



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**TÍTULO:**

**DISEÑO DE FÁRMACOS ANTIVIRALES  
BASADOS EN EL COMPLEJO DE LA  
POLIMERASA DEL VIRUS DE LA GRIPE.**

Autor: Doña María González Sánchez.

Tutor: Dra. Doña Carmen Pedregal Freire.

Convocatoria: Febrero 2019.

## **ÍNDICE.**

Resumen.....	3
Abstract.....	3
Introducción y antecedentes.....	4
Objetivos.....	7
Metodología.....	8
Resultados y discusión.....	8
Conclusiones.....	17
Bibliografía.....	18

## **RESUMEN.**

La prevención y el tratamiento de la gripe es una necesidad continua y que aún no está solucionada. Cada año se producen millones de hospitalizaciones y miles de muertes a causa de esta infección, siendo una carga sanitaria y económica para la sociedad. La variación anual en la efectividad de las vacunas y la creciente aparición de resistencias frente a los fármacos disponibles han originado la nueva búsqueda de terapias antivirales cuya diana son las diferentes proteínas del patógeno. Esto supone un gran desafío para la terapéutica, dada la complejidad del virus, la cantidad de especies en las que se encuentra y las posibles variaciones que pueden sufrir sus proteínas y que pueden generar mutaciones, haciendo inefectivos los fármacos, de manera que un único agente podría no ser capaz de inhibir diferentes cepas.

Por ello, ha surgido la necesidad de buscar nuevas moléculas que puedan hacer frente a la infección, y en este trabajo nos vamos a centrar en aquellas que tienen como objetivo la enzima polimerasa del virus, que es el catalizador que se encarga de la replicación y transcripción del mismo en la célula huésped. Debido a que esta proteína posee 3 subunidades, existen 3 posibles dianas terapéuticas para tratar la enfermedad, y también se ha descubierto el papel de otra proteína, la nucleoproteína, en los procesos de multiplicación del virus, siendo otra diana potencial muy prometedora.

Esta revisión resume los desarrollos recientes de los fármacos cuya diana biológica es la endonucleasa y la nucleoproteína del influenzavirus, analizando su relación estructura-actividad.

## **ABSTRACT.**

The prevention and treatment of influenza is a continuous need and it is not solved yet. Every year, there are millions of hospitalizations and thousands of deaths because of this infection, and it is being a health and economic burden for society. The annual variation in vaccine's efficacy and the increasing appearance of resistance to the available drugs have led to the new research for antiviral therapies whose target are different proteins of the virus. This is a great challenge for therapeutics, due to de complexity of the virus, the number of species in which the virus can be found and the variations that the proteins can suffer and how can that generate mutations, causing ineffective drugs.

Therefore, the need has arisen to look for new molecules that can confront the infection, and this work will be focus in the polymerase enzyme of the virus, which is responsible for

replication and transcription in the host cell. This enzyme has 3 subunit, so there are 3 possible therapeutic targets to treat the disease, and the role of another protein, the nucleoprotein, has been discovered as a new target, as this protein also takes part in the multiplication of the virus.

This review summarizes the recent developments of drug whose biological target is the endonuclease and the nucleoprotein of the influenzavirus, as well as the analysis of their structure-activity relationship.

## **INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.**

La gripe es una enfermedad respiratoria aguda debido a una infección producida por la familia *Orthomyxoviridae* que afecta tanto a aves como a mamíferos. Suele aparecer en forma de epidemias o pandemias, aunque también existen casos aislados, y esta patología presenta un gran interés debido a la trascendencia económica y social que conlleva.

Dentro de los *Orthomyxovirus*, existen 5 géneros, que son los virus de la gripe A, B y C (generalmente se conocen como *Influenzavirus*), y los *Thogovirus* e *Isavirus*. El virus de la gripe A es el que mayormente infecta al ser humano, aunque los géneros B y C también se pueden encontrar, mientras que el género *Thogovirus* afecta al salmón y el *Isavirus* a los insectos. Esta familia se caracteriza por que sus virus poseen un genoma de RNA segmentado, monocatenario y de sentido negativo, y además, poseen la singularidad de que pueden intercambiar o mezclar la información de su genoma con otros virus o cepas del mismo género. Todas estas características, junto con su alta trasmisibilidad y su amplio rango de hospedador han generado que esta familia de virus sea uno de los patógenos conocidos con mayor morbilidad y mortalidad a lo largo de los años.<sup>(1,2)</sup>

Los viriones de la gripe están compuestos por una envuelta lipídica que deriva de la membrana de la célula hospedadora, y esta envoltura contiene una nucleocápsida en cuyo interior se encuentra el genoma formando complejos de RNA-proteína. Son virus de tamaño medio, de simetría helicoidal y pleomórficos, es decir, que pueden tener dos o más formas estructurales distintas, aunque generalmente son esféricos o elípticos, pudiéndose encontrar también formas filamentosas<sup>(3)</sup>.

La parte interior de la doble capa lipídica está recubierta por la proteína de membrana o matriz 1 (M1), que es la que aporta estabilidad al virión, y la parte exterior contiene una serie de proyecciones glicolipídicas, que son la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N), y la proteína de la matriz 2 (M2). La proteína de la matriz 1 es una de las proteínas más abundantes

del virión, formando una capa casi continua en el interior de la envuelta lipídica que mantiene la estabilidad y la integridad de la misma. Además, esta proteína interviene en diversos procesos del ciclo del virus, como son la liberación de las ribonucleoproteínas (RNPs) al citoplasma tras la infección, la implicación en el proceso de ensamblaje de los nuevos viriones una vez generados, y la gemación y liberación de los viriones para infectar nuevas células.

La hemaglutinina es la proteína mayoritaria de la envoltura viral, y se denomina así porque puede unirse a receptores de los glóbulos rojos, generando su aglutinación, aunque su función principal es intervenir en la unión y penetración del virus a los receptores celulares que se encuentran en las células del epitelio respiratorio. Por su parte, la neuraminidasa es la proteína encargada de que se lleve a cabo la difusión y la liberación de las partículas víricas maduras desde las células infectadas, y su función principal es cortar los ácidos siálicos de la superficie de la célula huésped, de manera que se favorece la diseminación viral. Tanto la hemaglutinina como la neuroaminidasa son potentes antígenos que producen la liberación de anticuerpos protectores por parte del organismo.

La proteína de la matriz 2 es una proteína integral de membrana, y es la que se encuentra en menor cantidad en la envuelta del virus. Su estructura activa es en forma de tetrámeros, de manera que los monómeros se unen por sus regiones transmembrana formando un canal iónico que es selectivo de protones, ya que se necesita un pH ácido para que se faciliten las disociaciones de ciertos componentes y así poder proseguir con el ciclo del virus. La nucleocápside contiene una serie de complejos macromoleculares denominados ribonucleoproteínas (RNPs), que están formados por el RNA genómico de cadena sencilla y cuatro proteínas virales que son la nucleoproteína (NP) y el complejo de la polimerasa viral, que es un heteropolímero trimérico formado por las subunidades proteína básica 1 (PB1), proteína básica 2 (PB2) y proteína ácida (PA).

