



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM  
POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

DESARROLLO DE FÁRMACOS CONTRA LA  
HEMAGLUTININA Y NEURAMINIDASA DEL  
VIRUS DE INFLUENZA A (H1N1) POR MEDIO DE  
UNA ESTRATEGIA BASADA EN BÚSQUEDA DE  
FRAGMENTOS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A:**

**MARCO IGOR VALENCIA  
SÁNCHEZ**

Tutor: DR. ALFREDO TORRES LARIOS

MÉXICO, D. F.

Enero 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## RECONOCIMIENTOS:

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Alfredo Torres Larios en el laboratorio 205 Sur del Departamento de Bioquímica y Biología Estructural del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Alfredo Torres Larios	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Armando Gómez Puyou	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra Lilian González Segura	Facultad de Química, UNAM.

Se reconoce la colaboración del Dr. Benito Antón Palma del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, en cuyo laboratorio se realizaron las lecturas de fluorescencia en el equipo lector multifunción de microplacas. Se reconoce la colaboración del Dr. Miguel Antonio Costas Basín de la Facultad de Química y la Dra. Laura Álvarez Berber del CIQ, UAEM, quienes realizaron el análisis por RMN de algunos fragmentos químicos.

En el INER:

Se reconoce la asesoría técnica del Biol. Fidencio Mejía Nepomuceno en la realización de los cultivos celulares. Se reconoce al Dr. Carlos Cabello González por la asesoría con el trabajo con el virus y para conseguir los materiales de cultivo. Se reconoce la colaboración de la Dra. María Eugenia Manjarréz por la posibilidad de trabajar en las instalaciones del departamento de virología. Se reconoce el apoyo del médico Miguel Ángel Galván Morales por la ayuda para conseguir los inhibidores de la NA.

El proyecto fue apoyado parcialmente por el ICyTDF al proyecto No. PIFUTP-279 y PAPIIT-UNAM IN202910-3. Durante los estudios de maestría se tuvo el apoyo de una beca otorgada por CONACYT con No. de registro 348053.

El Jurado de Examen de grado estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Armando Gómez Puyou	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Vocal	Dra. Laura Álvarez Berber	Centro de Investigaciones Químicas, UAEM.
Vocal	Dr. Luis Padilla Noriega	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Vocal	Dr. Mauricio Alberto Trujillo Roldán	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
Secretario	Dra. Susana López Charretón	Instituto de Biotecnología, UNAM

## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Dr. Armando Gómez Puyou por la paciencia, discusiones y sugerencias para la resolución de algunos problemas que se presentaron durante el desarrollo de este trabajo.

A María Luisa Valencia (mi madre) por el financiamiento durante la escritura de la Tesis.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Carátula.....	1
RECONOCIMIENTOS.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	4 a 5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6 a 7
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
RESUMEN.....	9
ABREVIATURAS.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11 a 26
1.1 Neuraminidasa y hemaglutinina del virus de influenza.....	11
1.2 Producción del virus de influenza .....	16
1.3 Diseño de fármacos.....	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
3. HIPÓTESIS.....	27
4. OBJETIVOS .....	27
4.1 Objetivos general.....	27
4.2 Objetivos específicos.....	27
5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	28
6. MATERIALES.....	28
7. METODOLOGÍA.....	28 a 39
7.1 Cultivo celular y producción viral.....	28
7.2 Ensayos de actividad y escrutinio.....	31
7.3 Ensayo de actividad de la hemaglutinina.....	31
7.4 Escrutinio de actividad inhibitoria sobre la HA.....	32
7.5 La neuraminidasa.....	33
7.6 Ensayo de actividad de la neuraminidasa.....	33
7.7 Escrutinio de inhibición de la neuraminidasa.....	35
7.8 Identidad de los compuestos inhibidores de la neuraminidasa.	37

8. RESULTADOS.....	39 a 63
8.1 Cultivo celular y producción viral.....	40
8.2 Ensayos de actividad y escrutinio.....	44
8.3 Ensayo de actividad de la HA.....	44
8.4 Escrutinio de actividad inhibitoria sobre la HA.....	46
8.5 Ensayo de actividad de la NA.....	51
8.6 Escrutinio de inhibición de la neuraminidasa.....	55
8.7 Identidad de los compuestos inhibidores de la neuraminidasa	59
9. DISCUSIÓN.....	64 a 77
9.1 Virus producido en células de mamífero.....	64
9.2 Efecto del DMSO sobre la hemaglutinación.....	69
9.3 Aplicación de la reacción de la neuraminidasa.....	69
9.4 Detección de fragmentos con actividad sobre la HA y la NA..	70
9.5 Fragmentos inhibidores de la HA.....	72
9.6 Fragmentos inhibidores de la NA.....	72
9.7 Los otros compuestos .....	77
10. CONCLUSIONES.....	79
11. PERSPECTIVAS.....	80
12. APÉNDICE.....	81-106
Inactivación del virus y titulación por tinción immunofluorescente.....	81
Neuraminidasa del <i>Clostridium perfringens</i> IX.....	83
Enzima neuraminidasa recombinante (Nar).....	84
Ensayo aproximación estilo HTS completo.....	85
Actividad del compuesto APiB (4G07) puro sobre la NAr...	91
Identidad de los compuestos 4G07 y 8A10 por RMN.....	92
Intentos de expresión de la recombinante.....	95
13. BIBLIOGRAFÍA .....	99-105

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura	Página
Fig 1. Estructura tridimensional de la HA y la NA del virus de la influenza.....	12
Fig 2. Estructura de inhibidores de la NA.....	14
Fig 3. Estructura de compuestos inhibidores alternativos de la infección por influenza. .....	16
Fig 4. Generación de bibliotecas de compuestos químicos. Química combinatoria y diversidad química.....	26
Fig 5. Células MDCK en cultivo adherente en botella T y en cultivo sobre microacarreadores en suspensión.....	42
Fig 6. Cinética de producción de virus (en UHA' s) por infección con el vH1N1 a distintas MOI.....	43
Fig 7. Cuantificación por hemaglutinación de la producción de virus de la influenza A (H1N1) en cultivo en suspensión sobre microacarreadores en medio SFM.....	44
Fig 8. Efecto de distintas concentraciones de DMSO sobre el título de la hemaglutinación.....	46
Fig 9. Ejemplo de detección del compuesto 1G05 por inhibición de la hemaglutinación (HI).....	48
Fig 10. Curvas de concentración inhibitoria de la hemaglutinación (HI) del compuesto 1G05. ....	48
Fig 11. Curvas de concentración inhibitoria de la hemaglutinación (HI) de los compuestos 1F06, 5C06, 5A03 y 9B06.....	49
Fig 12. Compuestos positivos que presentan una inhibición de la hemaglutinación (HI) dependiente del tiempo.....	50
Fig 13. Comportamiento de la NAr y la neuraminidasa del vH1N1 con respecto al tiempo de la reacción. ....	52
Fig 14. Proporcionalidad de la reacción a la cantidad de enzima NAr.....	53
Fig 15. Efecto de la pre-incubación con DMSO sobre la actividad de la NAr.....	54
Fig 16. Efecto del Oseltamivir y el Zanamivir sobre la NAr y la neuraminidasa del vH1N1. ....	55
Fig 17. Tratamiento estadístico del escrutinio estilo HTS de compuestos con posible actividad inhibitoria sobre la NAr. ....	56
Fig 18. Curvas de concentración inhibitoria de la NAr para los compuestos 9H02 y 3H08.....	58
Fig 19. Espectro de resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup> C del compuesto 9H02 (1- azepanil (3-piperidinil) metanona).....	60

Fig 20. Espectro de resonancia magnética nuclear de DEPT a 135o y 90o (100 MHz, CD3OD) del compuesto 9H02 (1-azepanil (3-piperidinil) metanona).....	61
Fig 21. Efecto de la 1-azepanil (3-piperidinil) metanona AzPM sobre la NAr en presencia de calcio. ....	63
Fig 22. Efecto de la adición de EDTA a la NAr y la neuraminidasa del vH1N1.....	64
Fig 23. Ejemplo del proceso de diseño de un fármaco mediante fusión de fragmentos. ....	74
Fig 24. Comprobación de inactivación con iminas del virus de la influenza A H1N1 México 2009 mediante titulación por inmunofluorescencia. ....	81
Fig 25. Ensayos de actividad de hemaglutinante del virus de la influenza A (H1N1) tratado en distintas condiciones .....	82
Fig 26. Efecto del DMSO 10% sobre el título de la Hemaglutinación.....	83
Fig 27. Comportamiento de la NAclos con respecto al tiempo de reacción.....	83
Fig 28. Efecto de la concentración de DMSO sobre la actividad de la NAclos a pH=4.6.....	84
Fig 29. Extracto de células HEK293 expresando la Neuraminidasa recombinante NArH1N1 en su forma activa.....	84
Fig 30. Comportamiento de la fluorescencia en función de la concentración de la 4-metil umbeliferona.....	85
Fig 31. Tratamiento estadístico completo del escrutinio de la biblioteca de compuestos con posible actividad inhibitoria de la NAr.....	87-89
Fig 32. Curvas de concentración inhibitoria para algunos compuestos inhibidores de la NAr.....	90
Fig 33. Efecto inhibitorio de compuestos positivos combinados con el Oseltamivir .....	91
Fig 34. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H del compuesto 4G07.....	93
Fig 35. Uno de los contaminantes detectados del análisis del compuesto 4G07 por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	94
Fig 36. Efecto citopático característico por la infección por baculovirus en las células Sf9 y curva de muerte característica de la infección. ....	96
Fig 37. Ensayo de expresión de células Sf9 infectadas con los baculovirus recombinantes vb-HA y vb-NA.....	97
Fig 38. Transferencia Western de las proteínas producidas en el sistema de baculovirus.....	97



## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla	Página
Tabla 1. Cuadro comparativo de rendimiento de obtención de UHA's en distintos sistemas de proliferación de virus en células MDCK.....	18
Tabla 2. Estructura de compuestos positivos resultado del escrutinio sobre la Hemaglutinina del virus H1N1.....	47
Tabla 3. Estructura de compuestos positivos para inhibir a la NAr resultado del escrutinio.....	57
Tabla 4. Inhibición de la NAr y la neuraminidasa del <i>vH1N1</i> por los compuestos identificados y corroborados.....	62
Tabla 5. Características de los compuestos positivos evaluados para tener inhibición de sobre la NAr y la neuraminidasa del <i>vH1N1</i> .....	86
Tabla 6. Determinación de la existencia de actividad de Neuraminidasa en el extracto de células COS-7 transfectadas con el vector pCMV5-NA.....	98

## RESUMEN

La infección por el virus de la influenza inicia con la unión de la hemaglutinina (HA) al receptor celular (una glicosilación terminal de ácido siálico de proteínas o lípidos), promoviendo la fusión de las membranas celular y viral. La neuraminidasa (NA) cataliza el corte del enlace del ácido siálico, destruyendo los receptores a la infección viral; esta actividad de la NA es esencial para la diseminación de la infección, ya que impide la auto-agregación de los viriones y facilita la liberación de los virus unidos a la superficie de la célula.

Basados en los principios del diseño de fármacos por búsqueda de fragmentos, en el presente trabajo se realizó el escrutinio de la biblioteca Maybridge Ro3 de 1000 fragmentos químicos, evaluando el efecto de los compuestos sobre la HA y NA del virus de la influenza humana. La neuraminidasa recombinante se incubó con los compuestos y se estimó la inhibición de actividad de la enzima, detectando el producto fluorescente de la reacción. El escrutinio de la HA se realizó determinando la inhibición de actividad hemaglutinante del virus de influenza al ser incubado con los compuestos. El virus de influenza A (H1N1) México/2009 empleado en los ensayos, fue producido en células MDCK creciendo sobre microacarreadores en suspensión en medio libre de suero.

Como resultado del escrutinio se encontraron 5 compuestos inhibidores de la HA y 13 compuestos inhibidores de la NA. El compuesto 1-azepanil (3-piperidinil) metanona (AzPM) y el compuesto 6-aminoquinoxalina (AQA), con actividad sobre la NA, fueron evaluados con mas profundidad. La identidad y pureza del compuesto AzPM fue confirmada por RMN de  $^{13}\text{C}$ . El compuesto AzPM fue confirmado como inhibidor de la NA recombinante. Se encontró que la inhibición de la NA por el AzPM disminuye en presencia de calcio. Ya que el calcio está involucrado en mantener la estabilidad térmica y la estructura cuaternaria de la NA, se sugiere que el AzPM tiene actividad sobre el oligómero de la NA. El compuesto AQA 95% puro, fue confirmado como inhibidor de la NA en el contexto del virión de la influenza A (H1N1).

## ABREVIATURAS

**APIB:** 4-(1H-pirrol-1-il) benzoico (APIB)  
**AQA:** 6-Aminoquinoxalina  
**ATCC:** American Tissue Culture Collection  
**AzPM:** 1-azepanil (3-piperidinil) metanona  
**Da:** Daltones  
**DEAE:** Dietil aminoetil  
**DEPT:** Distorsionless Enhancement Polarization Transfer: Incremento sin distorsión por transferencia de polarización.  
**DMSO:** Dimetil sulfóxido  
**DANA:** ácido 2-desoxi-2,3-dide-hidro-N-acetilneuramínico  
**FANA:** ácido 2-desoxy-2,3-dehidro-N-trifluoroacetil neuramínico  
**FBDD:** Fragment based drug design: Diseño de fármacos basado en fragmentos  
**Fig.:** Figura  
**HA:** Hemaglutinina  
**HI:** Inhibición de la hemaglutinación  
**hpi:** horas post-infección  
**hr:** hora  
**hrs:** horas  
**HTS:** High-throughput screening: Escrutinio de alto rendimiento.  
**INER:** Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias  
**kDa:** kilodaltones  
**MDCK:** Madin-Darby Canine Kidney cells: células de riñón canino Madin-Darby.  
**SFM:** Serum-free medium: medio libre de suero.  
**MEM:** Medio esencial mínimo.  
**MES:** ácido 2-N-morfolino etanosulfónico  
**mM:** (milimolar), **mg** (miligramo), **mL**(mililitro), **μM**(micromolar), **μg**(microgramo), **μL**(microlitro), **nM**(nanomolar), **ng**(nanogramo), **nL**(nanolitro).  
**MOI:** Multiplicity of infection; Multiplicidad de infección  
**MUNANA:** 2'-(4-Metilumbeliferil)-α-D-N-acetilneuraminidato de sodio  
**NA:** Neuraminidasa  
**NAcIos:** Neuraminidasa de *Clostridium perfringens*  
**NAI:** Inhibidores de la neuraminidasa  
**NAr:** Neuraminidasa recombinante  
**NP:** Nucleoproteína  
**PBS:** Phosphate Buffered Saline, Solution: Solución salina amortiguadora de fosfatos.  
**PDB:** Proteín Data Bank: Banco de datos de proteínas  
**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear.  
**RNP:** Ribonucleoproteína  
**SAR:** Structure-Activity Relationship: Relación estructura-actividad  
**SDS-PAGE:** Sodium Dodecil Sulfate-Poliacrilamide Gel Electroforesis: Electroforesis en gel de poliacrilamida con sodio dodecil sulfato.  
**TCID:** Tissue Culture Infective Dosis: Dosis infectiva de cultivo de tejidos  
**TOI:** Time of Infection: Tiempo de infección  
**u.m.a.s:** Unidades de Masa Atómica.  
**PFU:** Unidad Formadora de Placa  
**UHA:** Unidad de Hemaglutinación  
**vH1N1:** virus de influenza A (H1N1) 2009 México  
**WHO:** World Health Organization: OMS: Organización Mundial de la Salud.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 NEURAMINIDASA Y HEMAGLUTININA DEL VIRUS DE INFLUENZA

El virus de la influenza es un virus esférico no uniforme, con un diámetro aproximado de 100 nm, envuelto por una bicapa lipídica derivada del huésped con espículas que se extienden de forma radial. El genoma del virus es RNA negativo segmentado, constituido por 8 segmentos que codifican las 10 proteínas virales. Dicho RNA se encuentra dentro de una cápside con forma de varilla, formada por múltiples subunidades de la nucleoproteína (NP), y se asocia con algunas moléculas de la polimerasa trimérica (PB1, PB2 y PA), formando el complejo de ribonucleoproteína (RNP).

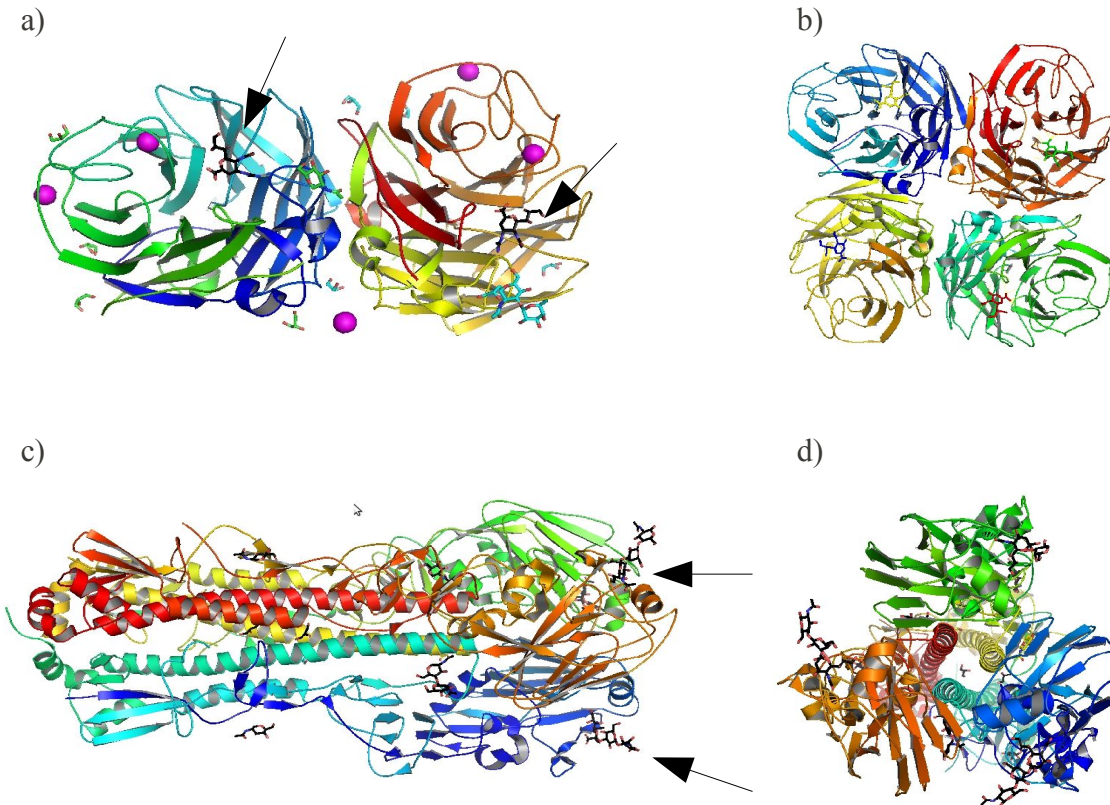
Rodeando la RNP existe una capa de 6 nm de la proteína de matriz M1, que constituye el nexo entre el núcleo viral y la envoltura lipídica derivada de la célula hospedera. Dicha envoltura se halla “decorada” con las 2 glicoproteínas virales principales: la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), y algunas moléculas de la proteína integral no-glicosilada M2 con función de canal de iones (figura 1) (Latham y Galarza, 2001).

La proteína hemaglutinina está constituida por 2 cadenas polipeptídicas HA1 y HA2 que se forman por proteólisis del precursor HA0 (activación de la hemaglutinina), aunque permanecen unidas por un puente disulfuro. La HA se encuentra en forma de trímero que de forma nativa pesa aproximadamente 220 kDa (Vanlandschoot *et al.*, 1997) (figura 1). La neuraminidasa es una enzima con forma de hongo, con una cabeza semejante a una caja y un largo dominio del tallo anclado a la membrana viral; esta proteína se encuentra como un tetrámero que pesa aproximadamente 240 kDa (figura 1) (Burmeister *et al.*, 1994).

La infección por el virus de la influenza inicia por la unión de la HA del virus al receptor, el ácido siálico terminal de la glicosilación de alguna proteína o lípido sobre la superficie celular. La interacción viral inicia el proceso de endocitosis mediada por el receptor (Latham y Galarza, 2001). La entrada de protones dentro del virión por la actividad de M2, promueve los cambios conformacionales en la HA que facilitan la interacción del péptido de fusión (porción amino de la HA2) con la membrana endosomal (Dale *et al.*, 1993); este proceso promueve la fusión de la membrana del virus a la membrana del endosoma lo que libera la proteína de matriz M1 y esta a las RNP's al citosol. Entonces las RNP's son translocadas al núcleo, donde toma lugar la replicación y transcripción del genoma viral.

