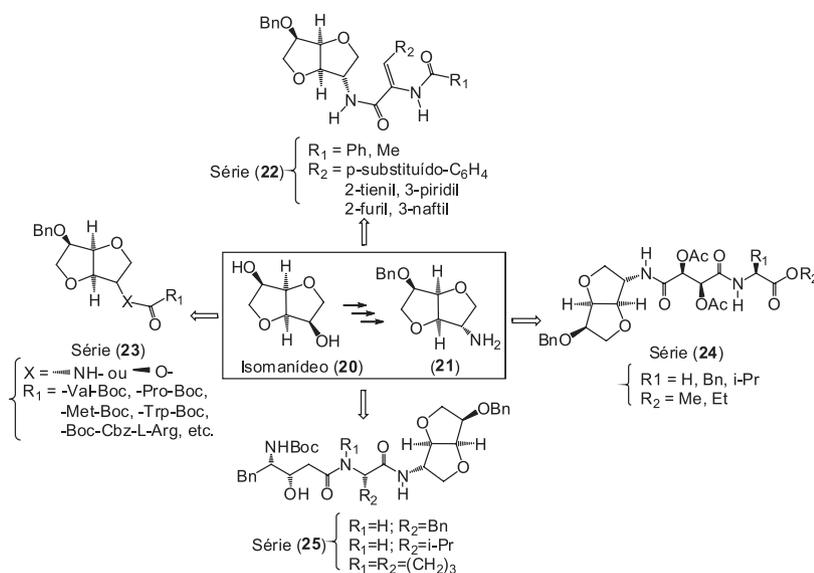


Figura 6. Séries de peptideomiméticos derivados do isomanídeo (20)

ésteres e amidas (série 23, Figura 6) pela introdução de cadeias laterais provenientes de diversos aminoácidos e dipeptídeos, com o intuito de verificar o grau de interação das mesmas com a protease do HCV.⁷⁹ O derivado com o substituinte X=-NH e cadeia lateral derivada do aminoácido arginina, a *N*-Boc-*N*-di-CBz-L-Arg, apresentou uma inibição de 45% da atividade protease da enzima em uma concentração de 100 μ M. Este composto mais ativo, o derivado da arginina, foi ancorado (estudos de *docking*) no sítio ativo da enzima NS3/4A protease do HCV, mostrando-se localizado na fenda hidrofóbica S1, onde o resíduo arginina interagiu com os resíduos Ile132, Leu135, Lis136, Gli137, Ser139 e Phe154. Neste estudo, também se observou a presença de seis ligações hidrogênio, sendo quatro do resíduo arginina com os aminoácidos His57, Arg155 e Ala157 da enzima e duas do anel isomanídeo.⁸⁰

Baseados na vasta literatura sobre o uso do ácido tartárico como cerne estrutural não-hidrolisável para o planejamento de inibidores de proteases, novas estruturas peptideomiméticas derivadas do isomanídeo foram planejadas, contendo esqueletos oriundos do ácido D e L-tartárico, representada pela série (24) (Figura 6). No teste de inibição enzimática frente à NS3/4A protease do HCV, o composto derivado do aminoácido L-Val e ácido D-tartárico apresentou o melhor perfil de inibição igual a 63%.⁸¹

A série de compostos (25) foi planejada pela introdução do cerne não-hidrolisável da estatina e L-aminoácidos, na cadeia lateral do isomanídeo. Esta série encontra-se em fase de testes biológicos.⁸²

CONCLUSÕES

O presente trabalho mostra uma ampla revisão da literatura sobre compostos peptideomiméticos como inibidores de serina e aspartil proteases, enfatizando a necessidade do desenvolvimento de fármacos mais eficazes para a terapia de infecções virais, uma vez que poucos inibidores da HCV protease e dez inibidores da HIV protease estão disponíveis comercialmente. Esta necessidade é reforçada pela existência de diversas variantes virais e emergência de cepas mutantes, além das dificuldades para o desenvolvimento de uma vacina efetiva.

Diversos pontos da replicação do HIV e HCV, além das proteases, podem ser considerados alvos potenciais para desenvolvimento de novos agentes para terapia farmacológica, ampliando assim as possibilidades de obtenção de um novo fármaco para tais patologias de interesse mundial.