NP es la proteína más abundante sintetizada durante la infección, cuya función principal es la encapsidación, y aunque su papel no está perfectamente descrito, se sabe que es esencial para la replicación y la transcripción viral. Esta proteína también es determinante de la regulación del transporte bidireccional de las RNPs entre el núcleo y el citoplasma durante la infección viral.

PB1 es la encargada de catalizar la adición secuencial de nucleótidos durante la elongación de la cadena de RNA, es decir, que regula el inicio de la síntesis. La polimerasa viral se asocia al promotor del RNA viral (vRNA) con especificidad de secuencia, y se ha sugerido que PB1 podría estar implicada en la regulación de la transcripción, ya que ciertas

mutaciones sobre esta subunidad afectan al promotor viral del RNA y a la unión del material genético con las estructuras *cap*.

PB2 se encarga de promover la iniciación de la transcripción, ya que es la responsable del reconocimiento de las estructuras *cap* tipo 1 de los pre-mRNA de la célula huésped, que luego serán cortadas y usadas como cebadores para la síntesis de los mensajeros virales. Se sabe que está implicada en la replicación pero no en la transcripción.

PA cumple su papel fundamental como endonucleasa, y está implicada en la replicación. Se ha observado que también está implicada en la unión de la polimerasa a estructuras *cap* y que es necesaria para la estabilización de la unión entre el promotor y la polimerasa. Además, tiene acción proteolítica sobre sí misma y sobre las proteínas que se expresan con ella<sup>(4,5)</sup>.

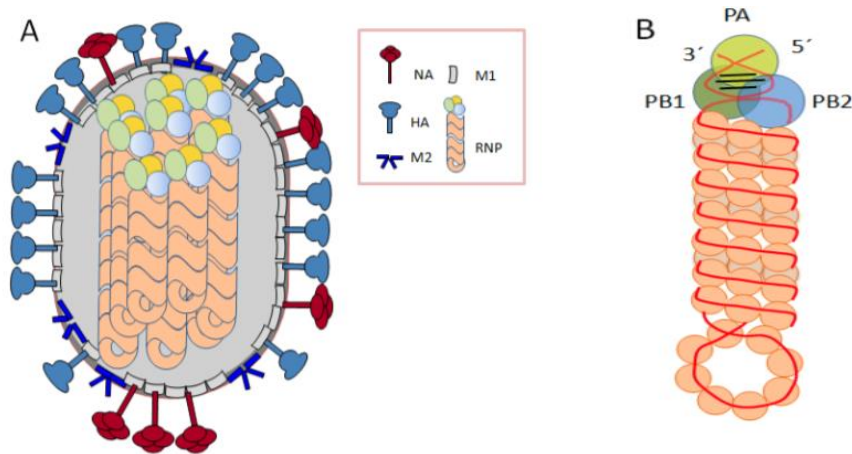


Figura 1A: Diagrama esquemático de un virión basado en microscopía (adaptado de Noda 2012). 1B: La ribonucleoproteína (RNP) (adaptado Portela and Digard, 2002).

Con respecto al tratamiento, hay varios fármacos con dianas específicas para el virus, habiendo demostrado disminuir el periodo sintomático y las complicaciones respiratorias graves, si bien la evidencia no es muy contundente, y cuando la infección no se complica, sólo se requiere tratamiento sintomático y reposo. Aún así, hay diversos agentes antivirales cuya diana son proteínas funcionales del virus, como son<sup>(6)</sup>:

- Inhibidores de la entrada.
- Inhibidores de la hemaglutinina.
- Inhibidores de la neuraminidasa.
- Inhibidores de la RNA polimerasa dependiente de RNA – Dentro de este grupo existen varias familias, como son los inhibidores de la proteína ácida con función endonucleasa (PA), los

inhibidores de la proteína básica 1 (PB1), los inhibidores de la proteína básica 2 (PB2) y los inhibidores de la acción proteína-proteína.

- Inhibidores de la nucleoproteína.
- Inhibidores del canal M2.
- Inhibidores de otras dianas – Como inhibidores de la proteasa e inhibidores de la V-ATPasa.
- Antioxidantes.

## **OBJETIVOS.**

El objetivo de este trabajo es hacer una revisión de los fármacos que se pueden utilizar para el tratamiento de la gripe cuya diana es alguna de las proteínas implicadas en la replicación viral (PA, PB1, PB2 y NP), así como ver el funcionamiento de la polimerasa RNA-dependiente del virus.

Estos fármacos pueden estar comercializados, en fase de ensayos clínicos o ser simplemente experimentales hasta el momento. Las familias de los principios activos en los que se va a centrar el trabajo son los inhibidores de la proteína ácida con actividad endonucleasa y en las moléculas que intervienen en la acción de la proteína NP, si bien es cierto que existen otras familias, como los análogos de nucleótidos inhibidores de la proteína PB1, inhibidores de la proteína PB2 y los inhibidores de la interacción proteína-proteína.

El trabajo se centra en las familias de los inhibidores de la endonucleasa y en las moléculas que intervienen en el funcionamiento de la NP porque son fármacos que en su mayoría se encuentran en fase experimental y se han buscado mediante el conocimiento de la diana, por técnicas de ingeniería química, modificando y mejorando algunos compuestos naturales en los que se ha comprobado que tienen actividad como antivirales.

## **METODOLOGÍA.**

Se ha realizado una revisión bibliográfica del virus de la gripe, desde su estructura, ciclo biológico y funcionamiento, y de todos los posibles tratamientos en función de las diferentes dianas que tienen, aunque el trabajo se ha centrado especialmente en la polimerasa RNA-dependiente, sus proteínas y todos los fármacos que pueden inhibir o inhabilitar su acción.

Para ello se han utilizado artículos de revistas como *New England Journal of Medicine*, o la revista *Nature*, y plataformas como PubMed, NCBI (National Center of Biotechnology

Information), EMBL (European Molecular Biology Laboratory) y la página de publicaciones de la American Chemical Society.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El virus accede al organismo, y tras unirse al receptor de la célula huésped, se internaliza por medio de la endocitosis, y gracias a que el pH del endosoma es ligeramente ácido (entre 5-6), se liberan todas las partículas del interior del virus al citoplasma, y las ribonucleoproteínas (RNP) son posteriormente atraídas hacia el núcleo.

Estas RNPs tienen que entrar en el núcleo de la célula del hospedador para que se pueda proceder a la transcripción y replicación del virus, y esta es una característica particular de los *Influenzavirus*, ya que la mayor parte del resto de virus realizan estos procesos en el propio citoplasma. El transporte por el cual las RNPs llegan al núcleo es mediante la unión de la PB2 a la importina humana alfa-5, formando un complejo que se reconoce por los receptores de membrana del núcleo celular, y ya allí, las RNPs sirven para la generación de una copia de RNA de polaridad positiva, se sintetizan nuevas proteínas gracias al mRNA, y el RNA viral se replica a través de un intermedio, que es el RNAc.