Posterior a la replicación se comienzan a acumular las glicoproteínas HA y NA producidas, en áreas discretas de la membrana plasmática. El proceso mediante el cual la M1 y las 8 RNPs se seleccionan y forman los nuevos viriones no ha sido elucidado. En muchos virus la sola proteína de matriz es capaz de proveer la generación de

partículas de membrana de la superficie celular (Latham y Galarza, 2001). La neuraminidasa (NA) cataliza el corte de las uniones glicosídicas entre el ácido siálico terminal y el residuo de azúcar adyacente de glicoproteínas y glicolípidos. Por lo que la enzima posee una actividad de destrucción de receptores a la infección viral, que es esencial para el mantenimiento de la movilidad del virus a través de las mucosas, la prevención de la auto-agregación y para facilitar la liberación de los virus unidos a la superficie celular (Dale *et al.*, 1993).



**Figura 1. Estructura tridimensional de la HA y la NA del virus de la influenza.** Caricatura de la estructura tridimensional de la NA (a y b) y la HA (c y d) elaborada con Pymol ver. 1.2r1. a) Se muestra la estructura de un dímero de la NA del virus de la influenza H1N1/2009 con el inhibidor Zanamivir en el sitio catalítico (en negro, indicado por la flecha); y en esferas magenta los 2 calcio cercanos al sitio catalítico de cada subunidad, y el calcio en el sitio de baja afinidad en el centro de la enzima (código PDB 3B7E). b) Se muestra el tetrámero de la NA (código PDB 2HU4). c) Se muestra la estructura de la HA del virus de la influenza H7N2/2005 unida al receptor (residuo de ácido siálico terminal del carbohidrato mostrado), en negro se observa un receptor unido a cada subunidad (indicado por las flechas). d) Se muestra una vista superior del trímero de la HA; en la parte superior (al frente de la imagen), pueden observarse las láminas beta correspondientes a la HA1 y las alfa hélices centrales correspondientes a la HA2 (código PDB 3M5H).

Los virus de la influenza se han clasificado en los tipos A, B y C, según las diferencias antigénicas en sus proteínas M1 y NP. Los virus de la influenza tipo A se han subdividido por sus reacciones serológicas según la combinación de los antígenos

HA y NA, existiendo 15 distintas HA y 9 NA. Los subtipos que contienen H1 y H3 en combinación con N1 y N2 infectan cerdos. Los subtipos que contienen H3 y H7 en combinación con N7 y N8 infectan caballos. Los subtipos que contienen H1, H2 y H3 en combinación con N1 y N2 infectan humanos; y en los subtipos que infectan aves se han encontrado todas las HA y NA (Fields *et al.*, 1996).

Una característica muy importante de los virus de la influenza y otros virus de RNA, es la deriva (variación) antigénica y el desplazamiento (rearrreglo) antigénico de proteínas de los virus que infectan distintos hospederos, que hace en extremo difícil seguirle el paso con las estrategias preventivas. La segmentación del genoma permite el rearrreglo entre los distintos subtipos de virus, consistente en la completa sustitución de un gen por uno proveniente de otra variante, que resulta en la generación de virus antigénicamente nuevos (Voet y Voet, 1998; Thacker *et al.*, 2008). El desplazamiento antigénico es el principal cambio responsable de las 5 pandemias de influenza humana durante el siglo pasado (Flint *et al.*, 2000). La variación o deriva antigénica ocurre por acumulación de variaciones puntuales en cada gen, resultando en cambios que atenúan la inmunidad del hospedero, haciendo posible la re-infección de un organismo por la misma cepa viral. Existen 4 regiones de variabilidad en la HA, y 3 en la NA (Voet y Voet, 1998).

### **1.1.1 Relación entre HA y NA**

Existe una relación muy cercana y “opuesta” entre las funciones de la HA de unirse a los residuos de ácido siálico y la NA de cortarlos, encontrado que mutaciones afectando la actividad de alguna de ellas, suelen ser compensadas por mutaciones o alteraciones en la otra proteína. Se ha reportado que al inducir en el laboratorio resistencia al Oseltamivir (dirigido contra la NA) en el virus A (H3N2), la primera mutación ocurre en la HA en el octavo pase en presencia de la droga, y hasta el doceavo pase ocurre la modificación de la NA (Tai *et al.* 1998). Una explicación a esta observación se halla en que la mutación en la NA, que ocurre para sobrellevar la inhibición por el Oseltamivir, y que provoca que la enzima tenga baja actividad (Tai *et al.* 1998), posiblemente es contrarrestada con una HA con baja afinidad por el receptor, presentando cambios en el sitio de unión (Wagner *et al.*, 2000).

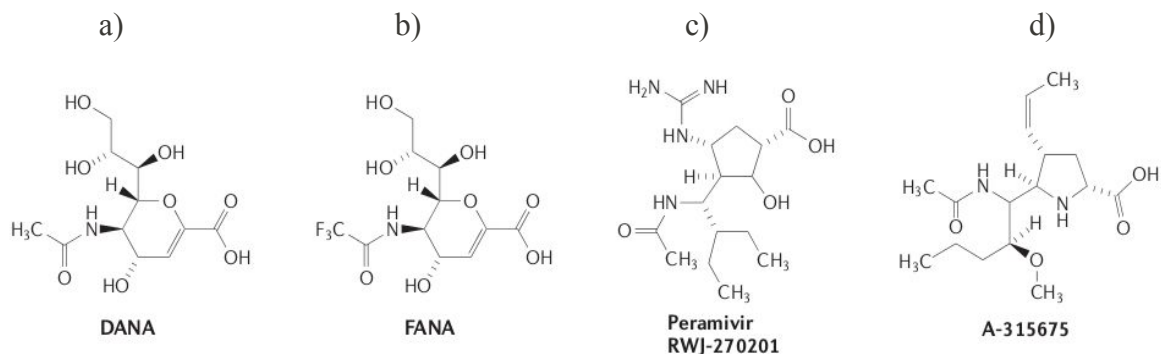
El tallo de la NA juega un papel esencial en la regulación de la virulencia del virus. El virus no es capaz de generar progenie si se retiran las moléculas de NA cortando con proteasas el tallo (Hausmann *et al.*, 1997). El virus H1N1 de la pandemia de 1918, carecía de sitios de corte por proteasas en el tallo de la NA, lo que puede explicar su alta virulencia. Otro mecanismo para evitar el corte del tallo de la NA, es la existencia de cinco glicosilaciones que impiden el reconocimiento por proteasas (Wu *et al.*, 2009).

En los virus de alta patogenicidad, la presencia de una HA de fácil “activación” y con alta afinidad por el receptor, es balanceada con una NA que es protegida de su separación (por escisión) del virión. La mutación de la HA, en el caso de los virus de alta patogenicidad, adiciona la secuencia de aminoácidos RVRRL, que hace eficiente el

corte por proteasas y la formación del péptido de fusión; el balance por modificación en la NA, ocurre por una delección que acorta la longitud del tallo de la NA, protegiéndola de la proteólisis que la separaría del virión (Banks *et al.* 2001; Wagner *et al.*, 2000).

### 1.1.2 Inhibidores de la NA

Los primeros inhibidores de la neuraminidasa (NAI) de la influenza diseñados de acuerdo al principio del análogo del estado de transición fueron el DANA (ácido 2-desoxi-2,3-dide-hidro-N-acetilneuramínico) y FANA (ácido 2-desoxy-2,3-dehidro-N-trifluoroacetil neuramínico), los cuales sirvieron como compuestos líder para el desarrollo de los NAI que son actualmente empleados para el tratamiento y profilaxis de las infecciones del virus de la influenza A y B, como el Oseltamivir y Zanamivir (De Clerq, 2006). Mientras el Oseltamivir puede ser descrito como un derivado ciclofenilo, hay varios ciclopentano derivados y pirrolidina derivados que se han descrito como NAI para tratar de sobrellevar la resistencia, como el Peramivir (BCX-118) y A-315675 que han retenido actividad contra cepas resistentes a Oseltamivir y Zanamivir (figura 2 y 16).



**Figura 2. Estructura de inhibidores de la NA.** Los inhibidores de la neuraminidasa actualmente en uso, fueron desarrollados de acuerdo al principio del análogo del estado de transición. a) y b) Primeros compuestos inhibidores desarrollados de acuerdo al principio mencionado. c) y d) Inhibidores de la NA derivados de pirrolidina, que han retenido actividad contra cepas resistentes al Oseltamivir (tomado de De Clerq, 2006 y Hsieh *et al.*, 2007).

Otra estrategia es el empleo de derivados diméricos, triméricos y tetraméricos de Zanamivir unidos por grupos de 14 a 18 átomos, que se encontró que fueron 100 veces más potentes que el Zanamivir en el ensayo de replicación *in vitro* (Watson *et al.*, 2004).

### 1.1.3 Resistencia a los NAI

Antes del año 2007, la resistencia a los NAI en los virus estacionales circulantes fue menor al 1% a nivel mundial, pero durante la estación de influenza entre 2007-2008 ocurrió la emergencia de virus estacionales de H1N1 resistentes al Oseltamivir con la mutación H275Y (H274Y en N2), reportada en Noruega en 2008. En este periodo, 11% de los virus estacionales H1N1 fueron resistentes al Oseltamivir, aunque la prevalencia

de la resistencia fue especialmente alta en países europeos y africanos. En el periodo 2008-2009, la resistencia a Oseltamivir fue observada en 93% de los aislados estacionales de H1N1 con países (como Japón, USA y varios países de Europa) reportando casi 100% de resistencia (Okomo-Adhiambo *et al*, 2010, CDC 2007-2011). Durante este periodo, aunque las cepas resultaron sensibles a Zanamivir, 0.4% de H1N1 estacional y 100% de H3N2 fueron resistentes a amantanos (amantadina y rimantadina, que atacan la actividad del canal M2). En 2009 se encontró solamente al 1.1% los virus H1N1/2009 pandémicos resistente a Oseltamivir, aunque 99.8% fueron resistentes a adamantanos. Para H1N1/2009 en los pueblos japoneses se encontró una resistencia al Oseltamivir de 5.8% en marzo 2011. De 2010 a 2011, 0.2% de los virus A H3N2 aislados desarrollaron resistencia a Oseltamivir. Por lo que la búsqueda de nuevos inhibidores contra la HA y la NA, y el conocimiento de su mecanismo de acción, puede ayudar a hacer frente a nuevos brotes virales.

Las mutaciones de la NA E119V, R292K, H274Y, R152K, D198N y I222V están asociadas con resistencia al Oseltamivir, de las cuales R292K y H274Y llevan a una enzima funcionalmente defectiva con capacidad de replicación viral comprometida (Okomo-Adhiambo *et al*, 2010).

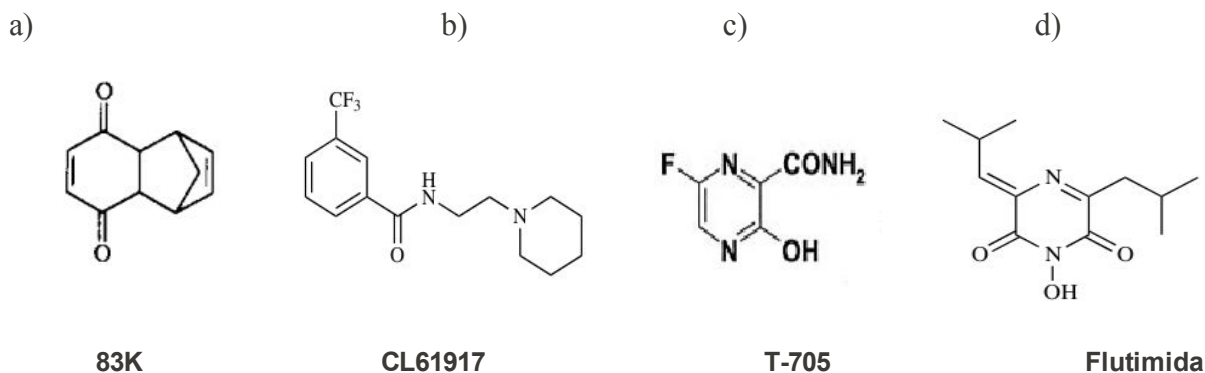
#### **1.1.4 Inhibidores de la HA**

La estrategia mas buscada contra la HA es tratar de impedir la formación del péptido de fusión por el corte de las serin-proteasas humanas responsables de la activación viral HAT\* y TMRSS2\* (Bottcher *et al* , 2009) en HA1 y HA2, o bien la inhibición de la fusión de la membrana viral a la membrana del endosoma celular también mediada por el péptido de fusión en el extremo amino de la HA2. Esta estrategia fue subrayada por el éxito del péptido Enfuvirtida derivado de una región conservada de la gp41 y que impide la entrada del VIH-1 impidiendo la fusión viral.

\*HAT (proteasa semejante a tripsina de via respiratoria humana) y TMRSS2 (proteasa transmembranal, miembro 2 de la familia de *serin-proteasas* S1)

De esta búsqueda se han reportado distintos inhibidores que se encuentran siendo optimizados. Para la inhibición de la fusión por unión al extremo amino de la HA2 (péptido fusogénico) y estabilización de la estructura a pH neutro se han reportado las benzoquinonas e hidroquinonas (tert-butil hidroquinona), CL 61917, BMY-27709, stachyflina (Yoshimoto *et al.* 1999), y sus análogos (Dale *et al.*, 1993) (figura 3). La mayoría de estos inhibidores tienen actividad sobre la H1 y H2, pero no sobre el tipo H3, y no han sido probados contra el tipo H5. Pero en la muchos de los casos no se ha definido un sitio de unión en la superficie de la HA, y las interacciones de los inhibidores con la proteína son aún poco claras, por lo que en general se requiere de la estructura cristalográfica del complejo HA-inhibidor para la siguiente etapa del desarrollo de los fármacos (Hsieh *et al.*, 2007; Russel *et al.*, 2008). Los inhibidores hidroquinona y benzoquinona no tuvieron actividad de inhibición de la hemaglutinación (Dale *et al.* 1997).





**Figura 3. Estructura de compuestos inhibidores alternativos de la infección por influenza.** a) 83K, derivado de la hidroquinona que inhibe la fusión viral al unirse al péptido de fusión en la HA2. b) CL 61917, inhibidor de la fusión viral. c) T-705, inhibidor competitivo de nucleótidos de la polimerasa. d) Flutimida, inhibe la actividad de endonucleasa dependiente de *cap* de la polimerasa trimérica. (Tomado de De Clerq, 2006; Hsieh *et al.*, 2007).

## 1.2 PRODUCCIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA

### 1.2.1 El virus producido en huevos embrionados.

Desde hace varias décadas, muchos investigadores han empleado virus propagados en huevos embrionados en la investigación del virus de la influenza, como es el caso de la proliferación de los viriones para la gran mayoría de los trabajos de cristalización, pero existen evidencias que señalan que las proteínas virales son alteradas. Sin embargo, el método de producción en embriones de pollo, es el que reporta mayores rendimientos de viriones ensamblados de los que se pueden obtener las proteínas de las espículas, además de la economía relativa de los huevos embrionados (Tree *et al.*, 2001; Thacker *et al.*, 2008).

Cuando se propaga el virus de influenza humana en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de gallina, se seleccionan variantes que presentan una HA con sustitución de 2 aminoácidos (D190V/N y D225G) y eliminación de una glicosilación (CHO163), relacionados con la arquitectura fina del sitio de unión al receptor. Mediante estas modificaciones de la HA, el virus incrementa su afinidad por los receptores (glicosilaciones terminales de ácido siálico) con uniones  $\alpha$ 2-3 al azúcar adyacente (Sia( $\alpha$ 2-3)Gal), presentes en aves, y disminuye la capacidad de unirse a los receptores con uniones  $\alpha$ 2-6, presentes en humanos (Gambaryana *et al.*, 1999).

Debido a las diferencias mencionadas, los anticuerpos capaces de neutralizar la infección por el virus de la influenza (anticuerpos neutralizantes), se detectan tanto en hurones como en humanos, de forma mas frecuente y a un título mayor, en pruebas en que se emplean virus producidos exclusivamente en células MDCK, que cuando se emplean virus adaptados a replicarse en huevos embrionados (Oxford *et al.*, 1987; Takemae *et al.*, 2009).

La producción de virus de la influenza en huevo embrionado con fines vacunales\*, presenta además varias problemáticas, como el requerir la producción previa de suficientes huevos embrionados y la planeación o satisfacción de la demanda durante una epidemia.

\*Se ha demostrado que no existe riesgo de desencadenar una respuesta anafiláctica al vacunar a los individuos con alergia a los componentes del huevo, mientras la concentración de proteína del huevo se mantenga dentro de límites establecidos (James *et al.*, 1998; Halperin *et al.*, 2002).

### 1.2.2 El virus producido en células

En contraste de los virus de influenza humana producido en huevo, los virus aislados exclusivamente en cultivo de células de mamífero son homogéneos, y sus moléculas de HA son antigénicamente y estructuralmente idénticas, a las cepas presentes en muestras de pacientes de influenza (Gambaryana *et al.*, 1999; Romanova *et al.*, 2003). A pesar de ello existen diferencias en la glicosilación de la HA según la célula hospedera en que se replique el virus, y dependiendo también del subtipo viral del que se trate (Romanova *et al.*, 2003). La glicosilación adicionada en células MDCK, contiene oligosacáridos de más elevado peso molecular, mientras las adicionadas por las células Vero, contienen más oligosacáridos de alta manosa (varias ramificaciones de manosa  $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_{7+n}$ ) (Romanova *et al.*, 2003; Schwarzer *et al.*, 2009).

El uso de cultivo celular de mamífero para producir virus de la influenza con fines vacunales, se maneja como una posibilidad, pero solo si está bien caracterizado, de tal forma que pueda escalarse, y pueda rendir altos títulos de virus, para hacer la producción viable al compararla con la producción en huevos embrionados. La eficiencia del proceso, depende no solo de la capacidad de una línea celular en particular para dar altos rendimientos del virus de la influenza, sino también de un proceso optimizado para producir grandes cantidades de virus vacunal (Tree *et al.*, 2001).

Dentro de las distintas estrategias para la producción de virus de influenza en cultivo de células de mamífero con altos rendimientos, se encuentran el cultivo de células de riñón canino Madin-Darby (MDCK), que es favorecida por el alto título viral obtenido, y de células de riñón de mono verde (Vero); ambas líneas celulares aprobadas para el uso en producción de biológicos por la FDA (WHO, 2007; Hu *et al.*, 2011); también se han empleado células humanas PER.C6. Dentro de los sistemas empleados para producción de virus en cultivo celular, se encuentran el cultivo adherente estático en botella, el cultivo adherente giratorio en botellas "Roller", el cultivo en suspensión sobre microacarreadores y en biorreactor de lecho fluidizado (Tree *et al.*, 2001; Genzel *et al.*, 2004) (ver tabla 1 para un cuadro comparativo).

El cultivo de microacarreadores es una opción popular debido a la facilidad de escalamiento y la capacidad posible de expansión sobre los 10,000 litros. La mas grande escala disponible para cultivo de células animales se considera que es de 12,000 L.

En muchos casos, las células adherentes no pueden ser adaptadas a crecer en suspensión; sin embargo, como los sistemas de cultivo en suspensión muestran la mejor escalabilidad, puede emplearse el cultivo sobre microacarreadores, que comprende el cultivo de células adherentes sobre partículas sólidas pequeñas suspendidas por agitación en el medio de crecimiento. Las células se adhieren y se dispersan sobre la superficie de los acarreadores y gradualmente forman una monocapa confluyente, por lo que se logra un sistema cuasi-homogéneo muy similar al cultivo en suspensión tradicional con todas sus ventajas (Merten *et al.*, 2004; Nienow 2006).

Para producción de biológicos, las líneas celulares, deben de ser caracterizadas: el banco maestro de producción de células no debe contener agentes adventicios, como retrovirus, y debe haberse demostrado la estabilidad de la línea celular. En el caso de la producción de virus en huevos embrionados y cultivos primarios, el animal debe ser libre de patógenos específicos y debe estar bien caracterizado. Se ha demostrado que las vacunas de influenza producidas en línea celular, no son inferiores a las de huevo (WHO, 2007; FDA, 2000; 2010; 2011).