REFERÊNCIAS

- Hedstrom, L.; *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501.
- Rawling, N. D.; Barret, A.; *Methods Enzymol.* **1994**, *244*, 18.
- Sataga, M.; Sobczak, M.; Fichna, J.; *Drug Discovery Today* (2013), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2013.03.004>.
- Koblinski, J. E.; Ahram, M.; Sloane, B. F.; *Clin. Chim. Acta* **2000**, *291*, 113.
- Rufino, R.; Silva, J. R. L.; *J. Bras. Pneumol.* **2006**, *32*, 241.
- Lopez-Otin, C.; Overall, C. H.; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 509.
- IUBMB Enzyme Nomenclature: recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology. Academic Press: San Diego, 1992.
- de Simone, S. G.; Silva Junior, F. P.; *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* **2001**, *22*, 12.
- Barret, A. J.; *Methods Enzymol.* **1994**, *244*, 1; Barret, A. J.; Rawlings, N. D.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *318*, 247; da Silva-López, R. E.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 1541.
- Schechter, I.; Berger, A.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 157.
- De Souza, M. V. N.; *Acta Farm. Bonaerense* **2005**, *24*, 291.
- Nogueira, R. M.; Miagostovich, M. P.; Cunha, R. V.; Zagne, S. M.; Gomes, F. P.; Nicol, A. F.; Coelho, J. C.; Schatzmayr, H.G.; *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1999**, *93*, 418.
- Melino, S.; Paci, M.; *FEBS J.* **2007**, *274*, 2986; Srichaikul, T.; Nimmanitya, S.; *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **2000**, *13*, 261.
- Innis, B. L.; Eckels, K. H.; *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2003**, *69*, 1.
- Gibbons, R. V.; Vaughn, D. W.; *BMJ* **2002**, *324*, 1563.
- Halstead, S. B.; *Lancet* **2007**, *370*, 1644.
- Chanprapaph, S.; Saparpakorn, P.; Sangma, C.; Niyomrattanakit, P.; Hannongbua, S.; Angsuthanasombat, C.; Katzenmeier, G.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *330*, 1237; Fowell, A. J.; Nash, K. L.; *Adv. Ther.* **2010**, *27*, 512; Natarajan, S.; *Genet. Mol. Biol.* **2010**, *33*, 214.
- Falgout, B.; Markoff, L.; *J. Virol.* **1995**, *69*, 7232.
- Chanprapaph, S.; Saparpakorn, P.; Sangma, C.; Niyomrattanakit, P.; Hannongbua, S.; Angsuthanasombat, C.; Katzenmeier, G.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *330*, 1237.
- Bazan, J. F.; Fletterick, R. J.; *Virology* **1989**, *171*, 637; Bazan, J. F.; Fletterick, R. J.; *Semin. Virol.* **1990**, *1*, 311.
- Gorbalenya, A. E.; Donchenko, A. P.; Koonin, E. V.; Blinov, V. M.; *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 3889.