El RNA de los virus de la gripe A, B y C está formado por 8 segmentos que tienen en cada extremo terminal varios nucleótidos que son no codificantes y son secuencias cortas y parcialmente complementarias que forman el promotor (sección del RNA que sirve para promover la iniciación de la transcripción por unión a la polimerasa, conteniendo la información necesaria para activar o desactivar el gen que regula).

Tras la entrada de los RNPs en el núcleo, el material genético, que tiene polaridad negativa, tiene que pasar a sentido positivo para que pueda ser replicado y transcrito, y en estos momentos es donde entra en juego la polimerasa.

En el inicio de la transcripción, la PB2 se une al cap 7-metilguanosa 5' del premensajero (el *cap* es el inicio de la secuencia del promotor, que es un nucleótido alterado, para que la polimerasa sepa por dónde tiene que empezar a replicar o transcribir) de RNA, se genera el inicio de la cadena de nucleótidos, y la PA escinde los primeros 10-12 nucleótidos, y así se genera una pequeña porción que es la que va a servir de *primer* como tal. De esta forma, se inicia la replicación del material, se genera un mensajero de RNA en sentido positivo que contiene la *cap* en el extremo 5' y la poliadenilación en el extremo 3', haciendo que sean semejantes a los de la célula huésped, de manera que pueden utilizar los ribosomas para que se



traduzcan a proteínas y se pueda llevar a cabo así la transcripción. La catálisis de los nucleótidos es llevada a cabo por la subunidad PB1.

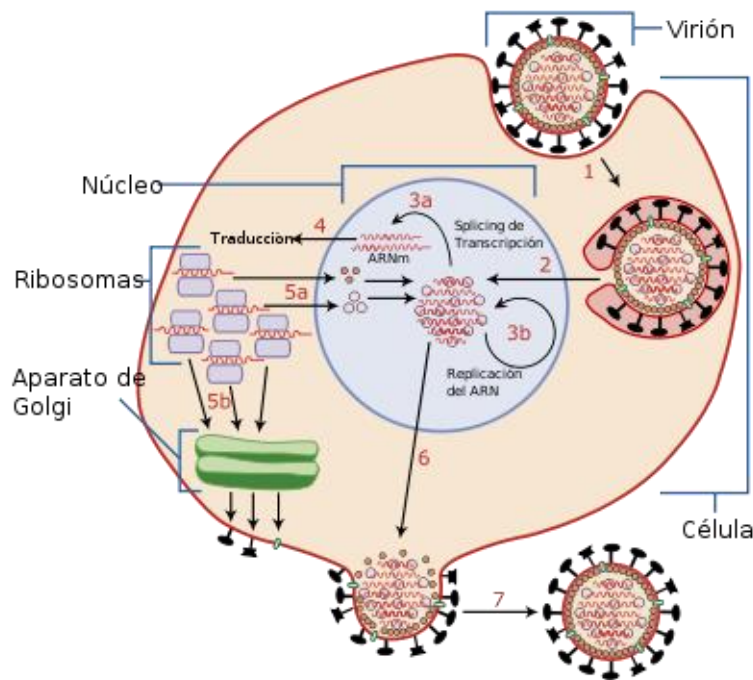


Figura 2. Ciclo de replicación del virus.

La replicación del material genético se produce en dos etapas, y para ello es necesario que algunas proteínas hayan podido ser traducidas. Se necesita un RNA citoplásico de sentido positivo que ha sido generado desde el RNA viral de sentido negativo, y este RNA positivo es el que sirve para que se sintetice nuevamente RNA negativo. La replicación no necesita que haya un promotor, por lo que la PB1 se une a los dos extremos del RNAv e inicia su replicación completa, sin utilizar la señal de poliadenilación para parar. Estos segmentos de RNAv pueden seguir dos caminos: o bien sirven como nuevas plantillas para la síntesis de más proteínas, o bien se unen a la NP, formando las RNPs, que finalmente son exportadas al citoplasma para ser ensambladas en los nuevos viriones(4,5).

Existen distintos grupos de fármacos que inhiben la acción de la polimerasa, como son:

- Inhibidores de la PB1, que son análogos de nucleótidos, cuya función es evitar que la polimerasa siga catalizando y, por lo tanto, finalizan su función. En este grupo se encuentra el *Favipinavir*.
- Inhibidores de PB2, como el *Pimodivir*, que intervienen en el proceso de unión de la caperuza *cap* a la subunidad, por lo que no se genera un mensajero RNA adecuado y no se puede llevar a cabo la traducción a proteínas.

- Inhibidores de la PA con actividad endonucleasa, como el *Baloxavir*, cuyo mecanismo de acción es mediante la quelación de los iones  $Mg^{+2}$  que se encuentran en el sitio activo de la enzima, evitando su funcionalidad.
- Moléculas de unión a NP, que se une al RNA y forman el complejo de ribonucleoproteínas. Estos fármacos evitan este complejo mediante su unión a la nucleoproteína, por lo que se evita la síntesis de RNA viral y el tráfico de las ribonucleoproteínas víricas en la células huésped.

La función de la endonucleasa es crucial para el ciclo del virus, ya que es una enzima que el virus necesita para su replicación, pues procesa los premensajeros de RNA para que sirvan como cebadores del mensajero RNA, y por ello, los inhibidores de esta enzima detienen la replicación del virus en una etapa temprana. En la proteína se pueden distinguir dos dominios, que son el N-terminal y el C-terminal, que se encuentran unidos por una cadena peptídica flexible larga. El sitio activo de la enzima consta de una bolsa con carga negativa a la que se unen dos iones divalentes de carga positiva, que pueden ser  $Mg^{+2}$  o  $Mn^{+2}$ , y esa localización es interesante para el diseño de fármacos porque la actividad de la endonucleasa es indispensable para la supervivencia del virus, porque los dominios del sitio de acción de la enzima están altamente conservados (lo que implica una elevada eficacia frente a múltiples serotipos del virus) y porque, al no existir una enzima igual en el ser humano, no hay riesgo de toxicidad, presentando una alta selectividad frente al patógeno. Los iones divalentes son críticos para la actividad de la endonucleasa, por lo que la estrategia de quelación de los metales puede ser eficaz para bloquear la actividad de la proteína<sup>(7)</sup>.

De acuerdo a su estructura química, los compuestos se pueden clasificar en varios grupos:

- Derivados diceto-ácidos – Mediante diversos ensayos se ha llegado a la conclusión de que la cadena 2,4-dioxobutanoica es indispensable para la actividad inhibitoria, ya que es esta estructura la que produce la quelación de los iones divalentes, y posteriormente se ha visto que al introducir dos “alas”, que son los anillos aromáticos, ocupan bolsas hidrofóbicas del lugar de acción de la enzima, interactuando con la misma y ayudando a mantener la molécula para que genere la quelación. De manera más específica, la quelación puede realizarse con el carboxilato unido en el primer ión y el  $\alpha$ -hidroxiácido unido al segundo, o bien con la estructura  $\beta$ -dicetona unida a ambos iones<sup>(8,9)</sup>.