**Tabla 1. Cuadro comparativo de rendimiento de obtención de unidades hemaglutinantes (UHA's<sup>\*\*\*</sup>) en distintos sistemas de proliferación de virus en células MDCK (adaptado de <sup>1</sup>Tree *et al.*, 2001; <sup>2</sup>Chu *et al.*, 2009, <sup>3</sup>Bock *et al.* 2010.)**

Método de cultivo	Concentración celular obtenida (células/mL)	Título viral (PFU*/mL)	UHA's/100 $\mu$ L de fluido viral
Microacarreadores Dormacell (1)	$8 \times 10^7$	$8 \times 10^8$	2500
Microacarreadores Cytodex 1 (libre de suero) (3)	$3.2 \times 10^6$	$9 \times 10^8$	759
Microacarreadores Cytodex 1 (con suero) (3)	$1.8 \times 10^6$	no reportado	190
Botella giratoria (Roller) (1)	$2 \times 10^7$	$1 \times 10^9$	1500
Huevo embrionado (1)	No Aplica (5 a 10 mL)	$4 \times 10^9$	2000
Monocapa en botella T, con suero(2)	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^8$	181
Expresando el gen <i>Siat7</i> , con suero (2)**	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^8$	4096

\*PFU: Unidades formadoras de placa, partículas virales capaces de formar una placa de lisis en cultivo celular.

\*\* Modificación de la composición de la membrana celular de las células MDCK para resistir el estrés mecánico generado por la agitación.

\*\*\* UHA's: Una unidad de hemaglutinación (UHA) puede definirse como la cantidad de virus necesaria para aglutinar un volumen igual de una suspensión de eritrocitos al 0.5%.

### **1.2.3 Medio de cultivo libre de suero**

El empleo de medio libre de suero es una tendencia global para reemplazar el uso de suero fetal bovino en el cultivo de células con fines vacunales, debido a los inconvenientes que conlleva el uso de suero como son: la falta de homogeneidad entre un lote y otro (Campbell *et al.*, 2007), el que el suero no está completamente definido, las consideraciones éticas de protección animal en la cosecha y colección del feto, problemas con la oferta y demanda para producir los cerca de 500,000 litros por año que significa coleccionar 1,000,000 de fetos bovinos al año (van der Valk *et al.* 2004) y la posibilidad de acarrear organismos contaminantes (Campbell *et al.*, 2007), como el virus de la diarrea viral bovino (BVDV), el virus de la peste bovina (RPV), micoplasma, el virus de la fiebre aftosa (FMDV\*), virus herpes bovino (BHV-1\*), y priones como el causante de la encefalopatía espongiforme bovina BSE\*, relacionada con la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt Jacob en humanos (Wessman *et al.* 1999).

\*Se ha detectado la transmisión a humanos de estos patógenos.

Además, para el caso de la producción de proteínas, la albúmina del suero es la proteína más abundante y difícil de retirar durante los pasos de purificación. Con el aumento de terapias basadas en células y la producción de fármacos y vacunas producidas en células, se está tratando de eliminar el uso de productos derivados de animal en toda la línea de producción (Campbell *et al.*, 2007).

## **1.3 DISEÑO DE FÁRMACOS**

### **1.3.1 El proceso del diseño de fármacos**

El proceso de descubrimiento de fármacos consiste de dos partes principales: la detección de nuevas entidades químicas y su optimización. Las nuevas entidades químicas también son denominadas como compuestos líder o cabezas de serie. La detección del compuesto líder se puede definir como la observación de que un nuevo químico produce un efecto biológico útil. Existen dos posibilidades para la detección de nuevas entidades químicas: el escrutinio y el diseño racional.

El escrutinio es el proceso en el que una selección algo aleatoria de químicos son probados para tener un efecto biológico. El éxito de este proceso depende del número y la variedad de los compuestos, y de la confiabilidad de las pruebas; es el método más antiguo por el que se han llevado a cabo el descubrimiento de los usos terapéuticos de los productos naturales durante la historia de la terapia medicinal, y una gran cantidad de fármacos sintéticos actuales son modificaciones de estos compuestos líder. El diseño racional consiste en el intento de adaptar teóricamente la estructura de un compuesto de tal forma que el compuesto resultante interactúe de la forma deseada con un sistema biológico conocido y entendido.

La optimización anteriormente consistía solamente en obtener mejores fármacos a partir de la generación preexistente, lo cual se denomina investigación de análogos. La optimización en la actualidad puede incluir varios procesos como la adquisición de la información de la relación estructura-actividad (SAR) para un compuesto, la extensión de esta información a su grupo de compuestos relacionados, y el llegar a un candidato de fármaco con propiedades óptimas: es decir, que tenga elevado efecto biológico con baja toxicidad, buena estabilidad y fácil preparación. Finalmente, la optimización busca llegar a un entendimiento matemático de la relación de los cambios en la estructura del fármaco con los cambios en su actividad (Freter *et al.*, 1988).

### **1.3.2 Escrutinio de alto rendimiento (HTS)**

Puede ser imposible analizar todas los candidatos a fármacos potenciales, por lo que se ha buscado automatizar el proceso de escrutinio y su rendimiento incrementado de tal forma que se pueda llevar a cabo en un lapso de tiempo y costos razonables. El escrutinio de alto rendimiento (HTS, High-Throughput Screening) es una colección de tecnologías que permiten el ensayo rápido de compuestos con potencial terapéutico por ensayos *in vitro* que surgió entre 1989-1991. El HTS normalmente implica la miniaturización y la automatización, y se basa en la manipulación robótica de cantidades muy pequeñas de materiales y el uso de los avances en la detección de las señales relevantes y en la interpretación de los datos.

El establecimiento del HTS fue posible al dar comienzo la química combinatoria que consiste en la síntesis automatizada de un número masivo de compuestos a partir de una diversidad de bloques de construcción químicos básicos, intercombinados por una colección de puentes químicos (“linkers”) confiables y cortables, para el surgimiento de nuevas bibliotecas de químicos (figura 4), que a la par fue acelerado por surgimiento de nuevos blancos gracias a los análisis genómicos y la expresión de proteínas blanco en células que carecieran de receptores que interfieran con el ensayo (Patel y Gordon 1996; Persidis, 1998; Szymanski *et al.*, 2012).

Para poder realizar los ensayos de HTS, se necesitó una alternativa al método tradicional de solubilización de los compuestos, permitiendo que compuestos poco solubles en agua, pudieran ser probados adicionando DMSO. La solubilidad de estos compuestos, podría ser compensada en las etapas del desarrollo del fármaco posteriores a la detección (Lipinski *et al.*, 2001).

### **1.3.3 La regla de los 5, compuestos estilo fármaco para la absorción: solubilidad y permeabilidad**

Las propiedades fisicoquímicas que se desean de un fármaco han sido dirigidas por las características de absorción y permeabilidad observadas en cientos de fármacos ya probados (Lipinski *et al.*, 2001) (características que se busca conserven los compuestos empleados en el escrutinio de compuestos estilo fármaco). En el descubrimiento y desarrollo de fármacos se trata de predecir las características de

absorción que tendrán, pues se sabe que las principales barreras a la absorción propias del compuesto son la baja solubilidad (en agua) y la baja permeabilidad. Dentro de las barreras que influyen en la biodisponibilidad se hallan los transportadores y los eventos metabólicos de la pared intestinal (Lipinski *et al.*, 2001).

La membrana celular es permeable a los compuestos no polares, es decir, los compuestos no polares pueden pasar a través de membrana celular sin ayuda. Por el contrario, los compuestos polares, compuestos cargados o iones requieren de una proteína de membrana para ser transportados dentro de la célula (Nelson y Cox, 2005). La velocidad de entrada de los compuestos no polares dentro de las células (bicapa lipídica) depende de la lipofilia (hidrofobicidad) y el tamaño de los compuestos (Lipinsky *et al.*, 2001). Las moléculas más pequeñas y las más solubles en aceite (hidrofóbicas) serán las que más rápidamente difundirán a través de la bicapa lipídica (Overton 1900; Djukic *et al.*, 2012).

A partir de la distribución de propiedades calculadas de dichos cientos de fármacos probados, se encontraron 4 parámetros (denominados descriptores químicos) en un rango cuyo valor límite se asocia con una mejor solubilidad o permeabilidad, enunciando la llamada “regla de los 5”, para los compuestos estilo fármaco:

Puede predecirse que un fármaco tendrá\*<sup>2</sup> buena absorción y permeación si tiene:

- *Peso molecular menor que 500 Da.*
- *Coefficiente Log P menor que 5.*  
Para predecir la solubilidad se ha empleado el valor de la hidrofobicidad expresada como el LogP, que es el logaritmo del coeficiente de partición en octanol/agua del compuesto.
- *Menos de 5 donadores de puente de H: NH + OH's.*  
Un número excesivo de donadores de puentes de hidrógeno perjudica la permeabilidad.
- *Menos de 10 grupos aceptores de puentes de H: N+O's.*  
También muchos grupos aceptores de puente de hidrógeno dificultan la permeabilidad.
- *Los compuestos sustrato de los transportadores biológicos (intestinales) son la excepción a la regla.*

\*<sup>2</sup>Los enunciados son presentados en forma negativa en el escrito original.

Menos del 10% de los fármacos analizados tiene 2 parámetros fuera de los 4 valores indicados en la “regla de los 5” (el quinto enunciado de la regla no es un valor, es una excepción) (Lipinski *et al.*, 2001).

### **1.3.4 Diseño de fármacos basado en búsqueda de fragmentos (FBDD)**

El diseño de drogas basado en búsqueda de fragmentos consiste en identificar compuestos con muy pocos grupos funcionales, de bajo peso molecular, que se unen

débilmente a distintas partes de un solo sitio de unión de una proteína. Los compuestos detectados, posteriormente se modifican o ligan para dar inhibidores potentes, con alta afinidad y especificidad por el sitio de unión (Mattos *et al.*, 2006; Hajduk *et al.*, 2007).

El diseño basado en búsqueda de fragmentos (FBDD) se propuso por los laboratorios Abbot en 1996, como una alternativa más tangible a la del HTS. En el FBDD el empleo de una biblioteca de fragmentos para el escrutinio permite incrementar la proporción de compuestos activos detectados. Los fragmentos son compuestos estilo compuesto líder o cabezas de serie (sección 1.3.1, más características de los fragmentos se mencionan con detalle posteriormente).

Dentro de las ventajas de una biblioteca de compuestos con las características de fragmentos (estilo líder), sobre una biblioteca con características de HTS con compuestos similares a fármacos, están las relacionadas con el tamaño pequeño y la simplicidad de los fragmentos:

- Las posibles combinaciones de los componentes de la estructura de los compuestos del HTS ocupan un espacio químico mayor de  $10^{63}$  contra  $10^8$  de los fragmentos. Así una biblioteca de un tamaño de 100 o 1000 fragmentos cubre mayor proporción del espacio químico de  $10^8$  para fragmentos, que una biblioteca estilo fármaco HTS que conste de  $10^6$  compuestos que cubren solo una pequeña parte del espacio químico de  $10^{63}$  para los compuestos HTS.
- La complejidad de un compuesto estilo fármaco disminuye su posibilidad de unirse a la proteína blanco, incluso solo por simple impedimento estérico.
- Por su baja complejidad es más fácil optimizar un fragmento para llegar al compuesto líder, que un compuesto estilo fármaco que ya es muy complejo (Hajduk *et al.*, 2007; Barelier *et al.*, 2010).

En resumen, se trata de encontrar algo muy específico con alta afinidad en HTS o algo poco específico con algo de afinidad que luego es optimizado en FBDD.

Los fragmentos detectados tienen en general una baja afinidad (100  $\mu$ M a 10 mM), y el número de compuestos con actividad detectados dependen de la “farmacabilidad” de la proteína. La “farmacabilidad” (del inglés druggability) de una proteína fue definida como la probabilidad de encontrar compuestos estilo fármaco que se le unan con alta afinidad; las proteínas se han clasificado desde altamente “susceptibles a unir fármacos” (del inglés druggable) hasta pobremente “susceptibles a unir fármacos” en base a escrutinios realizados con RMN heteronucleares 2D. Se ha llegado a un modelo para predecir el índice de “farmacabilidad” de las proteínas que incluye los términos del área superficial total, área de contacto polar y apolar, escarpado de la superficie, y lo compacto de los bolsillos de unión. Esto ha llevado como en muchos de los enfoques de alto rendimiento, a elegir mediante la “farmacabilidad” a las proteínas de una ruta que son más susceptibles de ser modificada su actividad mediante la unión de un ligando, como blanco para el desarrollo de fármacos contra padecimientos (Hajduk *et al.*, 2005).

Se ha evaluado que el alto número de positivos (hits) encontrados en los escrutinios con fragmentos puede deberse también a una baja especificidad. Con los fragmentos no hay mucha especificidad entre proteínas muy relacionadas, pero si hay especificidad entre las no relacionadas, y hay alta especificidad en proteínas blanco con alta farmacabilidad. La alta especificidad puede ser lograda solo cuando se optimizan los fragmentos iniciales en moléculas mas complejas. A pesar de la baja complejidad y baja afinidad, los fragmentos se unen identificando eficientemente los puntos calientes de unión en la superficie de diferentes proteínas (Barelier *et al.*, 2010).

A pesar de que los rangos de detección son específicos para distintas proteínas, dependiendo de su farmacabilidad, algunos de los quimiotipos aparecieron para ser repetidos en la mayoría de las proteínas, indicados como estructuras privilegiadas. El motivo difenilo y bicíclico es el motivo de subestructura preferido para unión de las proteínas, y la hidrofobicidad (indicada por el LogP) es una característica distintiva (Hajduk, 2000).

### **1.3.5 La regla de los 3 para fragmentos: compuestos estilo líder.**

Al cotejar los grupos de fragmentos y revisar sus propiedades se enunció la “**regla de los 3**”, que indica que los fragmentos exitosos en la detección de sitios de unión cuentan con las características de: un PM menor a 300 u.m.a.s, coeficiente LogP menor a 3, donadores y aceptores de puentes de hidrógeno c/u menor que 3. Adicionalmente también se detectó que el número de enlaces rotables (NROT) debía ser menor o igual a 3, y el área de superficie polar (PSA) menor o igual a 60 Å<sup>2</sup> (Congreve *et al.*, 2003).

La regla de los 5 es para compuestos estilo fármaco para HTS, la regla de los 3 es para compuestos etilo líder para FBDD. La “regla de los 5”, base del concepto de un compuesto semejante a fármaco, ha sido modificada posteriormente para definir el concepto de un compuesto semejante a compuesto líder, debido a las consecuencias de ganancia en tamaño e hidrofobicidad durante la optimización del compuesto.

### **1.3.6 Detección y optimización**

La cuantificación de las relaciones estructura actividad de un ligando y la proteína blanco ha incluido distintos procedimientos para intentar relacionar la actividad biológica con la composición química de los ligandos. Antes de la llegada de la biología estructural, la caracterización de los sitios de unión de los ligandos involucraba los experimentos primarios de cinética enzimática, lo cual a pesar de ser una poderosa herramienta tenía el problema de que la geometría de la unión debe ser asumida dado el comportamiento de los sustratos y sus análogos. Otro método laborioso es la mutación de los residuos presuntamente involucrados en la unión, donde se determina la respuesta biológica con el cambio con lo que se puede obtener los residuos involucrados y la extensión de la superficie de unión (Mattos *et al.*, 2006).



Muchos métodos pueden usarse para detectar la unión de fragmentos positivos, pero los métodos que dan más datos acerca de las propiedades tridimensionales y la composición química de los sitios de unión sobre la superficie de las proteínas son la RMN y cristalografía de rayos X. La estructura tridimensional proporciona un molde en el cual se pueden sugerir los compuestos posibles a sintetizar o a ser probados para tener eficacia biológica. La confirmación de un fragmento positivo y el análisis detallado del planteamiento de la unión del blanco generalmente se realiza por análisis por cristalografía de rayos X del complejo fragmento-proteína (Barker *et al.*, 2006).

Una metodología que puede considerarse la base del surgimiento del FBDD fue las estructuras de cristales con múltiples solventes (MSCS), la cual fue usada para localizar y caracterizar los sitios de unión de posibles ligandos en la superficie de una proteína, y se desarrolló para mapear toda la superficie de la proteína. La estructura de una proteína se resolvía en presencia de distintos solventes orgánicos, lo que se denomina mapeo por solvente. En teoría, probando una serie de pequeños compuestos, se podrían encontrar las posiciones óptimas para grupos funcionales de interés, los cuales podrían ser incorporados a un ligando mayor. Cada solvente distinto representa un distinto grupo funcional que puede servir como parte de un compuesto "líder" que en este caso ocuparía simultáneamente los distintos sitios de unión existentes (Mattos *et al.*, 2006).

En el caso de los fragmentos, la optimización posterior a la detección involucra la evolución química de los fragmentos para explotar completamente los bolsillos de unión de un blanco, o bien cuando 2 fragmentos coinciden en un solo sitio de unión pueden ser ligados en una forma alternativa de unión empleando el principio de combinación de la química de los fragmentos, mejorando rápidamente el nivel de inhibición (figura 23) (Barker *et al.*, 2006). Por ejemplo, para mejorar la actividad de un compuesto, mientras que los grupos polares son mantenidos en la posición del compuesto "líder" considerando que esa posición es la mejor posible de las posiciones, la potencia *in vitro* es incrementada por la adición de grupos lipofílicos correctamente posicionados para ocupar los bolsillos hidrofóbicos de la proteína blanco (Lipinski *et al.*, 2001).

Los fragmentos encontrados pueden ser usados para modificar los fármacos existentes, para incrementar su especificidad, para diseño de nuevos fármacos, o para entender la interacción y reconocimiento global de los ligandos con las proteínas. El desarrollo de fármacos debe tomar en cuenta las características de absorción, distribución, metabolismo y excreción. Por lo que posterior a la detección, para la optimización se realiza la validación de los compuestos positivos (revisión de estructura y pureza) y la cuantificación de su actividad (potencia *in vitro* y selectividad, posibilidad de modificación química, relaciones de estructura-actividad tempranas, farmacocinéticas y toxicología). Así el fármaco candidato es aquel compuesto que mejor llena todos los requerimientos para llegar a ser una medicina tanto efectiva como segura (Reichel *et al.*, 2006).

### 1.3.7 Biblioteca de fragmentos

La síntesis en fase sólida (compuestos unidos a una resina para facilitar las operaciones de recuperación del producto) fue inicialmente usada para generar bibliotecas de péptidos sometidos a un escrutinio, con el objetivo de detectar actividad biológica (Merrifield, 1963; Geysen *et al.*, 1984; Houghten, 1985). En las primeras estrategias en que se emplearon las bibliotecas de pequeñas moléculas orgánicas para la detección de agentes terapéuticos, las bibliotecas generadas por química combinatoria, constaban de mezclas de derivados de pocos bloques de construcción (Santiago *et al.*, 2004). Dichos bloques eran combinados mediante síntesis paralela en fase sólida (los bloques básicos al ser combinados, divergen en una parte de la ruta de síntesis, y convergen en otra parte de la ruta)(figura 4a)(Bunin y Ellman, 1992; Desai *et al.*, 1994). Los compuestos derivados eran probados como mezclas o con una pureza moderada, realizando escrutinios para detectar actividad biológica. Al detectar actividad de la mezcla sobre el blanco, se procedía a tratar de separar los compuestos de la mezcla y detectar el componente activo (Santiago *et al.*, 2004).