22. Falgout, B.; Miller, R. H.; Lai, C. J.; *J. Virol.* **1993**, *67*, 2034; Arias, C. F.; Preugschat, F.; Strauss, J. H.; *Virology* **1993**, *193*, 888.
23. http://www.saude.rs.gov.br/dados/1316779614748protocolo_hepatitec_marc_pdf_29595.pdf, acessada em Dezembro 2012.
24. Ruiz, F. J. G.; Zylbergeld, N. D.; *Rev. Bras. Med.* **2004**, *61*, 719.
25. Hayashi, N.; Takehara T.; *J. Gastroenterol.* **2006**, *41*, 17.
26. Fowell, A. J.; Nash, K. L.; *Adv. Ther.* **2010**, *27*, 512.
27. Natarajan, S.; *Genet. Mol. Biol.* **2010**, *33*, 214.
28. Kupfer, B. Em *Short Guide to Hepatitis C*; Mauss, S; Berg, T.; Rockstroh, J.; Sarrazin, C.; Wedemeyer, H.eds.; Flying Publisher: Germany, 2012, cap. 2.
29. Thompson, A.; Patel, K.; Tillman, H.; Mchutchison, J. G.; *J. Hepatol.* **2009**, *50*, 184.
30. De Francesco, R.; Carfi, A.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, *59*, 1242.
31. Chen, K. X.; Njoroge, F. G.; *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2009**, *10*, 821.
32. Pope, M.; Hasse, A.; *Nat. Med.* **2003**, *9*, 847.
33. Oliveira, L. H. S.; *Livro de Virologia Humana*, 1ª ed., Cultura Médica: Rio de Janeiro, 1994.
34. Grinsztejn, B.; Nguyen, B.-Y.; Katlama, C.; Gatell, J. M.; Lazzarin, A.; Vittecoq, D.; Gonzalez, C. J.; Chen, J.; Harvey, C. M.; Isaac, R. D.; *Lancet* **2007**, *369*, 1261.
35. Hornak, V.; Simmerling, C.; *Drug Discovery Today* **2007**, *12*, 132.
36. Drag, M. E; Salvesen, G. S.; *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9*, 690; Raney, K. D.; Sharma, S. D.; Moustafa, I. M.; Cameron, C. E.; *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 22725.
37. Leung, D.; Abbenante, G.; Fairlie, P. D.; *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 305; Cunico, W.; Gomes, C. R. B.; Junior, W. T. V.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 2111.
38. Frokjaer, S.; Otzen, D. E. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 298.
39. Picchi, D. G.; Altei, W. F.; Saito, M. S.; Bolzani, V. S.; Cilli, E. M.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1262.
40. Vagner, J.; Qu, H.; Hruby, V. J.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 292; Stefanucci, A.; Pinnen, F.; Feliciani, F.; Cacciatore, I.; Lucente, G.; Mollica, A.; *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 2853.
41. Hruby, V. J.; *Biopolymers* **1993**, *33*, 1073.
42. Fear, G.; Komarnytsky, S.; Raskin, I.; *Pharmacol. Ther.* **2007**, *113*, 354.
43. Kharb, R.; Rana, M.; Sharma, P. C.; Yar, M. S.; *J. Chem. Pharm. Res.* **2011**, *3*, 173.
44. Leung, D.; Schroder, K.; White, H.; Fang, N.-X.; Stoermer, M. J.; Abbenante, G.; Martin, J. L.; Young, P. R.; And Fairlie, D. P.; *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 45762.
45. Xu, S.; Li, H.; Shao, X.; Fan, C.; Ericksen, B.; Liu, J.; Chi, C.; Wang, C.; *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6881.
46. Vasudevan, S. G.; Keller, T. H.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 36; Lescar, J.; Luo, D.; Xu, T.; Sampath, A.; Lim, S. P.; Canard, B.; Vasudevan, S. G.; *Antiviral Res.* **2008**, *80*, 94; Gao, Y.; Cui, T.; Lam, Y.; *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 1331; Noble, C. G.; Chen, Y.-L.; Dong, H.; Gu, F.; Lim, S. P.; Schul, W.; Wang, Q.-Y.; Shi, P.-Y.; *Antivir. Res.* **2010**, *85*, 450; Yin, Z.; Patel, S. J.; Wang, W.-L.; Wang, G.; Chan, W.-L.; Rao, K. R. R.; Alam, J.; Jeyaraj, D. A.; Ngew, X.; Patel, V.; Beer, D.; Lim, S. P.; Yang, C.-C.; Hsieh, Y.-C.; Lee, S.-J.; Wu, S.-H.; Liao, C.-L.; Tsao, C.-H.; Chao, Y.-S.; Chern, J.-H.; Wu, C.-P.; Yueh, A.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 229.
47. Noble, C. G.; Chen, Y.-L.; Dong, H.; Gu, F.; Lim, S. P.; Schul, W.; Wang, Q.-Y.; Shi, P.-Y.; *Antivir. Res.* **2010**, *85*, 450; Deng, J.; Li, N.; Liu, H.; Zuo, Z.; Liew, O. W.; Xu, W.; Chen, G.; Tong, X.; Tang, W.; Zhu, J.; Zuo, J.; Jiang, H.; Yang, C. G.; Li, J.; Zhu, W.; *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6278.
48. Chen, K. X.; Njoroge, F. G.; *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2009**, *10*, 821.
49. Parkinson T.; Pryde, D. C.; *Fut. Med. Chem.* **2010**, *2*, 1181.
50. Yin, Z.; Patel, S. J.; Wang, W.-L.; Wang, G.; Chan, W.-L.; Rao, K. R. R.; Alam, J.; Jeyaraj, D. A.; Ngew, X.; Patel, V.; Beer, D.; Lim, S. P.; Vasudevan, S. G.; Keller, T. H.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 40.