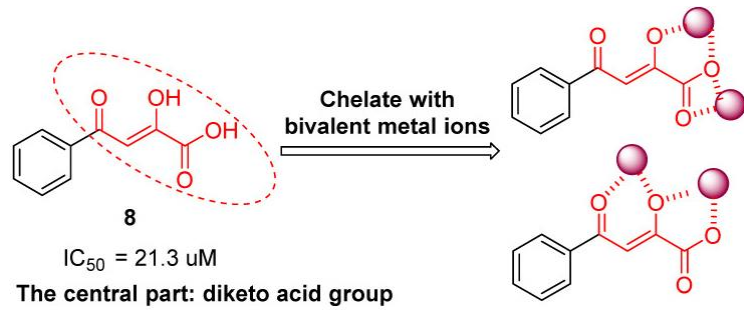
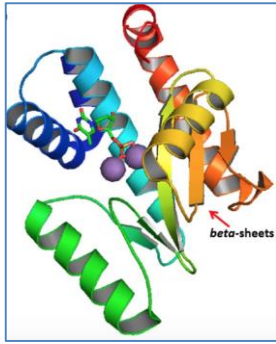


Figura 3. Izda. La RNA polimerasa con dTMP (verde) y 2 iones  $Mg^{+2}$  o  $Mn^{+2}$  (esferas moradas).

Dcha: Estructura química dicetoácida quelante del centro activo de la enzima.

- Derivados de flutimida – Son derivados de la molécula 2,6-dicetopiperazina, que es un metabolito fúngico que se ha aislado de la especie *Delitschia confertaspera*, y cuya acción se basa en la inhibición selectiva de la transcripción dependiente de la estructura *cap*, además de que tiene poder quelante de los iones divalentes de la endonucleasa, sin afectar a otras polimerasas. Los grupos N-hidroxilo y carboxilo del bezoilo son necesarios para la funcionalidad y la potencia, pero los análogos más activos han demostrado citotoxicidad celular. Posteriormente se han identificado nuevos derivados sustituidos con el grupo indol, que han presentado una potente actividad inhibitoria y menor toxicidad que los anteriores, quelando de igual manera los iones divalentes e introduciéndose también en los bolsillos hidrofóbicos de la enzima<sup>(10)</sup>.

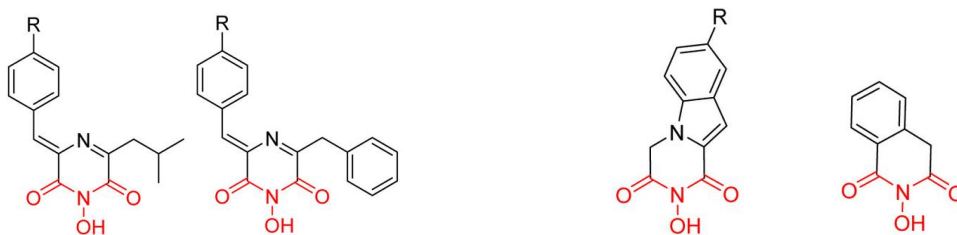


Figura 4. Izda. derivados de dicetopiperazina. Dcha. Derivados cíclicos.

- Heterociclos hidroxilados – Son un grupo de fármacos en los que se incluyen derivados de hidroxiquinolinonas, hidroxipirimidinonas e hidroxipiridinonas que tienen acción inhibitoria por quelación de los iones metálicos de la enzima. La manera en la que producen la inhibición de la enzima depende de cada compuesto, pero a grandes rasgos, en los compuestos de quinolina se forma un enlace de hidrógeno entre el grupo hidroxilo y la lisina del centro activo, mientras que el nitrógeno protonado interactúa con una molécula de agua para quelar el metal y los anillos aromáticos se introducen en los bolsillos hidrofóbicos. Se ha descubierto que la región lipofílica es muy importante en la inhibición de la endonucleasa, así como la distancia entre dicha región y el quelato, que es un factor crítico para la actividad<sup>(11,12)</sup>.

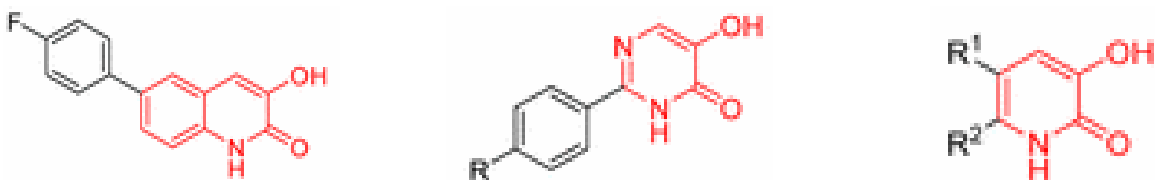


Figura 5. Izda. Derivados de hidroxiquinolina. Centro. Derivados de hidroxipirimidina. Dcha.

#### Derivados de hidroxipirimidina.

- Derivados de catecol (figura 6) – Los productos naturales que contienen un fragmento de catecol forman un grupo de compuestos bioactivos de los que, cada vez más, se descubren diversas y complejas actividades. En este caso, se ha descubierto que los grupos dihidroxiindol (catecol unido a un pirrol) o simplemente un catecol, se introduce en la zona activa de la enzima, y los grupos hidroxilo quelan los iones metálicos<sup>(7)</sup>.

Se ha utilizado un análogo de la talidomida para desarrollar una serie de moléculas con actividad inhibitoria de la endonucleasa, comprobando que con la inclusión de un grupo dihidroxifenilo aumentaba la potencia de manera notable, ya que este grupo desempeña un papel indispensable en la actividad de la molécula. Otros compuestos que también han mostrado actividad algunos compuestos del té, en los que la actividad inhibitoria se debe a la quelación de los iones divalentes por parte de grupos hidroxilos, mientras que los grupos aromáticos se unen a la bolsa activa<sup>(13,14)</sup>.

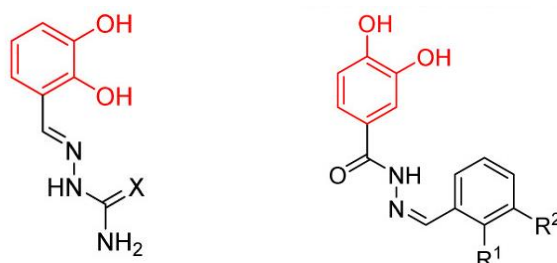


Figura 6. Derivados de catecol.

- Ácido 2,3-dihidroxibenzoico y bioisómeros del mismo – El bioisosterismo es una estrategia útil en la optimización y diseño de fármacos, y a través de un ensayo se ha demostrado que algunos bioisómeros de la molécula 2,3-dihidroxibenzoico inhiben la acción de la endonucleasa, y en este grupo, las moléculas activas cambian levemente la conformación de la enzima una vez que se han unido al centro activo, acabando así con la acción de la proteína.