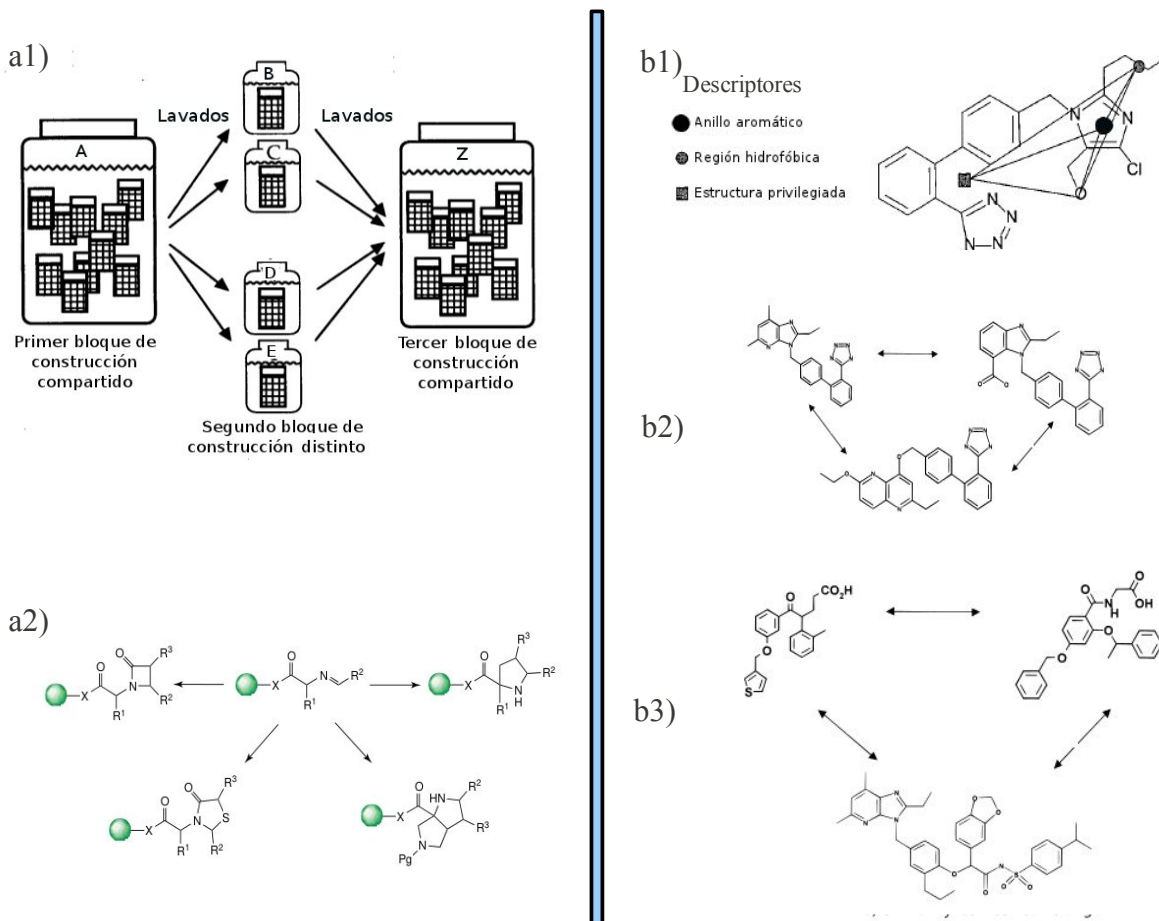
En una estrategia mas reciente, gracias a los avances como la automatización, la mejora de los métodos analíticos para purificar y analizar los compuestos, y la quimioinformática, las bibliotecas químicas (entre las que se halla la biblioteca Maybridge Ro3) son colecciones “armadas”, con una selección de compuestos con una pureza mayor al 95% (Lou, *et al.*, 2001; Santiago *et al.*, 2004), de la vasta variedad de compuestos distintos comercialmente disponibles. Dichos compuestos también son generados por química combinatoria. Las características de los compuestos incluidos en la selección de la biblioteca son principalmente:

- a) Tratan de abarcar la mayor diversidad química posible, y un número suficiente de compuestos, para así cubrir la mayor porción y distribución en el espacio químico (figura 4b).
- b) Las propiedades fisicoquímicas de los compuestos cumplen con la “regla de los 5/3” (tratando de garantizar su absorción y permeabilidad, sección 1.3.3), y garantizan la posibilidad de combinarse (Mason *et al.*, 1999; Reichel *et al.*, 2006).

La selección de la diversidad química en la bibliotecas se ha llevado a cabo por 2 vías:

- a) *Bibliotecas sesgadas*: Se eligen compuestos con estructuras básicas representativas, que se han detectado a lo largo de la historia de la química medicinal, y que están direccionadas a detectar actividad en ciertos blancos. Abarcan solo regiones agrupadas del espacio químico (islas de actividad).
- b) *Bibliotecas aleatorias*: La selección se realiza por medio de programas computacionales, basados en el concepto opuesto al de similitud química: compuestos con estructuras distintas tendrán una actividad distinta. Primero, para cada compuesto, se realiza la asignación de grupos que son descriptores químicos moleculares, también llamados puntos farmacóforos. Los puntos farmacóforos o descriptores, son las partes mas pequeñas del compuesto que presentan una función fisicoquímica: aceptores y donadores de puentes de hidrógeno, centros ácidos, centros básicos, regiones

hidrofóbicas, centroides del anillo aromático, nitrógenos cuaternarios y estructuras privilegiadas. Posteriormente se comparan los grupos descriptores químicos de un compuesto (el número y la distancia entre ellos), con los descriptores químicos en los otros compuestos. Buscando que los compuestos incluidos en una biblioteca, presenten las mayores diferencias entre los grupos descriptores, se logra que los compuestos que la conforman tengan menor similitud química, y por tanto, que la biblioteca presente mayor diversidad química (figura 4b)(Mason *et al.*, 1999; Muegge, 2005).



**Figura 4. Generación de bibliotecas de compuestos químicos. Química combinatoria y diversidad química** (adaptado de Desai *et al.*, 1994 y Mason *et al.*, 1999 ). **a) Química combinatoria en fase sólida:** **a1)** Esquematación de la síntesis combinatoria en fase sólida, empleando el método de síntesis paralela o de la “bolsa de té”. Un primer bloque de construcción básico, común a todas las rutas, se fija a varias placas de matriz sólida. Luego se adiciona un segundo bloque de construcción, que es distinto para cada placa de matriz sólida. Finalmente, se adiciona un tercer bloque de construcción, común a todas las placas de matriz sólida. Cada placa de matriz sólida contendrá un compuesto distinto constituido por los mismos bloques de construcción básicos combinados de formas distintas. La matriz sólida permite retirar los residuos de la reacción mediante lavado, y posteriormente la recuperación. **a2)** Ejemplo de compuestos generados por síntesis combinatoria en fase sólida empleando el mismo bloque de construcción inicial. **b) Diversidad química:** **b1)** Distancias entre descriptores o puntos farmacóforos en una molécula. **b2)** Ejemplo de un grupo de moléculas con similitud química. **b3)** Ejemplo de un grupo de moléculas con diversidad química.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Para hacer frente a las variantes del virus de la influenza para las que la población no se encuentre vacunada, se hace necesaria una continua búsqueda de inhibidores de la replicación del virus. Para ello se requiere el montaje de metodologías para detectar la unión y evaluar la actividad sobre la proteína de miles de posibles compuestos. Se desea encontrar inhibidores que tengan una elevada afinidad y alta especificidad para tener efectos secundarios mínimos, que además tengan las características de absorción necesarias para llegar al blanco.

## **3. HIPÓTESIS**

El empleo de diseño basado en la búsqueda de fragmentos (FBDD) montando una metodología adecuada para la detección y evaluación de la actividad sobre las proteínas de superficie hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) del virus de la influenza, permitirá encontrar compuestos inhibidores con quimiotipos que no han sido descritos.

## **4. OBJETIVOS**

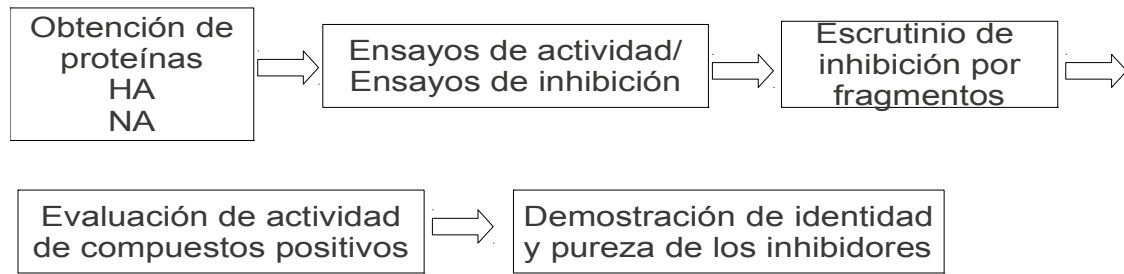
### **4.1 OBJETIVO GENERAL.**

Encontrar nuevos inhibidores dirigidos contra la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) del virus de influenza A (H1N1) por medio de una estrategia basada en búsqueda de fragmentos.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Obtener la proteína hemaglutinina (HA) produciendo el virus de influenza A (H1N1) en cultivo de células de mamífero. Obtener la proteína neuraminidasa (NA) expresada en un sistema recombinante.
2. Montar los ensayos de actividad/inhibición de las proteínas HA y NA.
3. Encontrar compuestos con actividad inhibitoria sobre la HA y la NA mediante el escrutinio de una biblioteca de fragmentos.
4. Evaluar la actividad de cada uno de los compuestos positivos.
5. Determinar la identidad y pureza de los inhibidores.
6. Avanzar en el desarrollo de nuevos inhibidores dirigidos contra la HA y NA del virus de influenza A (H1N1) empleando los inhibidores detectados.

## 5. DISEÑO EXPERIMENTAL.



## 6. MATERIALES

Línea celular Madin-Darby de riñón canino MDCK (ATCC clona CCL-34). Cepa del virus influenza A (H1N1) México/2009 (*vH1N1*) aislado de un paciente del INER,. Enzima neuraminidasa recombinante (NAr) del virus H1N1 A/California/04/2009 expresada en células HEK293 (Sino Biological Inc.) cultivadas en medio libre de suero. Neuraminidasa del *Clostridium perfringens* IX (Sigma-Aldrich). Sustrato 2'-(4-metilumbeliferil)- $\alpha$ -D-N-acetilneuraminidato de sodio (MUNANA, Sigma-Aldrich). Biblioteca de 1000 fragmentos de Maybridge Ro3 (Maybridge). Oseltamivir (Tamiflu, Roche). Zanamivir (Relenza, GlaxoSmithKline). Microacarreadores Cytodex 1 (Sigma-Aldrich). Anticuerpo anti-influenza A (Millipore). Láminas con cámara de cultivo de 8 pozos (Labtek). Placas de 96 pozos de polipropileno Greiner (Sigma-Aldrich). Tapones de esponja (Sigma-Aldrich) Medio libre de suero Optipro (Invitrogen). Medio libre de suero ultraMDCK (Lonza). Tripsina recombinante TrypLE Express (Invitrogen). Bromoetilenimina (Sigma-Aldrich). 6-Aminoquinoxalina (Sigma-Aldrich). Ácido 4-(1H-pirrol-1-il) benzoico (Sigma-Aldrich).

## 7. METODOLOGÍA.

### 7.1 CULTIVO CELULAR Y PRODUCCIÓN VIRAL

#### 7.1.1 Cultivo celular en adherente

Se realizó el cultivo celular de la línea celular MDCK, para lo cual se adaptó a cultivo en medio libre de suero (Optipro, ultraMDCK). Las células confluentes cultivadas en medio mínimo esencial (MEM) con suero al 10%, fueron tripsinizadas con tripsina recombinante TrypLE Express, y sembradas en botellas de cultivo e incubadas en medio MEM con suero al 10%. Cuando la monocapa de células alcanzó un 80% de confluencia se retiró el medio MEM, se lavó la monocapa con solución salina y se adicionó medio de cultivo libre de suero (SFM) al 100%. Dos días después se tripsinizaron con tripsina TrypLE Express, se adicionó medio SFM fresco, se centrifugaron para retirar la tripsina y resembraron con medio SFM diluyendo 1:2 el cultivo. Los pasajes posteriores se realizaron con medio SFM.

### 7.1.2 Optimización de la producción de virus en cultivo adherente

Para la proliferación del virus se empleó el virus de la influenza A (H1N1) del brote de influenza A México 2009 (nombrado a partir de aquí **vH1N1**) aislado por nuestros colaboradores del INER a partir de un paciente infectado ingresado a este hospital. Todo el trabajo realizado con el **vH1N1** se llevó a cabo en las instalaciones del departamento de virología de INER bajo los protocolos de seguridad establecidos en el departamento.

El **vH1N1** fue aislado y adaptado a cultivo celular en células MDCK, adicionando tripsina 1 µg/mL al inóculo viral e incubando a temperatura ambiente por 10 minutos previos a la infección, y posteriormente sin necesidad de otra proteasa ajena a la que producen las células MDCK (Meguro *et al.* 1979, Noma *et al.*, 1998). El octavo pase del virus fue empleado para la mayoría de los experimentos.

Para la producción inicial en cultivo adherente las células MDCK en medio SFM fueron crecidas en botellas T de cultivo e incubadas a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% hasta alcanzar la confluencia. Entonces el medio fue retirado y se infectaron con el virus de la influenza (Meguro *et al.*, 1979), se permitió adsorber por 2 hrs, se retiró el inóculo viral y se adicionó medio fresco. Las células infectadas fueron incubadas a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% por 48 a 72 hrs en que fue evidente el daño citopático causado por el virus. El sobrenadante de cultivo conteniendo los viriones fue cosechado, titulado por hemaglutinación y almacenado a -70°C.

Se realizó la optimización de la producción de virus (cuantificado en unidades de hemaglutinantes) por infección con el **vH1N1**. Esta optimización se realizó mediante una cinética de infección realizada en cultivo adherente en células MDCK en medio SFM. Para este propósito se sembraron placas de 6 pozos y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar la confluencia; una vez alcanzada la confluencia las células fueron infectadas a una multiplicidad de infección (MOI) de 1, 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 con el **vH1N1**, en un volumen de 500 µL para permitir la adsorción viral durante 2 hr. Transcurrido el tiempo de adsorción el inóculo viral fue sustituido con 2 mL de medio de cultivo, y las placas infectadas fueron incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células no infectadas fueron usadas como control negativo. Se realizó una infección por duplicado para cada tiempo de la cinética (24, 48 y 72 horas post-infección), a cada una de las MOI's; al transcurrir el tiempo post-infección asignado a cada uno de los pozos, se cosechó el sobrenadante de cultivo.

Cada pozo para ser colectado fue cosechado en la campana de flujo laminar con ayuda de un raspador (scraper) y ultracongelado a -70°C.

Para evaluar el título viral (en unidades hemaglutinantes) se realizó el ensayo de hemaglutinación de 25 µL del virus obtenido.

### 7.1.3 Cultivo celular en suspensión

A las células MDCK adaptadas a cultivo SFM se les realizó el pase hasta obtener botellas T de 175 cm<sup>2</sup>, al llegar a confluencia fueron tripsinizadas con tripsina recombinante TrypLE Express centrifugadas para retirar la tripsina y resuspendidas para ser sembradas.

En el caso del sembrado de las células MDCK cultivadas en los matraces con agitación orbital, los matraces Erlenmeyer fueron tratados con silano para evitar la adherencia de las células a las paredes del recipiente, lavados exhaustivamente y secados en la estufa. Los microacarreadores Cytodex 1 (perlas microacarreadoras de DEAE-dextrano) se hidrataron y esterilizaron en PBS pH 7.4, y posteriormente se lavaron con medio SFM y se resuspendieron en medio SFM fresco a una densidad de 2.0 mg/mL. Se sembraron las células a una densidad de 75,000 células/mg de acarreadores ( $7.5 \times 10^6$  de células/100 mg de acarreadores/ 50 mL de medio), en matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapón de esponja. Las células sembradas se dejaron adherir toda la noche (ON) con agitación orbital a 30 rpm a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente, los acarreadores con las células adheridas se mantuvieron a 90 rpm hasta alcanzar la confluencia.

#### **7.1.4 Producción del virus de influenza A (H1N1) en células MDCK en suspensión.**

A las células MDCK creciendo en suspensión adheridas sobre microacarreadores, al llegar a la confluencia se prepararon para la infección realizando un cambio de medio de cultivo, centrifugando las células adheridas a los microacarreadores a 168Xg por 5 minutos y sustituyendo el medio SFM agotado por medio SFM fresco. A continuación las células MDCK fueron infectadas agregando el inóculo viral para una MOI de 0.002, e incubadas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en los matraces Erlenmeyer con tapón de esponja con agitación orbital a 90 rpm.

A las 72 horas postinfección, se cosechó el sobrenadante de cultivo, centrifugando los microacarreadores a 377Xg por 10 minutos, entonces fue alicuotado y congelado a -70°C. Se determinó el título viral (en unidades hemaglutinantes) del sobrenadante de cultivo mediante el ensayo de hemaglutinación.

#### **7.1.5 Inactivación del virus y titulación por tinción inmunofluorescente.**

El virus producido fue inactivado mediante el uso de etilenimina como se describe en Habib *et al.* 2006 y Sarachai *et al.* 2007, agregando la solución de la etilenimina al virus pre-incubado a 37°C, e incubando la mezcla a 37°C con agitación usando un agitador magnético, y tomando muestras a las 0 hrs y 2 hrs; y determinando la actividad hemaglutinante residual, así como el título viral residual. Todas las muestras fueron congeladas a -70°C.

Para la evaluación del título viral residual (por ensayo de infectividad), una alícuota del virus tratado se tituló por dilución a punto final, determinando la dosis infecciosa al 50% en cultivo de tejidos (TCID<sub>50</sub>). Se sembraron láminas con cámara de cultivo de 8 pozos (Labteck) con células MDCK en medio SFM que fueron incubadas hasta llegar a confluencia. Se retiró el medio de cultivo de las células y las monocapas confluentes fueron infectadas con 300 µL de diluciones seriales decimales del vH1N1 sin inactivar o a los distintos tiempos de inactivación en medio de cultivo, permitiendo la adsorción del virus durante 2 hrs tras lo cual el inóculo fue reemplazado por medio de cultivo SFM fresco. Las láminas con cámara de cultivo de 8 pozos infectadas con las diluciones del virus fueron incubadas por 72 hrs a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%. Se introdujo un

control negativo de células sin infectar y otro de virus sin ningún tratamiento (dilución -2) en cada placa.

Para la tinción por inmunofluorescencia se retiró el medio de cultivo de las láminas Labtek y se fijaron las células infectadas con etanol/acetona durante 15 minutos tras lo cual se mantuvieron en PBS. Se separó la laminilla inferior de la cámara de cultivo y se realizó la tinción por inmunofluorescencia de los pozos en la laminilla, incubando con un anticuerpo primario monoclonal de ratón contra influenza (Millipore) por 45 min para evidenciar la existencia de replicación viral, con un anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a fluoresceína (FITC) por 45 minutos, y yoduro de propidio por 7 minutos para evidenciar el núcleo celular para contraste. Se adicionó a las laminillas medio de montaje (Dako) y se sellaron con barniz. Las preparaciones fueron visualizadas bajo el microscopio de fluorescencia en inmersión y se estimó el título infectivo residual, como la dosis infecciosa al 50% en cultivo de tejidos (TCID<sub>50%</sub>) por el método de Reed y Muench (Reed & Muench, 1938; WHO, 2002; Duan *et al.*, 2010).

## **7.2 ENSAYOS DE ACTIVIDAD Y ESCRUTINIO**

### **7.3 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA HEMAGLUTININA**

Se realizó el ensayo de hemaglutinación para cuantificar el título viral (en UHA's), y también para realizar el escrutinio de actividad inhibitoria de la biblioteca de los compuestos sobre la hemaglutinina.

Se analizaron las muestras provenientes de la producción del virus *vH1N1* en cultivo adherente, del virus en cultivo sobre microacarreadores en suspensión, o bien del virus inactivado, realizando diluciones 1:2 de 25 µL de la muestra en 25 µL de PBS pH 7.2 en placas de 96 pozos con fondo en forma de V, se agregaron 25 µL de PBS a todos los pozos, y finalmente se agregaron 50 µL de una suspensión al 0.5% de eritrocitos humanos tipo "O+" (WHO, 2002) y se incubaron a temperatura ambiente para permitir la sedimentación de los eritrocitos o la formación de la red. La concentración de agente hemaglutinante se determinó como el inverso de la dilución del virus previa a la que desaparece la formación de la red de hemaglutinación y los eritrocitos caen al fondo del pozo formando un botón, reportada como unidades de hemaglutinación (UHA's). En todos los casos se realizó el análisis por duplicado y se incluyó un carril de muestras con el control negativo (-) con solo PBS y un control positivo denominado agente hemaglutinante estándar conteniendo el *vH1N1* a una concentración conocida de UHA's.

#### **7.3.1 Agente hemaglutinante "estándar".**

Se adoptó la introducción de un control denominado agente hemaglutinante "estándar" constando de un lote de virus de la influenza de concentración conocida de 1024 UHA's/100µL (256 UHA's/25µL) congelado a -20°C.



### **7.3.2 Efecto del DMSO sobre la hemaglutinación**

Se determinó el efecto del DMSO sobre la actividad de la hemaglutinina, adicionando DMSO al agente hemaglutinante a distintas concentraciones diluido en PBS pH 7.2, de forma que la concentración de DMSO fuese 0, 2.5, 5, 7.5, 10 o 20 % en la pre-incubación con el virus. Para el ensayo de hemaglutinación se empleó *vH1N1* con un título de 256 UHA's/25  $\mu$ L que fue pre-incubado 4 hrs en DMSO a la concentración indicada en cada caso, y entonces se procedió a agregar 50  $\mu$ L de suspensión de eritrocitos tipo O+ al 0.5% en PBS para continuar con el desarrollo de la hemaglutinación. Se determinaron las unidades de hemaglutinación como se mencionó anteriormente.