51. Machado, A.; Liria, C. W.; Proti, P. B.; Remuzgo, C.; Miranda, M. T. M.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 781; Freitas, L. B. de O.; Ruela, F. A.; Pereira, G. R.; Alves, R. B.; de Freitas, R. P.; dos Santos, L. J.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 1791.
52. Fehrentz, J.-A.; Paris, M.; Heitz, A.; Velek, J.; Liu, C.-F.; Winternitz, F.; Martinez, J.; *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7871.
53. Venkatraman, S.; Wu, W.; Prongay, A.; Girijavallabhan, V.; Njoroge, F. G.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 180.
54. Frecer, V.; Miertus, S.; *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **2010**, *24*, 195.
55. Noble, C. G.; Seh, C. C.; Chao, Alexander T.; Shi, P. Y.; *J. Virol.* **2012**, *86*, 438.
56. Peçanha, E. P.; Antunes, O. A. C.; Tanuri, A.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 1108.
57. Cunico, W.; Gomes, C. R. B.; Junior, W. T. V.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 2111.
58. Tyndall, J. D.; Fairlie, D. P.; *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 893.
59. Lamarre, D.; Anderson, P. C.; Bailey, M.; Beaulieu, P.; Bolger, G.; Bonneau, P.; Bos, M.; Cameron, D. R.; Cartier, M.; Cordingley, M. G.; Faucher, A.-M.; Goudreau, N.; Kawai, S. H.; Kukolj, G.; Lagacé, L.; LaPlante, S.R.; Narjes, H.; Poupard, M.-A.; Rancourt, J.; Sentjens, R. E.; *Nature* **2003**, *426*, 186; Naggie, S.; Patel, K.; Mchutchison, J.; *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 2063.
60. Chen, K. X.; Njoroge, F. G.; Arasappan, A.; Venkatraman, S.; Vibulbhan, B.; Yang, W.; Parekh, T. N.; Pichardo, J.; Prongay, A.; Cheng, K. C.; Butkiewicz, N.; Yao, N.; Madison, V.; Girijavallabhan, V.; *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 995.
61. Perni, R. B.; Almquist, S. J.; Byrn, R. A.; Chandorkar, G. Pravin, R.; Chaturved, P. R.; Courtney, L. F.; Decker, C. J.; Dinehart, K.; Gates, C. A.; Harbeson, S. L.; Heiser, A.; Kalkeri, G.; Kolaczowski, E.; Lin, K.; Luong, Y.-P.; Rao, B. G.; Taylor, W. P.; Thomson, J. A.; Tung, R. D.; Wei, Y.; Kwong, A. D.; Lin, C.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 899.
62. Wyles, D. L.; *J. Infect. Dis.* **2013**, *207(S1)*, S33.
63. Hézode, C.; Forestier, N.; Dusheiko, G.; Ferenci, P.; Pol, S.; Goeser, T.; Bronowicki, J. P.; Bourlière, M.; Gharakhanian, S.; Bengtsson, L.; McNair, L.; George, S.; Kieffer, T.; Kwong, A.; Kauffman, R. S.; Alam, J.; Pawlotsky, J. M.; Zeuzem, S.; *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 1839; Bacon, B. R.; Gordon, S. C.; Lawitz, E.; Marcellin, P.; Vierling, J. M.; Zeuzem, S.; Poordad, F.; Goodman, Z. D.; Sings, H. L.; Boparai, N.; Burroughs, M.; Brass, C. A.; Albrecht, J. K.; Esteban, R.; *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 1207.
64. Kiser, J. J.; Flexner, C.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *53*, 427.
65. Raboisson, P.; de Kock, H.; Rosenquist, Å.; Nilsson, M.; Salvador-Oden, L.; Lin, T. I.; Roue, N.; Ivanov, V.; Wähling, H.; Wickström, K.; Hamelink, E.; Edlund, M.; Vrang, L.; Vendeville, S.; Van de Vreken, W.; McGowan, D.; Tahri, A.; Hu, L. L.; Boutton, C.; Lenz, O.; Delouvro, F.; Pille, G.; Surleraux, D.; Wigerinck, P.; Samuelsson, B.; Simmen, K.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4853.
66. White, P. W.; Llinas-Brunet, M.; Amad, M.; Bethell, R. C.; Bolger, G.; Cordingley, M. G.; Duan, J. M.; Garneau, M.; Lagace, L.; Thibeault, D.; Kukolj, G.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 4611.
67. de Souza, M. V. N.; de Almeida, N. V.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 366.
68. Ghosh, A. K.; Takayama, J.; *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3409; Ghosh, A. K.; Dawson, Z. L.; Mitsuya, H.; *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7576.
69. Kovalevsky, A. Y.; Liu, F.; Leshchenko, S.; Ghosh, A. K.; Louis, J. M.; Harrison, R. W.; Weber, I. T.; *J. Mol. Biol.* **2006**, *363*, 161.
70. Ghosh, A. K.; Sridhar, P. R.; Leshchenko, S.; Hussain, A. K.; Li, J. F.; Kovalevsky, A. Y.; Walters, D. E.; Wedekind, J. E.; Grum-Tokars, V.; Das, D.; Koh, Y.; Maeda, K.; Gatanaga, H.; Weber, I. T.; Mitsuya, H.; *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5252; Ghosh, A. K.; Leshchenko-Yashchuk, S.; Anderson, D. D.; Baldrige, A.; Noetzel, M.; Miller, H. B.; Tie, Y. F.; Wang, Y. F.; Koh, Y.; Weber, I. T.; Mitsuya, H.; *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3902.