En este grupo se encuentra la molécula RO-7, de la cual salió posteriormente otra molécula muy similar, la S-033188 (baloxavir marboxil), que a día de hoy ya se encuentra comercializada bajo el nombre de Xofluza®, de la que hablaremos posteriormente. La molécula RO-7, que químicamente es un compuesto fluorado de hidroxipirido-triazinadiona,

tiene actividad como inhibidor de la endonucleasa por su potencia de amplio espectro en ensayos *in vitro* frente al virus A y B, virus zoonóticos y mutaciones con resistencias a los inhibidores de la neuraminidasa, además de que ha demostrado una baja toxicidad y un índice de selectividad favorable<sup>(15)</sup>.

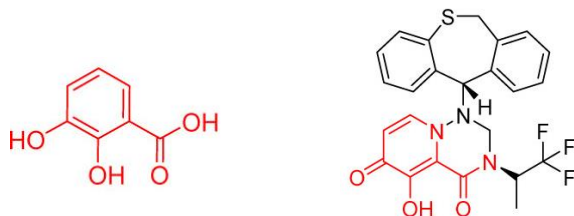


Figura 7. Izda. Ácido 2,3-dihidroxi benzoico. Dcha. RO-7.

- Otros – Todos los compuestos anteriormente descritos generalmente tienen actividad inhibitoria de la endonucleasa por se agentes quelantes de metales, pero en este grupo se encuentran algunas moléculas cuya actividad se debe a la unión de las mismas a sitios alostéricos de la enzima o mecanismos alternativos. En el año 2016 se descubrieron los compuestos PA-30 y ANA-0. PA-30 es un potente inhibidor de la endonucleasa con alta actividad frente al virus A, mientras que ANA-0 es un inhibidor de la replicación de múltiples subtipos del virus A en cultivos celulares, y se ha observado que presenta un efecto antiviral sinérgico con inhibidores de la neuraminidasa como el zanamivir, siendo esto un avance importante en el tratamiento frente a este patógeno<sup>(16)</sup>.

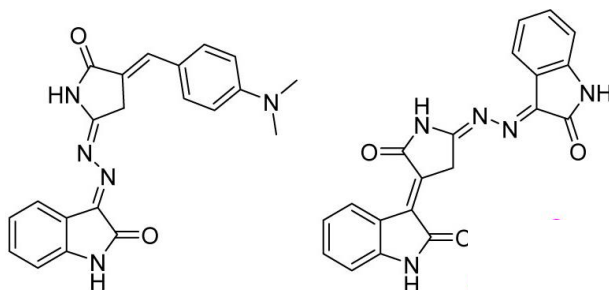


Figura 8 izquierda, compuesto PA-30. Figura 8 derecha, compuesto ANA-0.

Las resistencias pueden aparecer por mutación del objetivo, y por ello se intentan combinar tratamientos frente a distintas dianas, al igual que se hace con la tripe terapia antirretroviral para el tratamiento del VIH.

El baloxavir marboxilo (S-033188) (figura 9) es la única molécula inhibidora de la PA endonucleasa que a día de hoy se encuentra comercializado, bajo el nombre de Xofluza®, y fue aprobado por la FDA en octubre de 2018. Esta molécula es hidrolizada *in vivo* a S-033447, que es la forma activa que inhibe selectivamente la endonucleasa *dependiente de cap* (guanósina trifosfato metilada), enzima que requiere el virus para poder replicarse, de manera que no se

pueden sintetizar las proteínas necesarias para la generación de nuevos viriones. Es un fármaco de administración oral y una única dosis, y en los estudios no clínicos ha demostrado ser eficaz contra una amplia variedad de virus de la gripe, incluidas las cepas resistentes a oseltamivir y las cepas aviarias.

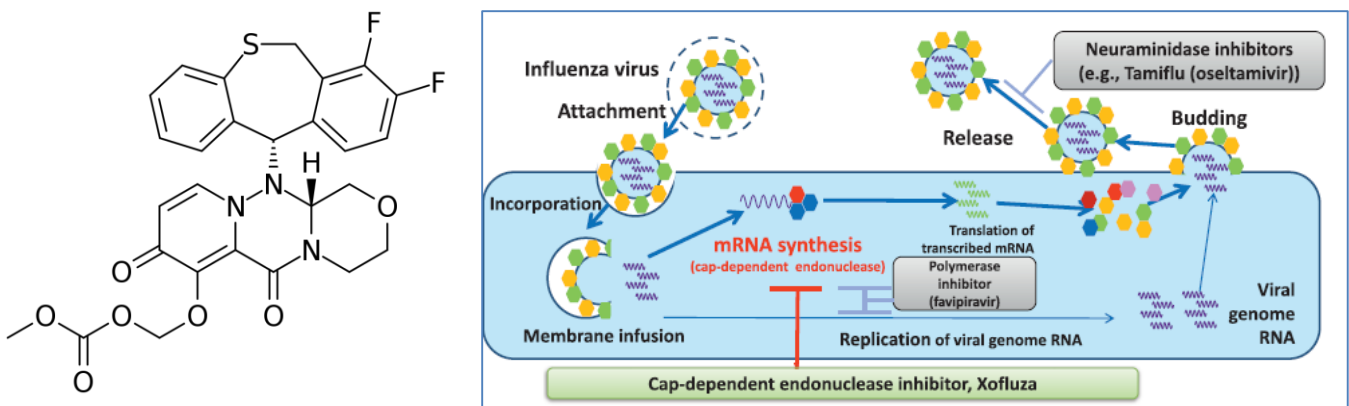


Figura 9. Baloxavir marboxilo y su mecanismo de acción.

El diseño del baloxavir se ha realizado por diseño molecular racional gracias al grupo farmacóforo del dolutegravir, que es un inhibidor de la integrasa del VIH, ya que tienen en común que ambas enzimas poseen en su sitio activo cationes divalentes. Como la proteína ácida con función endonucleasa está muy bien conservada en todas las cepas, el baloxavir es una terapia con gran especificidad y de amplio espectro. La molécula de baloxavir tiene forma de “mariposa”, de manera que una de las “alas” es la que produce la quelación de los metales (la que presenta los nitrógenos y los oxígenos en su estructura), mediante una coordinación octaédrica, y la otra “ala” es la que se une mediante fuerzas de Van der Waals con los residuos del bolsillo hidrofóbico.

Se ha encontrado variantes polimórficas en diversas posiciones de la enzima, como las variaciones en la posición 36, que si bien son raras, pueden afectar ligeramente a la susceptibilidad del fármaco con la enzima. Más importante es la sustitución en la posición I38, en la que se encuentra una isoleucina, que se puede sustituir por otros aminoácidos, aunque el cambio más significativo se produce en el caso de una treonina. Esta mutación genera una reducción en la interacción por fuerzas de Van der Waals entre el fármaco y la enzima, haciéndolo no efectivo, ya que el aminoácido treonina es más polar que la isoleucina. Además, en el caso del virus de la influenza B, cuya endonucleasa es ligeramente distinta (a pesar de que los dominios son altamente conservados), también hace que cambie el rotámero para que se pueda acomodar mejor su ligando natural, que es el RNA, generando así reordenamientos de ajustes locales. Todo esto solamente se genera cuando la sustitución es por una treonina, cuando

es por otras mutaciones, no se ven afectadas las funciones de la enzima, y tanto en el virus A como en el B, esta mutación produce que la capacidad replicativa de la enzima se vea deteriorada. Se ha comprobado que estas mutaciones solamente aparecen en pacientes infectados y en tratamiento con baloxavir<sup>(17)</sup>.