### **7.4 ESCRUTINIO DE ACTIVIDAD INHIBITORIA SOBRE LA HA**

Se realizó la demostración de la existencia o no de actividad inhibitoria sobre la hemaglutinina del grupo de compuestos de la biblioteca Maybridge detectados en el escrutinio inicial realizado previamente por nuestro grupo de investigación.

Una vez determinado que el DMSO al 10% no presenta un efecto negativo sobre la hemaglutinación, lo que indicó era posible evaluar la actividad de los compuestos, se procedió a realizar el ensayo de inhibición de la hemaglutinación en el que 2, 4 y 8 unidades de hemaglutinación(UHA's) totales del *vH1N1* (WHO, 2002) se pre-incubaron a temperatura ambiente durante 4 hrs (Télez-Valencia *et al.*, 2002, Gubareva *et al.*, 2002) con cada compuesto a probar de la biblioteca de Maybridge a una concentración de 2 mM, manteniendo la concentración final de DMSO al 10% en PBS pH 7.2. Transcurrido el tiempo de pre-incubación se agregaron 50  $\mu$ L de eritrocitos al 0.5% y se incubaron a temperatura ambiente para permitir la sedimentación o formación de la red. En cada corrida se introdujo como control negativo (-) de hemaglutinación DMSO solo al 10% en PBS pH 7.2 y como control positivo solo el agente hemaglutinante *vH1N1* en DMSO al 10% sin ningún compuesto. El ensayo se realizó por triplicado. La inhibición de la formación de la red (actividad hemaglutinante) en los pozos conteniendo 2 mM del compuesto candidato se evidenció por la sedimentación de eritrocitos al fondo del pozo formando el botón, que además contrastó con la formación de la red impidiendo la sedimentación en la dilución equivalente (cantidad equivalente de UHA's) del control positivo (+) conteniendo solo *vH1N1*.

#### **7.4.1 Curvas de concentración inhibitoria de la actividad de la HA**

Para determinar la concentración mínima de los 5 compuestos inhibidores positivos capaz de inhibir la hemaglutinación, se emplearon concentraciones de pre-incubación de cada compuesto de 2 mM, 1mM, 500  $\mu$ M y 250  $\mu$ M, se ensayaron 2,4 y 8 UHA's del *vH1N1* en DMSO al 10% final en PBS pH7.2, realizando la pre-incubación por 4 hrs a temperatura ambiente, tras lo cual se agregó la suspensión de eritrocitos al 0.5% en PBS y se incubaron a temperatura ambiente para permitir el desarrollo de la

hemaglutinación. Se realizó el análisis por duplicado. Se determinó la concentración del compuesto a la que conserva su actividad inhibitoria.

#### **7.4.2 Determinación de dependencia de la pre-incubación**

Se investigó el efecto del tiempo de pre-incubación en la actividad inhibitoria de la HA de los compuestos positivos, realizando para cada uno el ensayo de inhibición de la hemaglutinación como se describió anteriormente pero a 2 tiempos distintos de pre-incubación con el compuesto a 0 hrs y 4 hrs, en ambos casos la concentración con cada compuesto fue de 2 mM, que se pre-incubó con las diluciones del agente hemaglutinante para 2,4 y 8 UHA's.

### **7.5 LA NEURAMINIDASA**

#### **Ensayo de actividad de la neuraminidasa**

Se realizó el montaje de la reacción para la determinación de actividad de neuraminidasa para realizar el escrutinio de la actividad inhibitoria de los compuestos de la biblioteca Maybridge sobre la NA.

#### **7.6 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA NEURAMINIDASA**

Para el caso de la neuraminidasa recombinante (NAr) para todas las reacciones individuales se realizó una solución de 60  $\mu$ L de enzima NAr con 11.7  $\mu$ g de proteína total del extracto celular en amortiguador ácido 2-N-morfolino etanosulfónico (MES) a 33 mM pH 6.0 (Gubareva *et al.*, 2002) y se inició la reacción por adición de 140  $\mu$ L de sustrato 4-metil umbeliferil- $\alpha$ -N-acetil neuraminidato de sodio (MUNANA)(Potier *et al.*, 1979) en el mismo amortiguador para dar una concentración final de sustrato de 100  $\mu$ M e incubando a 37°C por 30 minutos en oscuridad. En el caso de la neuraminidasa del *vH1N1* para todas las reacciones individuales se emplearon 500 UHA's totales por reacción (40  $\mu$ L de virus con 256 UHA's/25  $\mu$ L) con todas las demás volúmenes y concentraciones iguales a las usadas con la NAr. Para detener la reacción se adicionó 1.0 mL de amortiguador de paro de etanol/gly (glicina 100 mM/ etanol 25% a pH 10.7) y se almacenó en congelación a -20°C hasta su lectura. El sustrato fluorogénico MUNANA al ser cortado por la neuraminidasa da como producto de la reacción 4-metil umbeliferona que absorbe a una longitud de onda de 365 nm y emite a 450 nm, por lo que las reacciones individuales se leyeron en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-5000 a estas longitudes de onda.

##### **7.6.1 Efecto del tiempo de reacción**

Se determinó la cantidad de producto producido (señal fluorescente) a distintos tiempos durante el desarrollo de la reacción 37°C. Para lo cual se realizó un coctel conteniendo la totalidad de la enzima para los distintos tiempos, se inició la reacción por

adición del sustrato y se tomaron muestras a los 0, 5, 10, 20, 40 y 80 minutos, transcurrido el tiempo de reacción para cada muestra se tomaron 200  $\mu$ L de la reacción coctel y se adicionaron a 1.0 mL de amortiguador de paro. La fluorescencia de las muestras fue leída como se indicó anteriormente.

### **7.6.2 Efecto de la concentración de enzima**

Se realizaron reacciones con incrementos de 3.6  $\mu$ g de proteína total del extracto celular conteniendo la NAr (3.6, 7.2, 14.4, 28.8, 57.6  $\mu$ g) en 60  $\mu$ L de solución en MES 33mM pH 6.0, y se inició la reacción por adición del sustrato MUNANA a la concentración final de 100  $\mu$ M en el mismo amortiguador y por incubación de la reacción por 30 minutos a 37°C. Se adicionó 1 mL de amortiguador de paro y se leyeron las muestras en el espectrofluorómetro.

Para realizar las reacciones individuales se ajustó la actividad de neuraminidasa recombinante a la actividad presente en el fluido viral del virus de la influenza producido, equivalentes a aproximadamente 500 UHA's totales por reacción de 200  $\mu$ L, dadas como 40  $\mu$ L de fluido viral con 256 UHA's/25  $\mu$ L, pues además se buscó coincidiera con la parte lineal de la curva cantidad de enzima NAr en la reacción, por lo que se emplearon 11.7  $\mu$ g de proteína total del extracto de células HEK293 expresando la NAr por cada 200  $\mu$ L de reacción.

### **7.6.3 Efecto del DMSO**

Se determinó el efecto del DMSO a 2.5%, 5%, 10% y 20% sobre la actividad de la enzima. Se realizó cada solución de DMSO en amortiguador MES 33 mM pH 6.0 y se agregaron 11.7  $\mu$ g de proteína total conteniendo la enzima NAr, se pre-incubaron por 4 hrs a temperatura ambiente, y se inició la reacción agregando el sustrato MUNANA a una concentración final de 100  $\mu$ M e incubando la reacción 30 minutos a 37°C. La reacción se detuvo agregando 1.0 mL de amortiguador de paro y se leyó la fluorescencia de las muestras como se ha indicado. La concentración final del DMSO en la reacción fue de 0.75% ,1.5% , 3%, 6% respectivamente. Por lo que la concentración de DMSO final usada en la pre-incubación de las reacciones con los inhibidores fue de 10%, mientras que en la catálisis fue de 3%.

También se determinó el efecto de la extensión de la pre-incubación con DMSO al 5% sobre la NAr o bien sobre el *vH1N1* (500 UHA's), con las mismas cantidades y condiciones de la curva de concentración de DMSO pero a 0, 15 y 35 minutos de pre-incubación con DMSO al 5%, la reacción se inició por adición del sustrato a cada reacción una vez transcurrido el tiempo de pre-incubación respectivo y se incubaron a 37°C por 30 minutos. El paro y la lectura se realizó como se ha mencionado.

### **7.6.4 Control positivo de actividad inhibitoria**

Se realizó una solución 36.5 mM del profármaco comercial etil éster del carboxilato de Oseltamivir en DMSO al 10% y se realizaron diluciones decimales en DMSO al 10%. Para probar la concentración inhibitoria, se realizó la solución del

fármaco en DMSO al 10% con las respectivas concentraciones del Oseltamivir y se agregaron 11.7 µg del extracto celular conteniendo la NAr en un volumen final de 60 µL, se pre-incubaron por 30 minutos (Gubareva *et al.* 2002) a temperatura ambiente y se inició la reacción agregando el sustrato MUNANA a una concentración final de 100 µM e incubando la reacción 30 minutos a 37°C. En el caso de la neuraminidasa del vH1N1 se emplearon 500 UHA's totales por reacción manteniendo todos los volúmenes y concentraciones usadas para la NAr. La reacción se detuvo agregando 1 mL de amortiguador de paro y se leyó la fluorescencia de las muestras en el fluorómetro Shimadzu RF-5000.

En el caso del Zanamivir el fármaco comercial fue disuelto a una concentración de 15 mM en DMSO, y se realizaron diluciones decimales del fármaco también en DMSO. Se probó el efecto inhibitorio sobre la actividad de la NAr con el procedimiento descrito para el Oseltamivir.

## 7.7 ESCRUTINIO DE INHIBICIÓN DE LA NEURAMINIDASA

### 7.7.1 Ensayo aproximación estilo HTS

Se realizó el escrutinio de 1000 compuestos de la biblioteca Maybridge Ro3 para tener actividad inhibitoria sobre la neuraminidasa del virus de la influenza A (H1N1) 2009.

Para el escrutinio de los inhibidores se realizó el montaje de un ensayo tipo HTS en placas de 96 pozos de polipropileno, en los pozos de la primera placa denominada "placa de reacción" se adicionaron cada uno de los compuestos de la biblioteca a una concentración de 2 mM en DMSO para dar una concentración final de DMSO de 10% en amortiguador MES 33 mM pH 6.0, a 50 µL de la solución de cada compuesto por pozo se adicionaron 10 µL de una solución con 11.7 µg de proteína total del extracto celular conteniendo la NAr en el mismo amortiguador. Los compuestos con la enzima se pre-incubaron por 4 hrs (Téllez-Valencia *et al.*, 2002, Gubareva *et al.*, 2002), tras lo cual se inició la reacción agregando 140 µL de sustrato MUNANA e incubando a 37°C por 30 minutos. La concentración de los compuestos al agregarse el sustrato fue de 600 µM. Transcurrido el tiempo de la reacción se depositaron 200 µL de amortiguador de paro en una nueva placa de 96 pozos de polipropileno denominada "placa de lectura" y se transfirieron 40 µL de reacción de cada pozo de la placa de reacción para detener la reacción.

En cada reacción se introdujeron 3 controles: el blanco sin contener enzima, el control negativo de inhibición con solo la neuraminidasa y el control positivo de inhibición conteniendo el éster de Oseltamivir carboxilato a una concentración de 36 µM.

Las "placas de lectura" del escrutinio fueron leídas en un lector de microplacas multifunción absorbancia/ fluorescencia/ luminiscencia de la marca Bio-tek modelo FL600 con los filtros correspondientes a una excitación a 360 nm y emisión a 460 nm a temperatura ambiente sin agitación, con la sensibilidad a 75%, con el empleo de el Software KC4. La existencia de inhibición provocada por alguno de los inhibidores fue

detectada por disminución en la señal fluorescente del producto de la reacción comparada con la actividad de la enzima pre-incubada en DMSO sin adición de inhibidores.

### **7.7.2 Confirmación por reacciones individuales**

Para la comprobación de los compuestos con actividad inhibitoria positiva, se realizaron reacciones de inhibición de la neuraminidasa individuales. Para la solución de enzima se emplearon 11.7 µg de proteína total del extracto de células HEK293 expresando la NAr por cada 200 µL de reacción. Se realizó la solución de cada compuesto a 2 mM en DMSO para dar una concentración final de DMSO al 10% en amortiguador MES 33 mM a pH 6.0, y se agregó la NAr, y se realizó una pre-incubación a temperatura ambiente por 4 hrs. Transcurrida la pre-incubación se inició la reacción adicionando 140 µL de sustrato MUNANA para dar una concentración final de 100 µM y se incubó a 37°C por 30 minutos. La concentración de los compuestos al agregarse el sustrato fue de 600 µM. Se detuvo la reacción adicionando 1 mL de amortiguador de paro y se leyó en el espectrofluorómetro Shimatzu RF-5000. En cada corrida de reacción se introdujeron 3 controles: el blanco sin contener enzima, el control negativo de inhibición con solo la neuraminidasa y el control positivo de inhibición conteniendo el éster de Oseltamivir carboxilato a una concentración de 36 µM. La comprobación de inhibición de los inhibidores probados fue detectada por disminución en la señal fluorescente del producto de la reacción comparada con la actividad de la enzima pre-incubada en DMSO sin adición de inhibidores y se reporta como el % de inhibición de la actividad de la enzima por el compuesto a una concentración de 2 mM.

### **7.7.3 Curvas de concentración-actividad inhibitoria**

Se determinó la correspondencia de la concentración-inhibición para los compuestos positivos, determinando la actividad inhibitoria tras la pre-incubación de 11.7 µg de la NAr con una concentración de 2 mM, 666 µM y 133 µM de cada compuesto durante 4 hrs a temperatura ambiente con una concentración final en la pre-incubación de DMSO 10% en amortiguador MES 33 mM pH 6.0. La concentración de los inhibidores en la reacción fue de 600 µM, 200 µM y 40 µM.

En el caso del compuesto con las coordenadas de la biblioteca 9H02 las concentraciones ensayadas en la pre-incubación fueron 2 mM, 1 mM, 500 µM, 250 µM y 125 µM, manteniendo siempre el DMSO al 10% en la pre-incubación. La concentración del inhibidor al comenzar la reacción fue de 600, 300, 150, 75 y 37.5 µM.

Como en todos los casos la reacción se inició por adición del sustrato MUNANA a una concentración final de 100 µM y la incubación de la reacción a 37°C por 30 minutos, y se detuvo por adición de 1 mL de amortiguador de paro, para leer la señal fluorescente en el espectrofluorómetro. En cada corrida se incluyó un control negativo de inhibición conteniendo la enzima en DMSO sin adición de ningún inhibidor, y un control positivo de inhibición adicionando el Oseltamivir a una concentración teórica de 36 µM.

#### **7.7.4 Escrutinio de inhibición de la NA con calcio**

500 de los compuestos también fueron ensayados para inhibir la neuraminidasa en presencia del amortiguador MES 33 mM pH 6.0 con cloruro de calcio 4 mM, por lo demás siguiendo las mismas cantidades y concentraciones descritas para las reacciones individuales, y la fluorescencia fue determinada en el espectrofluorómetro Shimatzu RF-5000.

### **7.8 IDENTIDAD DE LOS COMPUESTOS INHIBIDORES DE LA NEURAMINIDASA**

#### **7.8.1 Actividad de los compuestos puros sobre la NAr.**

Se adquirieron los compuestos 6-Aminoquinoxalina (AQA) correspondiente al compuesto con coordenadas 3H08 del proveedor Sigma con una alta pureza demostrada por el proveedor de 95% por cromatografía de gases, se realizó una solución 40 mM en DMSO y se empleó para probar su actividad sobre la NAr en las mismas concentraciones y condiciones de reacción en que se realizó la comprobación individual de compuestos inhibidores de la biblioteca.

#### **7.8.2 Identidad del compuesto 9H02 por RMN.**

3.0 mg del compuesto con las coordenadas 9H02 de la biblioteca Maybridge, fueron analizados por el grupo de la Dra. Laura Álvarez, del Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM, por RMN de  $^{13}\text{C}$  y DEPT en un espectrómetro de RMN VARIAN GEMINI de 400 Mhz para demostrar su identidad. Para lo cual el DMSO en que se hallaba disuelto el compuesto fue evaporado y sustituido por metanol deuterado y fue analizado. Se realizó la predicción (simulación computacional) del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto, el cual fue comparado con el espectro obtenido experimentalmente para evaluar su identidad.

#### **7.8.3 Evaluación de los compuestos positivos sobre la neuraminidasa del vH1N1.**

Los compuestos positivos corroborados para inhibir a la NAr fueron posteriormente ensayados para determinar si presentaban actividad inhibitoria sobre la neuraminidasa del vH1N1 inactivado con etilenimina.

Para ello se emplearon las condiciones antes mencionadas para comprobación de las reacciones individuales pre-incubado 500 UHA's totales del vH1N1 con los compuestos por 2 hrs a temperatura ambiente en DMSO al 10% en amortiguador MES 33 mM a pH6.0, e iniciando la reacción por adición de 140  $\mu\text{L}$  del sustrato MUNANA para dar una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ , y se detuvo la reacción por adición de 1 mL de amortiguador de paro de etanol/glicina. La fluorescencia se determinó con el espectrofluorómetro Shimatzu RF-5000.

En cada corrida de reacción se introdujeron 3 controles: el blanco sin contener virus, el control negativo de inhibición conteniendo solo el vH1N1 sin ningún compuesto

y el control positivo de inhibición conteniendo el éster de Oseltamivir carboxilato a una concentración de 36  $\mu\text{M}$ . La comprobación de inhibición de los inhibidores probados fue detectada por disminución en la señal fluorescente del producto de la reacción comparada con la actividad de la enzima del *vH1N1* pre-incubado en DMSO sin adición de inhibidores y se reporta como el porcentaje de inhibición de la actividad de la enzima del *vH1N1* por el compuesto a una concentración de 2 mM.

#### **7.8.4 Efecto inhibitorio de la 1-azepanil (3-piperidinil) metanona (AzPM) sobre la NAr en presencia de calcio.**

Debido a que la neuraminidasa del *vH1N1* no fue inhibida por el compuesto AzPM pero si la NAr, se trató de evaluar el efecto del calcio presente medio de cultivo fresco, o bien extracto de células MDCK lisadas por sonicación, o bien el amortiguador MES conteniendo  $\text{CaCl}_2$  a 10 mM, o ninguna fuente externa de calcio.

Para ello, soluciones con 11.7  $\mu\text{g}$  de proteína total conteniendo la NAr fueron pre-incubadas 1 hr con cada una de las distintas fuentes de calcio mencionadas (con el medio fresco se procedió sin pre-incubar) en amortiguador MES 33 mM pH 6.0, y posteriormente se adicionó a todas las reacciones el AzPM a una concentración de 2 mM y final de DMSO al 10% para ser pre-incubadas con este compuesto durante 4 hrs a temperatura ambiente. Tras la pre-incubación con el AzPM se inició la reacción adicionando el sustrato MUNANA a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  final en MES 33 mM pH 6.0 e incubando a 37°C por 30 minutos, se detuvo la reacción por adición de 1 mL de amortiguador de paro y se leyeron en el espectrofluorómetro como se ha indicado. Un control de la reacción con la NAr sin la adición de calcio ni AzPM fue realizado en paralelo.

Para corroborar el efecto del calcio sobre la estabilidad de la neuraminidasa se realizaron reacciones de inhibición pre-incubando 500 UHA's del *vH1N1* durante 30 minutos con concentraciones de 0.1 mM, 1 mM y 4 mM de EDTA a pH 6.0 en amortiguador MES 33 mM pH 6.0 con una concentración final de DMSO de 10%. El inicio, paro y lectura de la reacción se realizó como se ha mencionado anteriormente. Se realizó el mismo ensayo con 11.7  $\mu\text{g}$  de NAr.

#### **7.8.5 Neuraminidasa del *Clostridium perfringens* IX.**

Se montó la reacción con la enzima de *Clostridium perfringens* (NAclos) en amortiguador de acetatos 0.1 mM pH 4.6 o en amortiguador de fosfatos 0.1 mM pH 6.0, para lo cual 5 Unidades Potier de la enzima de *Clostridium* se agregaron a una solución de sustrato MUNANA a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ , y se incubaron a 37°C por 30 min, tras lo cual se detuvo la reacción por adición de amortiguador de paro.