71. Ohtaka H.; Freire E. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* **2005**, *88*, 193; Melo, E. B.; Bruni, A. T.; Ferreira, M. M. C.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 555; Qiu, X.; Liu, Z.-P.; *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 4513.
72. Trabocchi, A.; Scarpì, D.; Guarna, A. *Amino Acids* **2008**, *34*, 1; Hanessian, S.; Auzzas, L.; *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1241.
73. Hanessian, S.; McNaughton-Smith, G.; Lombart, H. G.; Lubell, W. G.; *Tetrahedron* **1997**, *53*, 12789.
74. Gising, J.; Belfrage, A. K.; Alogheli, H.; Ehrenberg, A.; Åkerblom, E.; Svensson, R.; Artursson, P.; Karlén, A.; Danielson, U. H.; Larhed, M.; Sandström, A.; *J. Med. Chem.* (2013), dx.doi.org/10.1021/jm301887f.
75. Fauconnier, A. C. R.; *Acad. Sci.* **1882**, *95*, 991; Fauconnier, A.; *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1884**, *41*, 18; Wiggins, L. F.; *J. Chem. Soc.* **1945**, 4.
76. Kagan, H. B.; Riant, O.; *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1007.
77. Carcedo, C.; Dervisi, A.; Fallis, I. A.; Ooi, L.; Malik, K. M. A.; *Chem. Commun.* **2004**, 1236; Muri, E. M. F.; Gomes Jr, M.; Costa, J. S.; Alencar, F. L.; Sales Jr., A.; Bastos, M. L.; Hernandez-Valdes, R.; Albuquerque, M. G.; Cunha, E. F. F.; Alencastro, R. B.; Williamson, J. S.; Antunes, O. A. C.; *Amino Acids* **2004**, *27*, 153; Muri, E. M. F.; Gomes Jr., M.; Albuquerque, M. G.; Cunha, E. F. F.; Alencastro, R. B.; Williamson, J. S.; Antunes, O. A. C.; *Amino Acids* **2005**, *28*, 413; Antunes, O. A. C.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, S64; Muri, E. M. F.; Abraham, B. A.; Barros, T. G.; Williamson, J. S.; Antunes, O. A. C.; *Mini-Reviews in Organic Chemistry* **2010**, *7*, 75.
78. Barros, T. G.; Pinheiro, S.; Williamson, J. S.; Tanuri, A.; Pereira, H. S.; Brindeiro, R. M.; Neto, J. B. A.; Antunes, O. A. C.; Muri, E. M. F.; *Synthesis* **2009**, *4*, 620; Barros, T. G.; Pinheiro, S.; Williamson, J. S.; Tanuri, A.; Gomes Jr, M.; Pereira, H. S.; Brindeiro, R. M.; Neto, J. B. A.; Antunes, O. A. C.; Muri, E. M. F.; *Amino Acids* **2010**, *38*, 701.
79. Luiz, J.; *Quim. Nova* **1990**, *13*, 176.
80. Barros, T. G.; Zorzanelli, B. C.; Pinheiro, S.; Brito, M. A.; Tanuri, A.; Costa, E. C. B.; Mohana-Borges, R. S.; Rodrigues, C. R.; Souza, A. T. M.; Ferreira, V. F.; Muri, E. M. F.; *Lett. Org. Chem.* **2012**, *9*, 239.
81. Tanuri, A.; da Costa, E. C. B.; Muri, E. M. F.; Mohana-Borges, R. S.; Pinheiro, S.; Ventura, G. T.; Capaccia, A. N.; Abraham-Vieira, B. A.; Azevedo, P. H. R. A.; Portela, A. C.; *Br 10 2012 020638 2*, **2012**.
82. Zorzanelli, B. C. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal Fluminense, Brasil, 2013.