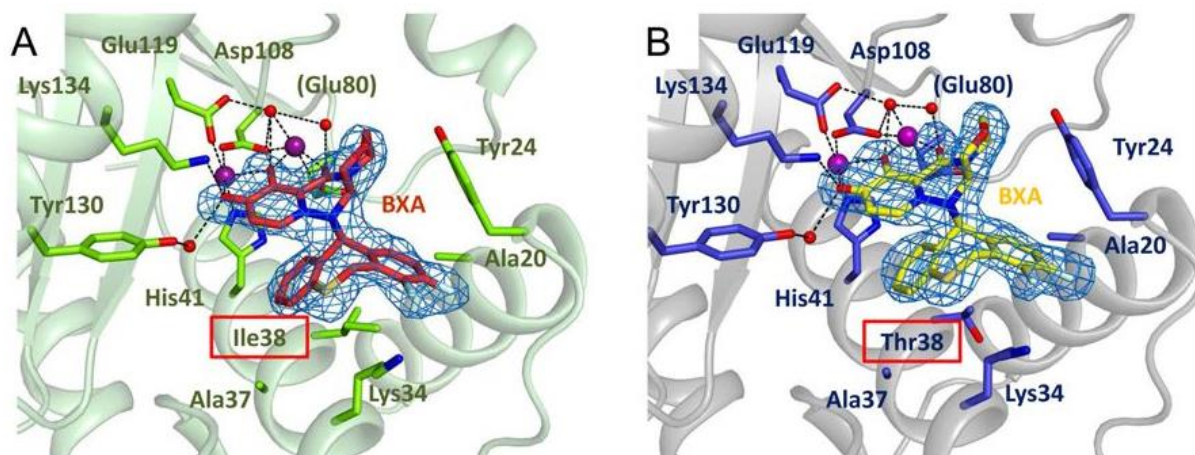


Figura 10. Estructura actividad del baloxavir con la enzima salvaje (izda) y la enzima mutada (dcha).

También se ha visto que el efecto de la unión entre el baloxavir y la enzima produce un incremento considerable de la estabilidad térmica de la proteína (entre 29°C y 32°C), lo que implica que la unión entre ambas moléculas es de alta afinidad mediante la formación de un complejo muy estable proteína-inhibidor, mientras que la mutación I38 por una Thr disminuye dicha estabilidad (aumento de solamente 10°C)<sup>(17)</sup>.

Xofluza® ha sido aprobado basándose en los resultados de fase 3 CAPSTONE-1 de una dosis de fármaco en comparación con placebo u oseltamivir 75 mg, dos veces al día durante 5 días, en personas sanas con gripe, así como resultados de un estudio controlado con placebo de fase 2 en personas sanas con gripe, y este fármaco redujo significativamente la duración de los síntomas en comparación con el placebo, y demostró una eficacia similar en comparación el oseltamivir. En dichos ensayos clínicos, Xofluza® fue seguro y bien tolerado, con un perfil de efectos secundarios similar al placebo<sup>(18)</sup>.

El estudio de 2016-2017 en 1.436 personas en EE.UU. y Japón fue un estudio aleatorizado, doble ciego, de grupos paralelos, multicéntrico, con placebo y de control activo, que mostró que una dosis oral reduce el tiempo en que las personas están enfermas, pasando de 3,3 días a 2,5 días aproximadamente, reduce el tiempo en el que los pacientes tienen fiebre, de 42 horas a 24 horas, y disminuye la diseminación viral de 4 días a un día<sup>(19)</sup>.

Baloxavir puede prevenir la replicación viral por acción sobre la endonucleasa del patógeno, y de esta manera se logra un alivio sintomático en 24 horas, según los resultados publicados en el ensayo clínico CAPSTONE-1. Además, baloxavir ha demostrado una excelente eficacia antiviral *in vitro* e *in vivo* frente a otras cepas del virus de la gripe.

La nucleoproteína (NP) tiene un papel fundamental en la replicación viral, siendo la proteína más abundante en las células infectadas, aunque solamente tiene función estructural, no tiene función catalítica. Dentro de las funciones de esta proteína se encuentran el empaquetamiento del RNA, el tráfico nuclear (movilización del material genético dentro del núcleo una vez que ya se encuentra en el citoplasma de la célula huésped y movilización del nuevo material replicado para la formación de los viriones) y la replicación del RNA viral.

La proteína interactúa con el material genético, de manera que cada NP se puede unir a 24 bases, y se ensambla en oligómeros mediante un bucle de cola flexible, insertándose con otras NP. Además, la proteína también interactúa con las subunidades PB1 y PB2 de la polimerasa. Según estudios de microscopía, la unidad mínima de ribonucleoproteína (RNP) comprende una polimerasa viral y 9 monómeros de NP dispuestos en una estructura en forma de barra<sup>(20)</sup>. El papel multifuncional de la NP junto con la alta conservación de su secuencia hacen que sea una diana farmacológica perfecta. Los inhibidores de esta proteína se han identificado por métodos genéticos químicos, y existen diferentes clases de inhibidores con diversos mecanismos de acción:

- Inhibidores dirigidos al bolsillo de unión de la cola y el bucle – El puente salino que se genera es esencial para la oligomerización de la proteína y para la actividad con las RNPs virales, y evitar este puente es una forma de inhibir la actividad. Existe un oligopéptido cíclico que inhibe la actividad de manera muy pobre, probablemente porque su penetración celular es muy débil, y han conseguido mediante diseño racional crear un compuesto que inhibe la trimerización e induce la formación de monómeros, por lo que la proteína no puede ejercer su actividad<sup>(21)</sup>.
- Nucleozina y sus análogos – La nucleozina se descubrió como inhibidor de la NP sometiendo al virus a experimentos de concentraciones crecientes del potencial antiviral y a sus análogos cercanos, y así pudieron comprobar que si la proteína sufre una serie de mutaciones, estos análogos no eran efectivos. Las interacciones clave para que funcionen los inhibidores incluyen un puente de hidrógeno y un enlace hidrofóbico entre el fármaco y la proteína.



La nucleozina tiene una excelente actividad celular *in vitro*, pero tiene baja solubilidad en agua y una estabilidad metabólica deficiente en los microsomas hepáticos de ratón, y por ello se han intentado buscar análogos que suplan esta problemática<sup>(22)</sup>.