**Unidades de actividad.** 50 unidades de la enzima de *C. perfringens* IX fueron resuspendidas para dar una concentración de 5U/ $\mu\text{L}$ . Una unidad de neuraminidasa según Potier *et al.* 1979 es la cantidad de enzima capaz de liberar 1.0 nmol ácido N-acetilneuramínico por minuto. Por lo que una concentración de NAr o virus tal que brinde una señal fluorescente equivalente, estará produciendo la misma cantidad de

producto fluorescente, por lo que fue considerada para tener también 5U/μL de actividad de neuraminidasa.

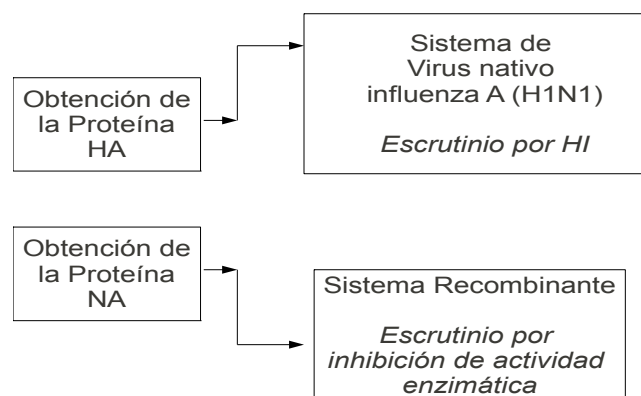
**Actividad de la NAclos respecto al tiempo de reacción.** Se evaluó la actividad de la NAclos con respecto al tiempo de incubación de la reacción en amortiguador de acetatos pH 4.6 y de fosfatos pH 6.0, siguiendo la metodología empleada para evaluar el efecto del tiempo de reacción sobre la NAr, empleando 5U de NAclos para cada reacción.

**Efecto del DMSO sobre la NAclos.** Se evaluó el efecto de distintas concentraciones de DMSO de 0, 2, 10, 15, 20 y 40%, sobre la actividad de la NAclos, siguiendo la metodología empleada para evaluar el efecto de la concentración de DMSO sobre la actividad de la NAr, empleando 5U de NAclos para cada reacción y un tiempo de pre-incubación de 30 minutos. Para este ensayo fue necesario incubar la enzima a temperatura ambiente antes de iniciar la reacción a 37°C para evitar la desnaturalización.

## 8. RESULTADOS

### 8.0.1 Origen de las proteínas HA y NA.

Debido a que la característica actividad de hemaglutinación ocurre por la actividad de la proteína anclada a la superficie del virión, se eligió el sistema nativo del virus de la influenza como fuente de la proteína hemaglutinina (HA) y el ensayo de hemaglutinación como método para evaluar su actividad. La porción soluble de la proteína neuraminidasa (NA) conserva su actividad enzimática, siempre y cuando permanezca en su forma tetramérica, por lo que el sistema elegido para su obtención fue un sistema recombinante y el método para evaluar su actividad un ensayo enzimático.





## 8.1 CULTIVO CELULAR Y PRODUCCIÓN VIRAL

### 8.1.1 Cultivo celular adherente

Para la producción del virus de la influenza se eligieron las células de riñón canino MDCK para las cuales se ha reportado que replican el virus con alto rendimiento (Tree *et al.*, 2001). Asimismo, se optó por obtener el virus producido en cultivo con medio libre de suero (SFM), para lo cual se realizó la adaptación de las células MDCK a este medio. En ocasiones, la adaptación de una línea celular al crecimiento en medio SFM llega a necesitar varios pases, en los cuales se va reduciendo paulatinamente el porcentaje de suero; pues de otra forma se detectan cambios drásticos en la morfología de las células o signos de estrés, como un incremento en la granulación citoplásmica, vacuolización del núcleo, alargamiento no característico, redondeo, o un crecimiento muy lento (Evans *et al.*, 1964; Donta *et al.*, 1973). En este trabajo las células MDCK fueron adaptadas a cultivo celular en 2 medios libres de suero: Optipro y ultraMDCK. Para la adaptación a ambos medios, una vez que las células llegaron a confluencia, se reemplazó el medio con suero por medio libre de suero, y se incubaron las células por 2 días; en un segundo pasaje ya con medio SFM, se sembraron las células a un 50% de confluencia, tras lo cual se obtuvo un cultivo en medio SFM con replicación a la velocidad normal y con morfología idéntica a la de las células cultivadas en medio mínimo esencial (MEM) con suero al 10% (figura 5a).

### 8.1.2 Optimización de la producción de virus en cultivo adherente

#### Cuantificación de virus

Existen 2 tipos de métodos para la titulación viral o cuantificación de la cantidad de virus en una preparación: métodos físicos y métodos biológicos. Los ensayos físicos determinan la presencia de partículas virales físicas, ya sea que éstas sean infecciosas o no: como el ensayo de hemaglutinación (sección 8.3), el conteo de partículas por microscopía electrónica (Knipe y Howley, 2001), o PCR en tiempo real (Ward *et al.*, 2004). Los ensayos biológicos determinan únicamente las partículas infecciosas: como el ensayo de formación de placa, el ensayo de formación de foco o los métodos de titulación por punto final (dosis infectiva) (sección 7.1.5 y apéndice). Los ensayos de infectividad pueden no determinar el total de partículas físicas presentes, ya que puede requerirse más de una partícula viral física para producir una infección productiva (Knipe y Howley, 2001).

La relación entre algunos de los métodos de cuantificación del virus de la influenza (determinada por Tyrrel y Valentine, 1957), en relación con las partículas virales físicas, contadas directamente por microscopía electrónica es:

-10 partículas físicas por cada partícula infecciosa, determinando las partículas infecciosas con el ensayo de infectividad por formación de placa.

-1 partícula infecciosa por cada  $1 \times 10^3$  copias de cDNA, determinadas por PCR en tiempo real (Ward *et al.*, 2004). Es decir 1 partícula física/ $10^2$  copias de cDNA.

- $2 \times 10^7$  partículas físicas por cada unidad hemaglutinante, determinando las unidades de hemaglutinantes por el ensayo de hemaglutinación (Tyrrel y Valentine, 1957).

Con los datos anteriores, es posible establecer una relación de cuantificación entre unidades hemaglutinantes y partículas infecciosas, de  $2 \times 10^6$  partículas infecciosas por cada unidad hemaglutinante. Aunque esta relación puede variar según las condiciones de cultivo (temperatura), tiempo de cosecha y almacenamiento del virus (Blumenthal *et al.*, 1949; Rimmelzwaan *et al.*, 1998), es posible emplear este método para realizar cinéticas de producción de virus en un cultivo (figura 6 y 7) (Rimmelzwaan *et al.*, 1998; Genzel *et al.*, 2010).

### **Optimización de la producción de virus en cultivo adherente**

Se realizó la producción del virus del brote de influenza A (H1N1) México/2009 (nombrado a partir de aquí **vH1N1**), el cual fue aislado y adaptado a cultivo celular en células MDCK por nuestros colaboradores del INER, a partir de una muestra tomada de un paciente infectado ingresado a dicha institución.

Se realizó la proliferación del **vH1N1** adaptado a cultivo en células MDCK en medio SFM en cultivo adherente en botellas T, en el que el rendimiento de producción de unidades hemaglutinantes, previo a la optimización fue alrededor de 512 unidades hemaglutinantes/100  $\mu$ L de fluido viral (128 UHA's/25  $\mu$ L), correspondientes a un título de  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50%</sub>/mL (TCID<sub>50%</sub>: dosis infectiva de cultivo de tejidos al 50%) y a una actividad de neuraminidasa aproximada de 16 Unidades Potier/100  $\mu$ L de fluido viral. Una unidad de neuraminidasa según Potier *et al.* 1979 es la cantidad de enzima capaz de liberar 1.0 nmol de ácido N-acetilneuramínico por minuto. Una unidad de hemaglutinación (UHA) puede definirse como la cantidad de virus necesaria para aglutinar un volumen igual de una suspensión de eritrocitos al 0.5% (WHO, 2002).

Para tener evidencia de que el título de producción de virus (en UHA's) era el mayor posible en nuestro sistema, se realizó una cinética de infección a distintas multiplicidades de infección (MOI). La MOI puede entenderse como la razón de partículas virales (unidades formadoras de placa, pfu) por célula. En la equivalencia entre la TCID<sub>50%</sub> y las pfu's se considera que 0.69 pfu=1 TCID<sub>50%</sub>. Se realizó la optimización de la producción de UHA's a distintas MOI's, como una forma indirecta de evaluar la producción de partículas virales totales. La optimización consistió en determinar las unidades hemaglutinantes (UHA's/100  $\mu$ L de cultivo), producidas durante la cinética de infección de células MDCK por el **vH1N1**, sobre placas de cultivo de 6 pozos (figura 6a). Al llegar las células a confluencia, se infectaron 2 pozos para cada tiempo de la cinética (24, 48, 72 y 96 horas), a cada una de las MOI (1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001), y fueron cosechados una vez transcurrido el tiempo asignado.

El mayor título obtenido fue de 1024 UHA's/100  $\mu$ L (256 UHA's/25  $\mu$ L); este título se obtuvo para una MOI de 0.001 y 0.01 a las 48 horas post infección (hpi), y para una MOI de 0.0001 hasta las 72 hpi (figura 6b y 6c); a estas bajas MOI's se observó la

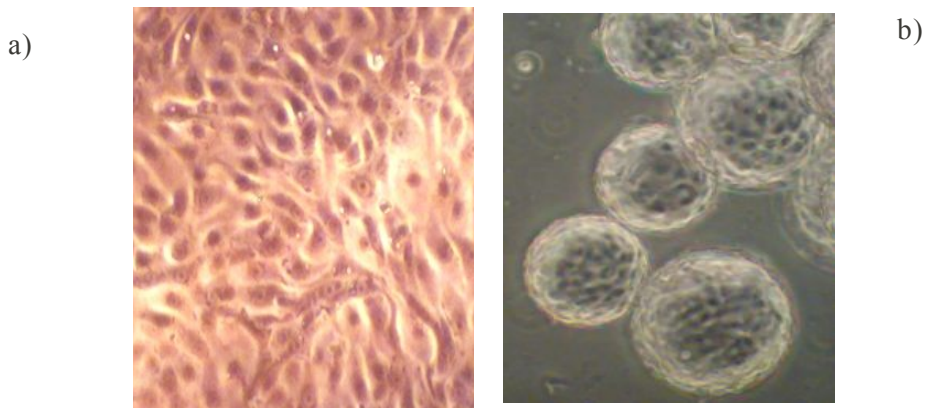
integridad de las monocapa celular a hpi's iniciales. En el caso de la MOI de 0.1 su mayor título se obtuvo a las 48 hpi, pero no llegó al título máximo de MOI's menores, mientras para una MOI de 1 no se detectó replicación a partir de las 24 hpi (figura 6b), lo que posiblemente se deba a la rapidez con que el virus destruyó la monocapa de células a altas MOI's.

### 8.1.3 Cultivo celular en suspensión

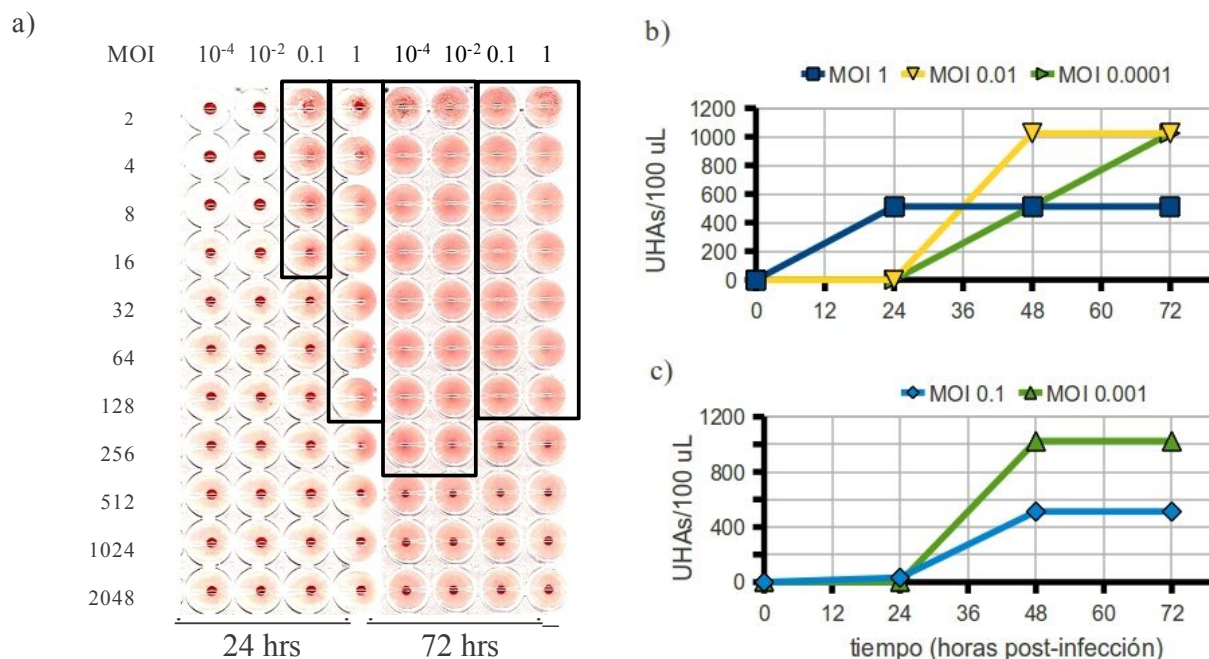
Se buscó un sistema que eventualmente nos permitiera poder escalar el cultivo a niveles piloto y que facilitara el recuperar las proteínas de los viriones de la influenza.

El sistema que ha sido reportado como el mas adecuado para producir alto rendimiento del virus de la influenza ha sido usando el cultivo de células MDCK creciendo sobre acarreadores sólidos en suspensión en medio SFM (Tree *et al.*, 2001, Bock *et al.*, 2010).

Por este motivo se realizó el cultivo en suspensión de células MDCK en medio SFM sobre microacarreadores Cytodex 1 (figura 5b), alcanzando una densidad teórica final de 430,000 células/mg de acarreadores, es decir  $43 \times 10^6$  células para 100 mg de acarreadores en 50 mL de medio. La replicación fue de 75,000 células/mg de acarreadores en la siembra, alcanzando 430,000 células/mg de acarreadores en la confluencia previa a la infección. Los microacarreadores sólidos Cytodex 1 son pequeñas perlas de DEAE-dextrano, que por tanto presentan carga positiva.



**Figura 5. Células MDCK en cultivo adherente en botella T y en cultivo sobre microacarreadores en suspensión, observadas bajo el microscopio invertido.** Las células MDCK fueron adaptadas a medio SFM y crecidas a) en cultivo adherente en botella T, b) en cultivo en suspensión sobre microacarreadores Cytodex 1. Las fotografías digitales fueron tomadas a un aumento de 400X.



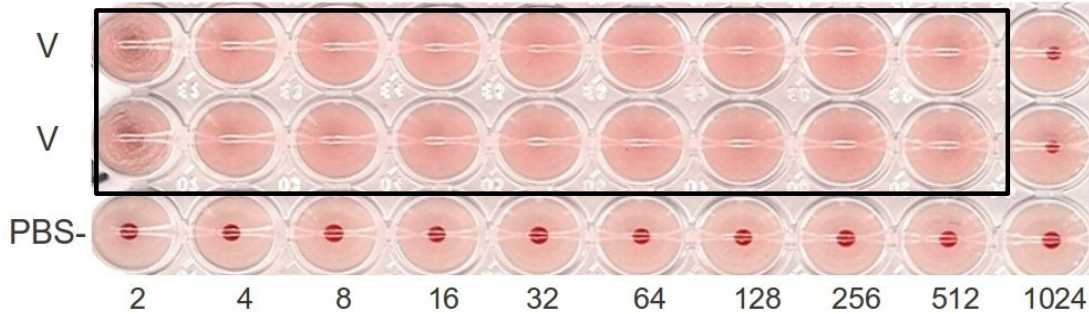
**Figura 6. Cinética de producción de virus (en UHA' s) por infección con el vH1N1 a distintas MOI.** Células MDCK creciendo en medio SFM sembradas en placas de 6 pozos, fueron infectadas con el virus de la influenza A (H1N1) del brote de México/2009. Se infectó un duplicado para cada tiempo post-infección de la cinética (24, 48 y 72 hrs), a las distintas multiplicidades de infección (1, 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001), que fueron cosechados transcurrido el tiempo post-infección asignado a cada uno. Una unidad de hemaglutinación (UHA) puede definirse como la cantidad de virus necesaria para aglutinar un volumen igual de una suspensión de eritrocitos al 0.5%. **a)** Cuantificación por hemaglutinación de la producción de virus (a las 24 hrs y 72 hrs) por infección a las distintas MOI's. Se emplearon **25 µL del cultivo** para realizar el ensayo (256 UHA's/25µL=1024 UHA's/100µL). **b)** Cinética de producción de UHA's por infección con el virus a una MOI de 1, 0.01, y 0.0001. Se reporta la hemaglutinación en **100 µL de cultivo** (1024 UHA's/100µL=256 UHA's/25µL). **c)** Cinética de producción de UHA's por infección con el virus a una MOI de 0.1, y 0.001. Se reporta la hemaglutinación en **100 µL de cultivo** (1024 UHA's/100µL=256 UHA's/25µL).

#### 8.1.4 Producción del virus de influenza A (H1N1) en células MDCK en suspensión.

Con el objetivo de obtener las proteínas hemaglutinina y neuraminidasa del virus de la influenza, para poder realizar los ensayos de inhibición de los compuestos o confirmarlos, se realizó el cultivo celular en suspensión de células MDCK creciendo sobre microacarreadores en medio SFM y fueron infectadas con el vH1N1 basados en los resultados de la optimización de la producción de UHA's.

Se determinó la cantidad de virus (en UHA's), mediante el ensayo de hemaglutinación, del vH1N1 producido en células MDCK creciendo en suspensión sobre microacarreadores en matraces con agitación orbital. El título obtenido por la infección del cultivo en microacarreadores con una MOI de 0.002 fue determinado en 2 experimentos independientes para ser de 2048 UHA's/100 µL (512 UHA's/25 µL) de

fluido viral cosechado (figura 7), que incluso supera el máximo de un cultivo adherente optimizado y corresponde o es ligeramente superior a lo reportado por Bock *et al.*, 2010. La cosecha se realizó al observar un marcado daño citopático a las 72 hpi centrifugando los microacarreadores, por lo que a diferencia de la cosecha adherente tuvo una baja cantidad de restos celulares, y en los ensayos para procesamientos posteriores de filtración o ultrafiltración sufrió menos pérdidas.



**Figura 7. Cuantificación por hemaglutinación de la producción de virus de la influenza A (H1N1) en cultivo en suspensión sobre microacarreadores en medio SFM.** 100 mg de microacarreadores en matraces con 50 mL de medio SFM, fueron sembrados con  $7.5 \times 10^6$  de células MCDK totales. Cuando las células sobre los microacarreadores alcanzaron la confluencia ( $43 \times 10^6$  de células totales) se infectaron con el *vH1N1* a una MOI de 0.002. El cultivo fue cosechado 72 hrs post-infección. La producción de virus fue cuantificada por el ensayo de hemaglutinación ( $512 \text{ UHA's}/25\mu\text{L}=2048 \text{ UHA's}/100\mu\text{L}$ ). El cuadrado muestra los pozos que presentan hemaglutinación. Las columnas indican las unidades de hemaglutinación (UHA's). **V:** diluciones del *vH1N1*. **PBS-:** Control – con PBS sin virus.

En un experimento previo los cultivos fueron infectados a MOI de 0.1 obteniendo 1024 UHA's/100  $\mu\text{L}$ , por lo que la dependencia inversa de la producción de virus (en UHA's) con la MOI aparentemente reafirma los resultados obtenidos en cultivo adherente, pero para validar este dato los experimentos a distintas MOI's en suspensión deberán ser repetidos en paralelo. La aireación superficial fue suficiente para mantener el intercambio gaseoso necesario para mantener el pH del medio, evidenciado por el indicador de pH rojo de fenol durante el crecimiento celular.

Así la metodología montada pudo ser empleada para producción de antígeno o proteína para propósitos de ensayos de actividad, ensayos de inhibición y otros estudios con el virus.

## 8.2 ENSAYOS DE ACTIVIDAD Y ESCRUTINIO

### 8.3 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA HA

Se realizó el ensayo de hemaglutinación tanto para cuantificar la producción de virus (en UHA's), como para realizar el escrutinio de actividad inhibitoria de la biblioteca de los compuestos sobre la hemaglutinina (HA).