El compuesto PPQ581 se encontró en el mismo estudio en el que se identificó la nucleozina, y se probó que ambos compuestos funcionan de la misma manera, que es ejerciendo actividad antiviral frente a la NP. Es necesaria una interacción por enlace de hidrógeno entre un grupo carbonilo y un grupo hidroxilo de la cadena lateral de la proteína<sup>(26)</sup>.

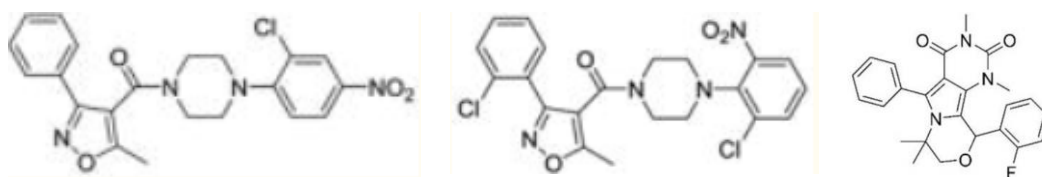


Figura 11. Izda. Nucleozina. Centro. Análogo de nucleozina. Dcha. Compuesto PPQ581.

- Inhibidores de la NP dirigidos al surco de unión del ARN – El primer inhibidor que se dirige al surco de unión es el llamado F66, que inhibe varias cepas del virus de la gripe A, pero no es efectivo frente al virus B, y esto es así debido a las diferencias en la secuencia de algunos aminoácidos de la proteína NP. También se ha comprobado que el naproxeno (potente inhibidor de la ciclooxigenasa-2, y por lo tanto, antiinflamatorio) puede inhibir de manera eficaz el funcionamiento de la NP, ya que el carboxilato de este fármaco forma interacciones iónicas con una de las guanidinas del aminoácido arginina que se encuentra conformando la proteína. A partir de esto, y tras evaluar que efectivamente el naproxeno puede competir con el ARN por la unión del mismo a la NP, se están buscando análogos que puedan ser más eficaces, ya que, si existe una mutación en dicha arginina, la unión no se produce, por lo que tampoco se produce la inhibición de la función de NP<sup>(23,24)</sup>.

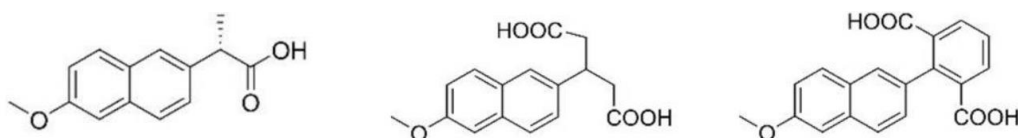


Figura 11 izquierda, naproxeno. Figuras 11 centro y 11 derecha, análogos de naproxeno.

- RK424 – Este compuesto tiene actividad antiviral de amplio espectro frente a múltiples cepas de influenza A, y los estudios mecanicistas sugirieron que la molécula inhibe las etapas tempranas de la replicación viral, en concreto, la actividad de las RNPs víricas, mediante la restricción de la exportación de NP desde el núcleo. Esta interacción de carácter iónico se lleva a cabo entre el ácido carboxílico de la molécula y una guanidina de la cadena lateral

de la proteína, siendo este enlace crítico para la inhibición de la función de NP, y también es importante la interacción hidrofóbica que se genera entre los anillos bifenilos y los residuos circundantes. La eficacia es menor que la del oseltamivir, aunque se ha encontrado que tiene un efecto sinérgico combinado con el mismo. Desde una perspectiva química, la quinolina parece ser un farmacóforo potente, tal y como se ha probado con la cloroquina (fármaco para el tratamiento del paludismo), que inhibe tanto la gripe A como la B, ya que actúa como un aceptor de protones en el endosoma, evitando la disminución del pH que hace que el ciclo del virus pueda continuar<sup>(25)</sup>.

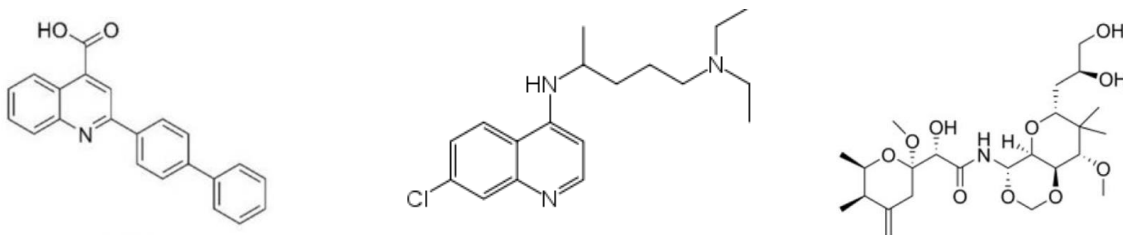


Figura 12. Izda. Compuesto RK424. Dcha. Cloroquina. Figura 13. Micalamida A.

- Inhibidores de NP de los que no se conoce su mecanismo de acción – Se ha identificado un péptido rico en prolina que se une a la proteína NP y lo único que se sabe sobre su manera de actuación es que se une a un dominio de la proteína y el conjugado inhibe la replicación del virus de la gripe A, pero aún está en estudio el mecanismo molecular de inhibición y cómo el péptido se une a la NP.

También se han encontrado varios análogos de la micalamida A (figura 13) (metabolitos secundarios producidos por esponjas marinas que se han probado para el tratamiento del herpes simple y del VIH) que tienen una inhibición moderada frente al virus de la gripe A, con una buena correlación entre la afinidad de unión a NP y su eficacia antiviral in vitro<sup>(27)</sup>.

## CONCLUSIONES.

El virus de la gripe es un problema de salud pública a nivel mundial, ya que se cobra entre 250.000 y 500.000 vidas al año, a pesar de la existencia de vacunas y tratamientos. Sin embargo, la efectividad de las vacunas se limita a individuos inmunocompetentes, mientras que en pacientes ancianos o inmunocomprometidos, no son suficiente, y el virus genera mutaciones continuamente, por lo que se reduce su efectividad.

Así mismo, los medicamentos frente a este patógeno tienen limitaciones, ya que cada año parecen más cepas resistentes, y no se pueden utilizar como profilaxis. Por ello, ha surgido la necesidad de abordar el problema desde otros frentes, y mediante el conocimiento de la

bioquímica del virus, han ido apareciendo nuevas dianas que son prometedoras para el tratamiento de la infección. La aparición de técnicas de cristalización de proteínas y su conocimiento han hecho posibles la generación de distintas moléculas mediante el diseño racional de fármacos.