En el ensayo de hemaglutinación se detecta la unión de la HA, presente en los viriones del virus de la influenza, a su receptor, que son los residuos de ácido siálico presentes en las glicoproteínas y glicolípidos de la superficie de las células, en este caso los eritrocitos. La unión de varias partículas virales a varios eritrocitos en suspensión impide la sedimentación de los eritrocitos, debido a la formación de una red (la hemaglutinación) cuando las partículas de virus alcanzan cierta concentración. De esta forma, al agregar una suspensión de eritrocitos a diluciones seriales del virus, es posible determinar la existencia y concentración aproximada de partículas virales en una muestra. Una unidad de hemaglutinación (UHA) no es una medida absoluta de la cantidad de virus, pero puede definirse como la cantidad de virus necesaria para aglutinar un volumen igual de una suspensión de eritrocitos al 0.5% (WHO, 2002).

### **8.3.1 Agente hemaglutinante “estándar”.**

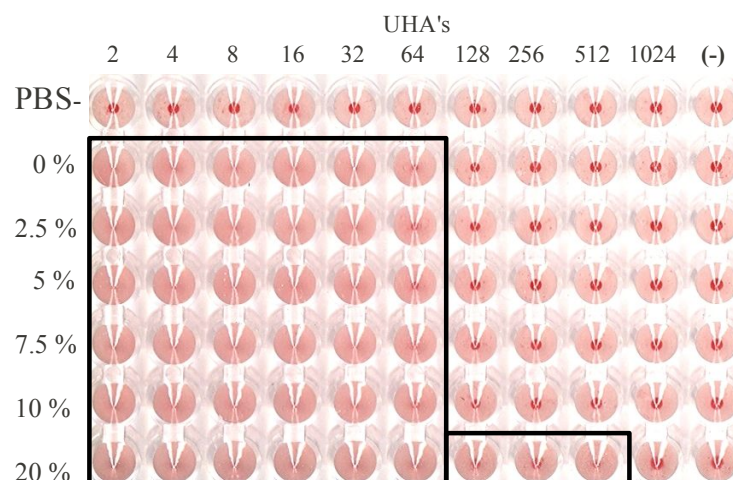
El ensayo de hemaglutinación tiende a dar variaciones por diversos factores intrínsecos, las cuales en el escrutinio de los compuestos pueden dar lugar a confusiones, por lo que se adoptó la introducción de un control denominado agente hemaglutinante “estándar” constando de un lote de virus de la influenza de concentración conocida ( $1024 \text{ UHA's}/100\mu\text{L}=256 \text{ UHA's}/25\mu\text{L}$ ) congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de  $500 \mu\text{L}$  (WHO, 2002).

### **8.3.2 Efecto del DMSO sobre la hemaglutinación**

Los compuestos de la biblioteca Maybridge Ro3 tienen como característica que cumplen con la regla de los 3 para compuestos estilo fragmentos (Congreve *et al.*, 2003). Debido a que los compuestos de la biblioteca tienen distintas solubilidades todos fueron resuspendidos en DMSO a una concentración de 40 mM.

Así durante el escrutinio con el ensayo de inhibición de hemaglutinación se buscó mantener la concentración de DMSO al 10% lo que permitió que los compuestos con baja solubilidad en agua no se precipiten. Por lo que se evaluó el efecto de distintas concentraciones de DMSO sobre la actividad hemaglutinante del virus de la influenza, obteniendo como resultado que a concentraciones de 10% de DMSO e inferiores no existe efecto evidente sobre la lectura de la hemaglutinación, y para una concentración de 20% de DMSO lejos de inhibir la hemaglutinación llegó a tener un efecto de facilitar la formación de la red de la hemaglutinina. Una concentración de DMSO del 10% no tuvo efecto ni sobre la hemaglutinación por parte del *vH1N1* ni sobre los eritrocitos con solo PBS como control negativo (figura 8).





**Figura 8. Efecto de distintas concentraciones de DMSO sobre el título de la hemaglutinación.** Pevio a la adición de los eritrocitos, el vH1N1 fue incubado con DMSO a distintos porcentajes para evaluar su efecto sobre la hemaglutinación. En los cuadrados se indican los pozos que presentan hemaglutinación. En las filas se indica la concentración de DMSO: **0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 20%**. PBS-: control negativo de PBS con eritrocitos sin contener virus. Las filas indican las unidades de hemaglutinación (UHA's).

#### 8.4 ESCRUTINIO DE ACTIVIDAD INHIBITORIA SOBRE LA HA

El ensayo para determinar si existe inhibición de la actividad hemaglutinante del virus sobre los eritrocitos, se conoce como ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI). Si un compuesto (o anticuerpo neutralizante) adicionado durante el ensayo de hemaglutinación (sección 8.3) impide la interacción de la HA con los receptores presentes en los eritrocitos, los eritrocitos se sedimentarán formando un botón al fondo del pozo. El resultado de un análisis donde la actividad de hemaglutinación fue inhibida, es visualmente similar al del control negativo de hemaglutinación que no contiene virus. Realizando el ensayo con diluciones del inhibidor de la hemaglutinación se puede cuantificar la concentración mínima a la que el inhibidor presenta actividad.

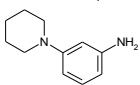
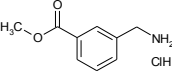
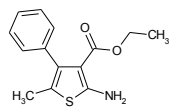
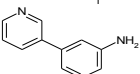
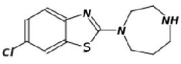
Como antecedente al presente trabajo, se realizó un escrutinio inicial de los 1000 compuestos de la biblioteca Maybridge Ro3 por parte de nuestro grupo de investigación y se detectaron 18 compuestos con posible actividad inhibitoria. Las características de la biblioteca se mencionaron en la sección 1.3.7. De los 18 compuestos resultado del escrutinio inicial, en el trabajo que aquí se presenta se realizó la comprobación de actividad inhibitoria de cada compuesto, eliminando los factores que pudieran causar variabilidad en el resultado como:

- 1) El efecto del DMSO sobre la hemaglutinación y la HI.
- 2) En la determinación de HI, además del análisis con 4 UHA's que indica la técnica para determinar inhibición producida por sueros de pacientes (WHO, 2002), fue incluido el análisis con 2, 4 y 8 UHA's (figura 9).
- 3) La introducción de un control negativo sin contener vH1N1 y del agente hemaglutinante estándar como control positivo, ambos en DMSO al 10% (figura 9).

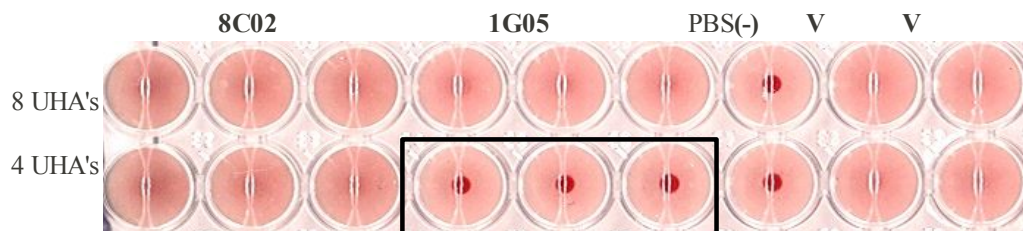
Para realizar el ensayo de HI, los compuestos se pre-incubaron por 4 hrs con el *vH1N1* para abarcar la detección de posibles compuestos en los que existiese un equilibrio en la unión a la hemaglutinina previa una inactivación y por tanto la inhibición fuese dependiente del tiempo de pre-incubación del compuesto con la proteína (Téllez-Valencia *et al.*, 2002)

La inhibición de la actividad hemaglutinante en los pozos conteniendo 2 mM del compuesto candidato se evidenció por la sedimentación de eritrocitos al fondo del pozo formando el botón característico, que además contrastó con la formación de la red que impide la sedimentación en la dilución equivalente del control positivo+ conteniendo solo *vH1N1* (figura 9). Se obtuvieron 5 compuestos con clara actividad de inhibición de la hemaglutinación, los compuestos con coordenadas de la biblioteca Maybridge 9B06, 5A03, 5C06, 1F06, 1G05 (Tabla 2).

**Tabla 2. Estructura de compuestos positivos resultado del escrutinio sobre la hemaglutinina del virus H1N1.**

Cas No.	Estructura	Coordenadas	Maybridge	Nombre	Comportamiento solubilidad	Curva de Inhibición			
						2 mM	1 mM	500 uM	250 uM
27969-75-1			5A03	3-piperidin-1-il anilina	Soluble en solución con DMSO al 10%	Inhíbe	Inhíbe	Inhíbe	No
17841-68-8			9B06	Hidrocloruro del metil éster del ácido 3-Aminometilbenzoico	Soluble en solución con DMSO al 10%	Inhíbe	Inhíbe	Inhíbe	No
4815-37-6			1F06	etil 2-amino-5-metil-4-feniltiofeno-3-carboxylato	Problemas de solubilidad	Inhíbe	Inhíbe	Inhíbe	No
57976-57-5			5C06	3-(piridin-3-il) anilina	Soluble en solución con DMSO al 10%	Inhíbe	Inhíbe	Inhíbe	No
348134-09-8			1G05	6-cloro-2-(1,4-diazepan-1-il)-1,3-benzotiazol	Problemas de solubilidad	Inhíbe	Inhíbe	Inhíbe	No

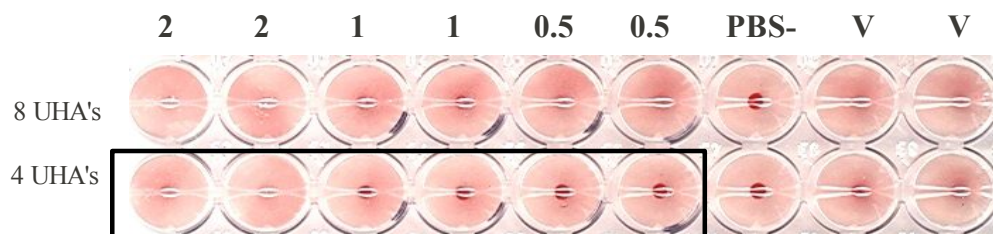




**Figura 9. Ejemplo de detección del compuesto 1G05 por inhibición de la hemaglutinación (HI).** Se muestra la detección de un compuesto con actividad de inhibitoria, en comparación con otro que no la presenta. Previo a la adición de la suspensión de eritrocitos, el *vH1N1* se incubó 4 hrs con 2 mM de cada uno de los compuestos, o los controles. En un cuadrado se muestra el botón de eritrocitos indicando la HI producida por el compuesto 1G05. En las columnas se indican los compuestos respectivos. **8C02:** compuesto negativo para HI (Columnas 1,2,3). **1G05:** compuesto positivo para HI (Columnas 4,5,6). **PBS-:** control negativo sin virus y sin ningún compuesto, únicamente eritrocitos con DMSO al 10% en PBS. **V:** Control positivo con virus sin ningún compuesto, en DMSO al 10% en PBS. Se indican las UHA's empleadas en cada fila.

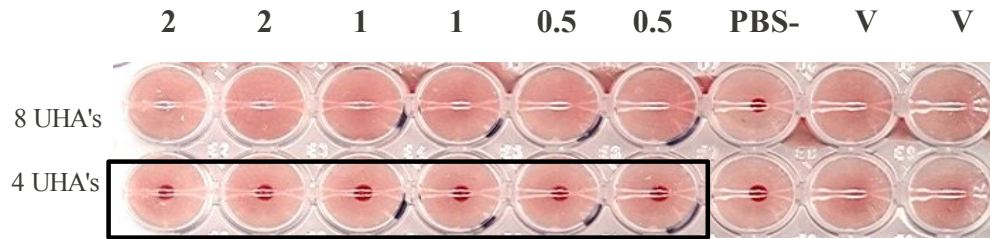
#### 8.4.1 Curvas de concentración inhibitoria de los cinco compuestos sobre la actividad de la HA

Una vez demostrada la actividad de inhibición de la hemaglutinación (HI) de los 5 compuestos mencionados, se cuantificó la concentración mínima a la que cada compuesto conserva la inhibición sobre la hemaglutinina impidiendo su actividad de formación de la red hemaglutinante con los eritrocitos, resultando que en general los compuestos conservaron actividad hemaglutinante a una concentración de 500  $\mu$ M en DMSO al 10% (figura 10 y 11).

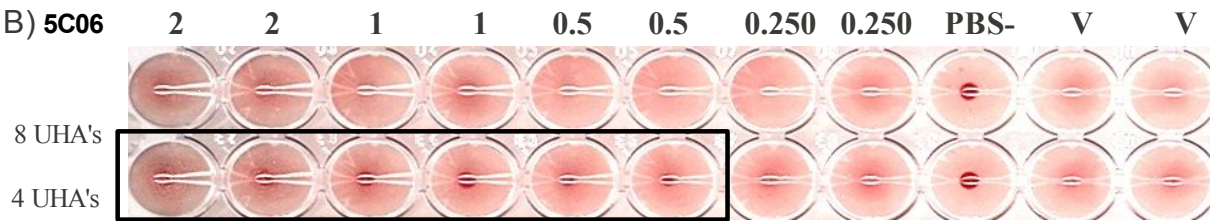


**Figura 10. Curvas de concentración inhibitoria de la hemaglutinación (HI) del compuesto 1G05.** Se realizó el ensayo para evaluar la HI de distintas concentraciones del compuesto 1G05 sobre el *vH1N1*. De esta forma se evidenció la concentración mínima a la que el compuesto conservó su actividad de HI. Previo a la adición de la suspensión de eritrocitos, el *vH1N1* se incubó 4 hrs con las distintas concentraciones del compuesto o los controles. En un cuadrado se muestra el botón de eritrocitos indicando que ocurrió la HI producida el compuesto 1G05. Se indica en las columnas las concentraciones del compuesto, **2:** 2 mM, **1:** 1 mM, **0.5:** 0.5 mM, **0.25:** 0.25 mM, **PBS-:** Control negativo sin virus y sin compuesto, únicamente eritrocitos con DMSO al 10% en PBS, **V:** Control positivo con virus sin compuesto. Se indican las UHA's empleadas en cada fila.

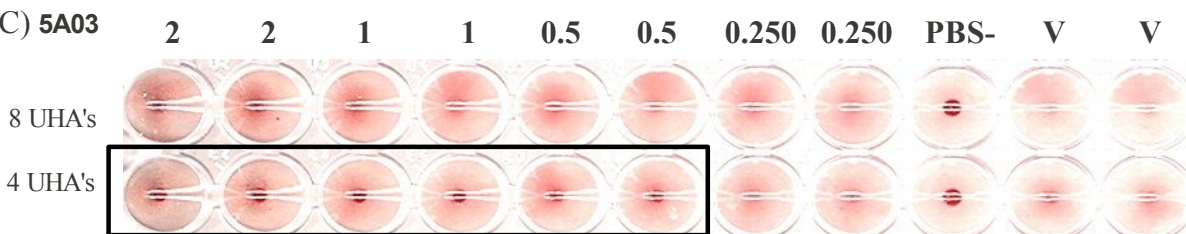
A) 1F06



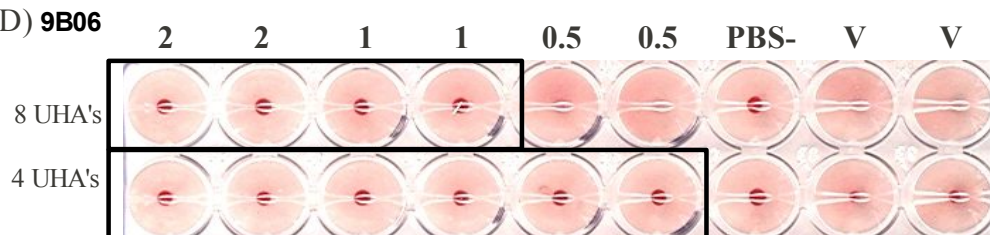
B) 5C06



C) 5A03



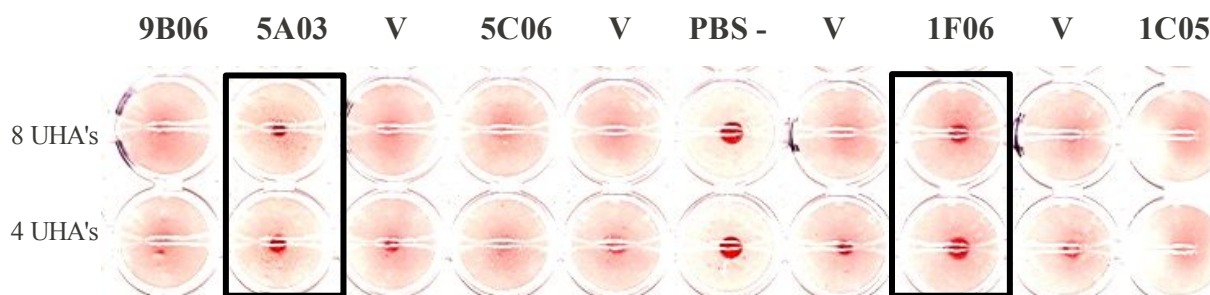
D) 9B06



**Figura 11. Curvas de concentración inhibitoria de la hemaglutinación (HI) de los compuestos 1F06, 5C06, 5A03 y 9B06.** Se realizó el ensayo para evaluar la HI de distintas concentraciones de los compuestos positivos sobre el *vH1N1*. De esta forma se evidenció la concentración mínima a la que los compuestos conservaron su actividad de HI. Previo a la adición de la suspensión de eritrocitos, el *vH1N1* se incubó 4 hrs con las distintas concentraciones de los compuestos o los controles. En un cuadrado se muestra el botón de eritrocitos indicando que ocurrió la HI producida por los compuestos. Se muestran los compuestos: A) 1F06. B) 5C06. C) 5A03 y D) 9B06. Se indica en las columnas las concentraciones para cada compuesto, 2: 2 mM, 1: 1 mM, 0.5: 0.5 mM, 0.25: 0.25 mM, PBS-: Control negativo sin virus y sin ningún compuesto, únicamente eritrocitos con DMSO al 10% en PBS, V: Control positivo con virus sin ningún compuesto. Se indican las UHA's empleadas en cada fila.

### 8.4.2 Determinación de la dependencia de la pre-incubación en la actividad inhibitoria.

Como se mencionó anteriormente en el escrutinio de inhibición de actividad de la hemaglutinina, los compuestos se pre-incubaron por 4 hrs con el *vH1N1*, para de esta forma abarcar la detección de posibles inhibidores en los que existiese un equilibrio en la unión del compuesto a la hemaglutinina previa una inactivación, como se ha reportado que ocurre para algunos inhibidores de la glicerol cinasa o la triosa fosfato isomerasa (Pettigrew, 1987; Téllez-Valencia *et al.*, 2002). Un análisis preliminar indicó que para los compuestos 5A03 y 1F06 la unión a la hemaglutinina es independiente del tiempo de pre-incubación, mientras la unión de los compuestos 1G05, 9B06, 5C06 es dependiente del tiempo de pre-incubación (figura 12).



**Figura 12. Compuestos positivos que presentan una inhibición de la hemaglutinación (HI) dependiente del tiempo.** Se evaluó si la actividad de HI de los compuestos positivos, era dependiente del tiempo de incubación del virus con el compuesto. En experimentos anteriores, se demostró la actividad inhibitoria de los compuestos positivos mediante la incubación 4 hrs con el virus (figura 10 y 11). En este experimento se combinaron 2 mM de los compuestos con el *vH1N1* sin permitir un tiempo de incubación, adicionando inmediatamente la suspensión de eritrocitos para desarrollar el ensayo; por lo que, solo los compuestos en que la inhibición sea independiente del tiempo de incubación con el virus, conservarán actividad en este ensayo. Los compuestos cuya inhibición es independiente del tiempo se muestran con un cuadrado. En las columnas se indican los compuestos respectivos con las coordenadas: **9B06, 5A03, 5C06, 1F06 y 1C05. PBS-**: Control negativo sin virus y sin ningún compuesto, únicamente eritrocitos con DMSO al 10%, en PBS. **V**: Control positivo con virus, sin ningún compuesto, en DMSO al 10%. En las filas se indican las UHA's.

### 8.4.3 Identidad de los inhibidores de la HA

La identidad y pureza de los compuestos de la biblioteca resultado del escrutinio que inhiben la hemaglutinación (tabla 2) no ha sido comprobada aún. La identidad puede ser definida como la identificación del compuesto para demostrar que su composición y estructura química corresponde exactamente a la estructura que el proveedor indica.