Aún así, todavía quedan muchas moléculas que siguen en estudio, dado que solamente el *Baloxavir* ha sido aprobado en algunos países, y muchas de ellas no serán viables puesto que, aunque tengan actividad *in vitro*, se tiene que probar que también la tengan *in vivo*, por lo que aún queda mucho camino por recorrer.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. WHO. Influenza.
2. Monto, A.S and Webster, R.G (2013). Influenza pandemics: History and lessons learned. In R.G.W. FRS, A.S.M. MD. T.J.B. MD. and R.A.L. ScD. (Eds). Textbook of influenza (p. 20-34).
3. Nayak, D. Shivakoti, S. Balogun, R.A. Lee, G. and Zhou, Z.H. (2013). Structure, disassembly, assembly and budding of influenza virus. In R.G.W. FRS, A.S.M. MD, T.J.B. MD, and R.A.L. ScD (Eds). Textbook of influenza (p. 35-56).
4. Arranz Ávila, R. Análisis estructural de la ribonucleoproteína nativa del virus de la gripe. Tesis doctoral. Madrid. Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 2013.
5. Mota Rojas, X. El virus de la gripe: Patógeno emergente y reemergente. Tesis doctoral. Santiago de Compostela. Complejo Hospitalario de Santiago. 2014.
6. Shuofeng, Y., Lei, W., Zhou, J. Inhibitors of influenza A virus polymerase. ACS Infectious Diseases 2018, 4 (3), 218-223.
7. Ju, H., Zhang, J., Huang, B., Kang, D., Huang, B., Liu, X., Zhan, P. Inhibitors of influenza virus polymerase acidic (PA) endonuclease: contemporary developments and perspectives. Journal of Medicinal Chemistry 2017, 60 (9), 3533-3551.
8. Stevaert, A., Nurra, S., Pala, N., Carcelli, M., Rogolino, D., Shepard, C., Domaoal, R., Kim, B., Alfonso-Prieto, M., Marras, S.A., Sechi, M., Naesens, L. An integrated biological approach to guide the development of metal-chelating inhibitors of influenza virus PA endonuclease. Mol. Pharmacol. 2015, 87, 323-337.
9. Ishikawa, Y., Fujii, S. Binding mode prediction and inhibitor design of anti-influenza virus diketo acids targeting metalloenzyme RNA polymerase by molecular docking. Bioinformation 2011, 6, 221-225.
10. Zoidis, G., Giannakopoulou, E., Stevaert, A., Frakolaki, E., Myriantopoulou, V., Fytas, G., Mavromana, P., Mikros, E., Bartenschlager, R., Vassilaki, N., Naesens, L. Novel indole-flutimide heterocycles with activity against influenza PA endonuclease and hepatitis C virus. MedChemComm 2016, 7, 447-456.
11. Sagong, H. Y., Parhi, A., Bauman, J.D., Vijayan, R.S., Das, K., Arnold, E., LaVoie, E.J. 3-hydroxyquinolin-2-(1H)-ones as inhibitors of influenza A endonuclease ACS Med.Chem.Lett. 2013, 4, 547-550.
12. Sagong, H.Y., Bauman, J.D., Patel, D., Das, K., Arnold, E., LaVoie, E.J. Phenyl substituted 4-hydroxypyridazin-3(2H)-ones and 5-hydroxypyrimidin-4(3H)-ones: inhibitors of influenza A endonuclease. J.Med.Chem. 2014, 57, 8086-8098.

13. Iwai, Y., Takahashi, H., Hatakeyama, D., Motoshima, K., Ishikawa, M., Sugita, K., Hashimoto, Y., Harada, Y., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Sei, Y., Yamaguchi, K., Kuzuhara, T. Anti-influenza activity of phenethylphenylphthalimide analogs derived from thalidomide. *Bioorg.Med.Chem.* 2010, 18, 5379-5390.
14. Song, J.M., Lee, K.H., Seong, B.L. Antiviral effects of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Res.* 2005, 68, 66-74.
15. Carcello, M., Rogolino, D., Bacchi, A., Rispoli, G., Fiscaro, E., Compari, C., Sechi, M., Stevaert, A., Naesens, L. Metal-chelating 2-hydroxyphenyl amide pharmacophore for inhibition of influenza virus endonuclease. *Mol.Pharm.* 2014, 11, 304-316.
16. Yuan, S., Chu, H., Singh, K., Zhao, H., Zhang, K., Kao, R.Y., Chow, B., Zhou, J., Zheng, B. J. A novel small molecule inhibitor of influenza A virus acts by suppressing PA endonuclease activity of the viral polymerase. *Sci. Rep.* 2016, 6, 22880.
17. Omoto, S., Speramzini, V., et al. Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor Baloxavir Marboxil. *Scientific Reports*, published online 25 June 2018.
18. Takeki Uehara. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of S-033188, an influenza cap-dependent endonuclease inhibitor, from a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled study in otherwise healthy adults with seasonal influenza. *27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2017.
19. Baloxavir. Asociación de Microbiología y Salud (AMYS). Junio 2018.
20. Hu, Y., Sneyd, H., Dekant, R., Wang, J. Influenza A virus nucleoprotein: a highly conserved multi-functional viral protein as a hot antiviral drug target. *Curr Top Med Chem.* 2017. 17(20): 2271-2285.
21. Su, C.Y., Cheng, T.J.R., Lin, M.I., Wang, S.Y., Huang, W.I., Lin-Chu, S.Y., Chen, Y.H., Wu, C.Y., Li, M.M.C., Cheng, W.C., Wu, Y.T., Tsai, M.D., Cheng, Y.S.E., Wong, C.H. High throughput identification of compounds targeting influenza RNA-dependent RNA polymerase activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010. 107(45): 19151-19156.
22. Fedichev, P., Timakhov, R., Pyrkov, T., Getmantsev, E.A.V. Structure-based drug design of a new chemical class of small molecules active against influenza A nucleoprotein in vitro and in vivo. *PLoS Curr.* 2011:RRN1253.
23. Tarus, B., Bertrand, H., Zedda, G., Di Primo, C., Quideau, S., Slama-Schwok, A. Structure-based design of novel naproxen derivatives targeting monomeric nucleoprotein of influenza A virus. *J Biomol Struct Dyn.* 2014. 33(9): 1899-1912.
24. Sasaki, Y., Kakisaka, M., Chutiwitoonchai, N., Tajima, S., Hikono, H., Saito, T., Aida, Y., Identification of a novel multiple kinase inhibitor with potent antiviral activity against influenza virus by reducing viral polymerase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014. 450(1): 49-54.
25. Ooi, E.E., Chew, J.S.W., Loh, J.P., Chua, R.C.S. In vitro inhibition of human influenza A virus replication by chloroquine. *Virology.* 2006. 3:39-39.
26. Lin, M.I., Su, B.H., Lee, C.H., Wang, S.T., Wu, W.C., Dangate, P., Wang, S.Y., Huang, W.I., Cheng, T.J., Lin, O.A., Cheng, Y.S.E., Tseng, Y.J., Sun, C.M. Synthesis and inhibitory effects of novel pyrimido-pyrrolo-quinoxalinedione analogues targeting nucleoproteins of influenza A virus H1N1. *Eur J Med Chem.* 2015. 102:477-486.
27. Jiang, H., Xu, Y., Li, L., Weng, L., Wang, Q., Zhang, S., Jia, B., Hu, H., He, Y., Jacob, Y., Toyoda, T. Inhibition of influenza virus replication by constrained peptides targeting nucleoprotein. *Antiviral Chem Chemother.* 2011. 22(3):119-130.