La necesidad de realizar el control de calidad (identidad, composición o pureza) de los compuestos de la biblioteca se debe a que los fabricantes de compuestos en grandes cantidades venden a los proveedores de las bibliotecas los compuestos, y en este proceso parece no haber una regulación muy estricta. Ya que los compuestos se ensayaron directamente como fueron proporcionados por el proveedor, existe la posibilidad de que el compuesto responsable de la inhibición observada sea un contaminante, un precursor usado en la síntesis, o que el compuesto ensayado sea en realidad un producto de degradación o de interacción con el DMSO del compuesto original (ver sección 9.7).

## **8.5 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LA NA**

Se implementó el ensayo para la determinación de actividad de neuraminidasa, para realizar el escrutinio de la actividad inhibitoria de la biblioteca de los compuestos sobre la neuraminidasa del *vH1N1*.

La neuraminidasa (NA) corta los residuos de ácido siálico unidos a proteínas glicosiladas lo que se denomina actividad de exoglicosidasa o sialidasa. El ácido acetyl neuramínico, también es denominado ácido siálico, ácido 5-acetamido-3,5-dideoxi-glicero-galactononulosónico, ácido lactamínico, NAN o NANA.

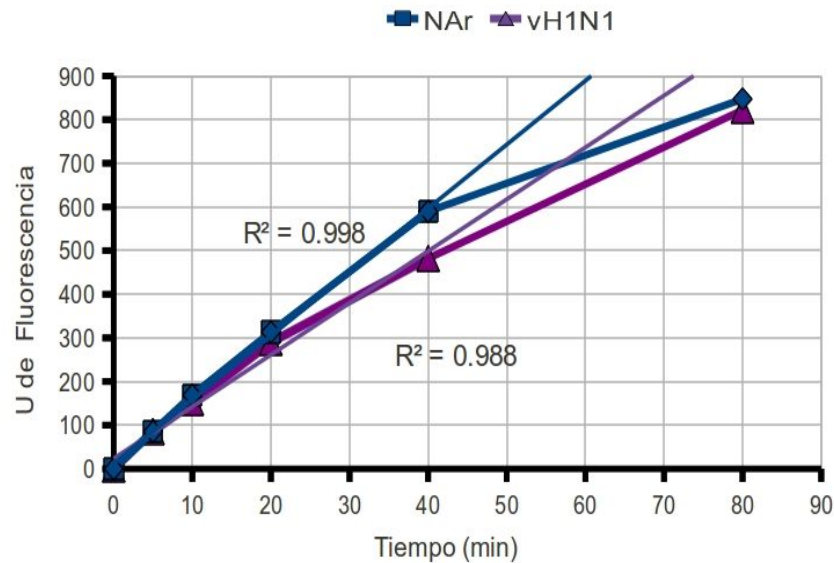
La enzima empleada para el escrutinio fue la neuraminidasa recombinante (NAr) del virus de la influenza H1N1 A/California/04/2009 (Sino Biological) expresada en células HEK293, proporcionada por el proveedor como extracto celular y para la comprobación de actividad de los compuestos sobre la neuraminidasa viral se empleó la enzima neuraminidasa presente en el virus de la influenza A (H1N1) México 2009 producido en células MDCK en medio SFM sobre microacarreadores inactivado con etilenimina (*vH1N1*). Para conocer las características de la reacción y poder llevar a cabo el escrutinio fue necesario evaluar el efecto del tiempo de reacción, la concentración de enzima y la concentración de DMSO sobre la actividad de las distintas neuraminidasas empleadas en este trabajo.

A pesar de estar inactivado el *vH1N1*, las reacciones se realizaron en el INER siguiendo las condiciones de bioseguridad del Departamento de Virología y como se mencionó la reacción fue detenida con el amortiguador de paro conteniendo 25% de etanol pH 10.7., con lo cual se aseguró el manejo seguro del agente patógeno.

### **8.5.1 Comportamiento lineal de la reacción sobre el tiempo**

Para determinar el tiempo adecuado para tener una lectura representativa de la reacción, se determinó la cantidad de producto producido (señal fluorescente) a distintos tiempos durante el desarrollo de la reacción a 37° C .

El comportamiento con respecto al tiempo de reacción de la neuraminidasa NAr y del *vH1N1* inactivado puede considerarse lineal en el intervalo determinado de 0 a 40 minutos, como indica el coeficiente de correlación (figura 13).



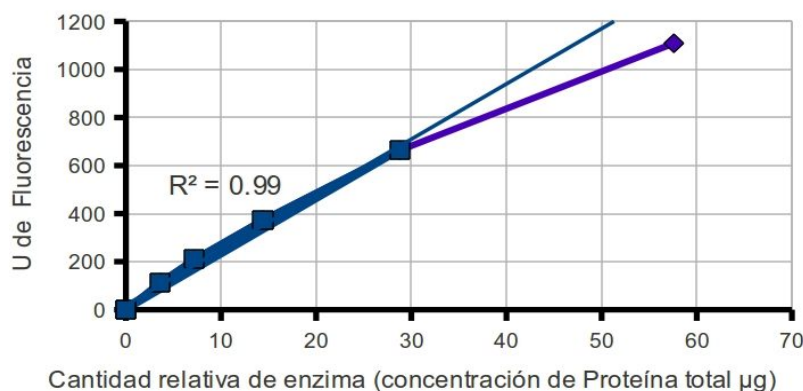
**Figura 13. Comportamiento de la NAr y la neuraminidasa del *vH1N1* con respecto al tiempo de la reacción.** Para cada enzima, se determinó la cantidad de producto obtenido tomando muestras a distintos tiempos durante el desarrollo de la reacción. Se muestra el comportamiento de la NAr en cuadrados y el comportamiento de la neuraminidasa del *vH1N1* en triángulos; para cada enzima se indica el coeficiente de correlación para la parte lineal de su comportamiento.

### 8.5.2 Comportamiento lineal de la reacción sobre la cantidad de enzima

La reacción se llevó a cabo con incrementos por duplicación de la cantidad de enzima NAr. La actividad fue proporcional a la cantidad de enzima. El comportamiento fue completamente lineal en el rango de 0 a 30  $\mu\text{g}$  de proteína total (figura 14).

Buscando emplear para las reacciones individuales una cantidad de enzima NAr equivalente a la cantidad empleada en el caso del *vH1N1* y a la vez dentro del intervalo de linealidad de actividad con respecto los incrementos en la concentración, se decidió emplear 11.7  $\mu\text{g}$  de proteína total del extracto celular conteniendo la NAr para las reacciones subsecuentes.





**Figura 14. Proporcionalidad de la reacción a la cantidad de enzima NAr.** Serie de ensayos de actividad realizados con incrementos en la cantidad relativa de NAr. La cantidad relativa de enzima recombinante fue cuantificada en relación con los µg de proteína total del extracto de células HEK293 expresando la NAr. Se indica el coeficiente de correlación para la parte lineal del comportamiento.

### 8.5.3 Efecto del DMSO en la reacción

Debido a que los compuestos de la biblioteca Maybridge tenían distintas solubilidades, se mantuvo el DMSO a una concentración de 10% en la pre-incubación con la NAr, lo que permite que los compuestos con baja solubilidad no se precipiten.

Se determinó el efecto sobre la actividad enzimática de la pre-incubación con DMSO a concentraciones de 2.5%, 5%, 10% y 20% (figura 15a). Para dicha evaluación existen 2 partes del ensayo sobre las que puede actuar el DMSO: sobre la proteína durante la pre-incubación de la enzima o bien ya en la reacción sobre la catálisis.

Se observó que la enzima pre-incubada con 10% de DMSO conserva un 87% de la actividad total (figura 15a), por lo que era posible trabajar con este ligero efecto sobre la NAr para usarla en la detección de inhibidores de la actividad de la enzima con solo introducir los controles adecuados en el ensayo: el blanco sin contener enzima, el control negativo de inhibición con solo la neuraminidasa y el control positivo de inhibición conteniendo el profármaco del Oseltamivir carboxilato. También se observó que existe un efecto muy ligero de la disminución de actividad de la NAr por si misma tan solo por el tiempo de incubación en el amortiguador, y la presencia del DMSO incrementa la disminución de la actividad de una forma uniforme. También se evaluó el efecto de la pre-incubación del DMSO al 5% sobre la neuraminidasa del *vH1N1* con un resultado similar (figura 15b).

La concentración de DMSO final usada en la pre-incubación de las reacciones con los inhibidores fue de 10%, mientras que en la catálisis fue de 3%.

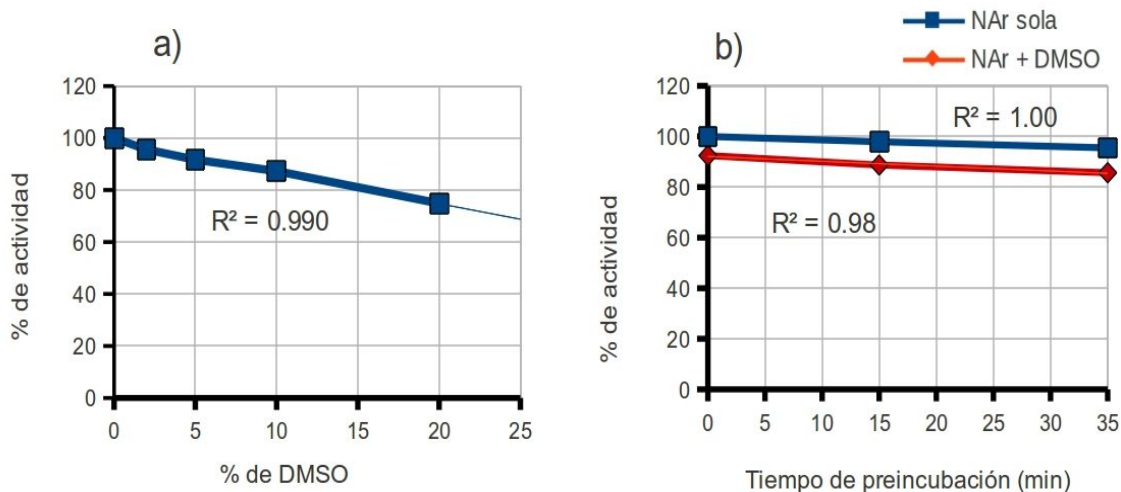


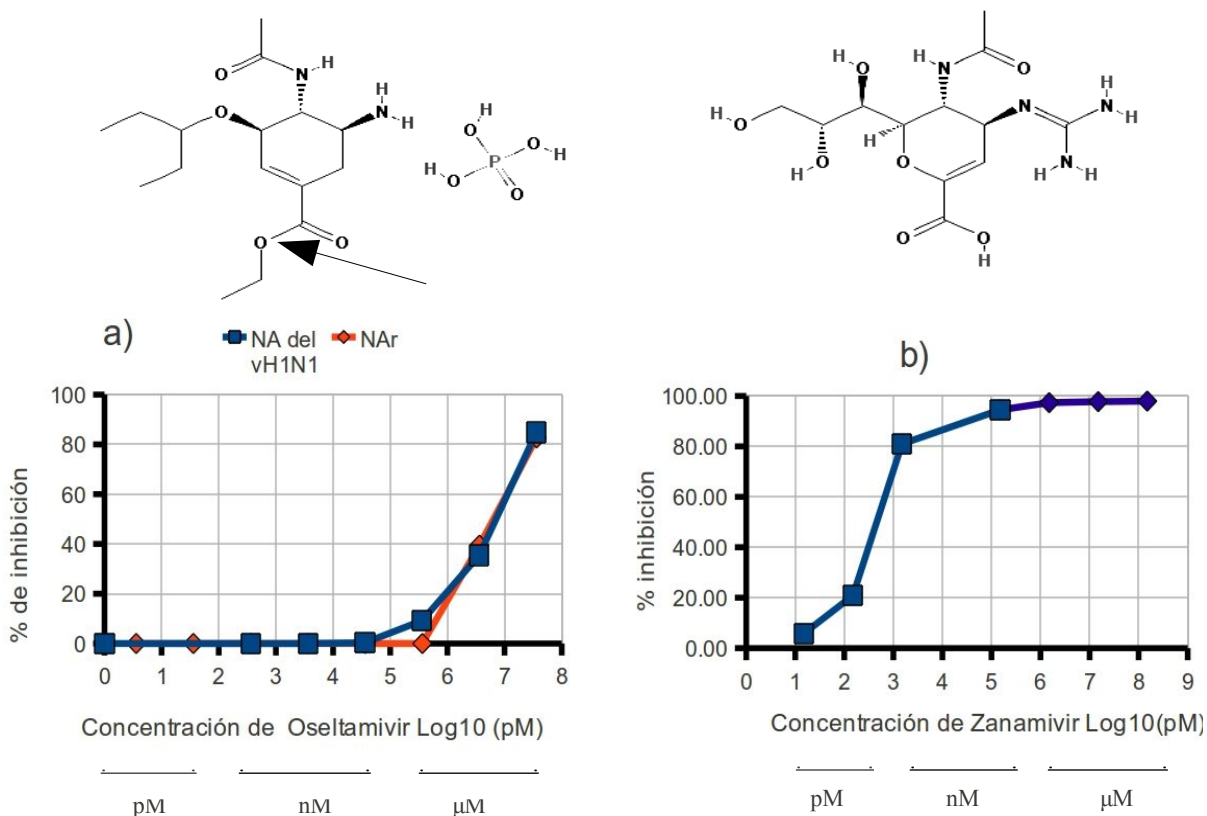
Figura 15. Efecto de la pre-incubación con DMSO sobre la actividad de la NAr. a) Efecto de la pre-incubación de la NAr con distintas concentraciones de DMSO sobre la actividad de la enzima. La pre-incubación con DMSO se realizó durante 4 hrs a temperatura ambiente. Se indica en la gráfica el coeficiente de correlación para la parte lineal del comportamiento; b) Efecto del tiempo de pre-incubación de la NAr con DMSO al 5%.

#### 8.5.4 Inhibición por Oseltamivir y Zanamivir como controles

Se evaluó el efecto inhibitorio de distintas concentraciones de Oseltamivir sobre la NAr y la neuraminidasa del *vH1N1*, para demostrar que nuestro sistema era susceptible de ser inhibido y que de existir inhibición era detectable. Se encontró una inhibición de la NAr al 50% con aproximadamente. 8  $\mu\text{M}$  del etil éster del carboxilato de Oseltamivir comercial (Tamiflu) (figura 16a) y que el procedimiento montado si tenía la capacidad de detectar la inhibición. Se obtuvo un resultado similar de concentración inhibitoria para la neuraminidasa del *vH1N1*. Estos resultados dieron la posibilidad de utilizar este fármaco como control positivo de inhibición en todas las corridas de reacción, a pesar de ser un profármaco que no presentaba la concentración inhibitoria al 50% de 2 nM del fármaco metabolizado (Gubareva *et al.*, 2002; Tai *et al.* 1998).

En el caso del profármaco etil éster del carboxilato de Oseltamivir (GS4104) es convertido en el fármaco activo Oseltamivir carboxilato (GS4071) al ser hidrolizado por las esterasas del intestino (figura 16a) (Li *et al.*, 1998), por lo que el efecto observado de concentración inhibitoria elevada había puesto en duda la detección de nuestro sistema. Entonces se determinó el efecto inhibitorio del fármaco Zanamivir (GG167) que es proporcionado de forma comercial ya como fármaco (figura 16b) y se ha reportado escasa resistencia de las cepas virales (Kingsford *et al.*, 2009), por lo que inclusive si se trabajara con un virus resistente al Oseltamivir al determinar el rango de inhibición por el Zanamivir, se determinaría que el efecto de los compuestos encontrados en este trabajo en un rango correcto. Nuestros resultados indican que el Zanamivir ejerció una inhibición del 50% de la actividad de la NAr con una concentración aproximada de 400

pM (figura 16b), lo cual se encuentra en el rango reportado de 900 pM por Gubareva *et al.* 2001.



**Figura 16. Efecto del Oseltamivir y el Zanamivir sobre la NAr y la neuraminidasa del vH1N1.** Se determinó la inhibición de la actividad enzimática con distintas concentraciones de los inhibidores comerciales Oseltamivir y Zanamivir. a) Inhibición de la NAr y la neuraminidasa del vH1N1 por el profármaco del Oseltamivir, y estructura del inhibidor. El Oseltamivir es administrado de forma oral como el profármaco etil éster del carboxilato de Oseltamivir (Tamiflu), y es procesado por las esterasas del intestino. La flecha indica el sitio en la estructura en que las esterasas hidrólizan el profármaco para generar el fármaco. b) Inhibición de la NAr por el Zanamivir, y estructura del compuesto. Bajo las gráficas se indican con líneas los rangos de concentración abarcados por los valores gráficos.

## 8.6 ESCRUTINIO DE INHIBICIÓN DE LA NEURAMINIDASA

### 8.6.1 Ensayo aproximación estilo HTS

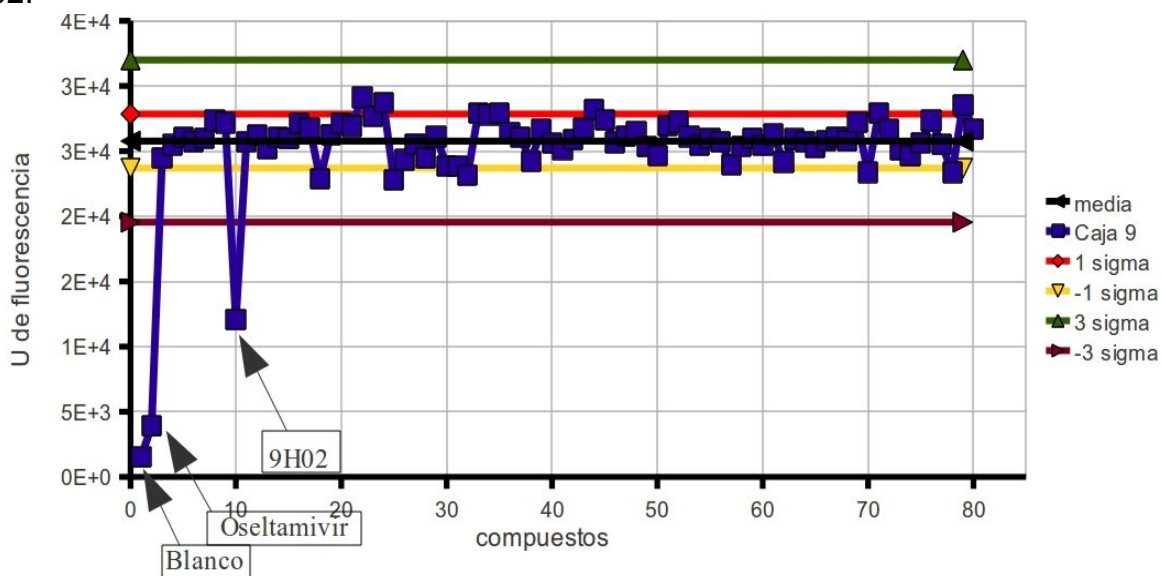
Para el escrutinio de los 1000 compuestos de la biblioteca Maybridge Ro3 (en la sección 1.3.7 se mencionan algunas de sus características) se realizó el montaje de un ensayo tipo escrutinio de alta eficiencia (HTS), probando los compuestos para tener actividad inhibitoria sobre la NAr. Se detectó la existencia de inhibición por disminución en la señal fluorescente del producto de la reacción comparada con la actividad de la enzima NAr en DMSO sin adición de inhibidores (figura 17).



Los compuestos se pre-incubaron por 4 hrs con la NAr para abarcar la detección de posibles compuestos en los que existe un equilibrio en la unión a la proteína previa a la inhibición y por tanto la inhibición fuese dependiente del tiempo de pre-incubación (Téllez-Valencia *et al.*, 2002, Gubareva *et al.*, 2002), tras lo cual se llevó a cabo la reacción. En cada corrida se introdujeron 3 controles: el blanco sin contener enzima, el control negativo de inhibición con solo la neuraminidasa y el control positivo de inhibición conteniendo el profármaco del Oseltamivir (figura 16a y 17) (sección 8.5.4).

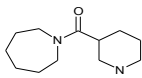
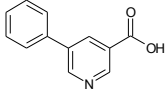
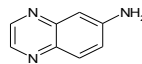
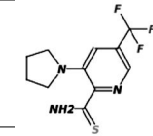
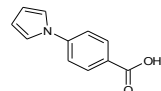
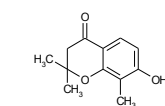
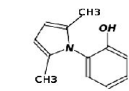
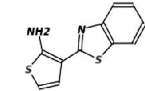
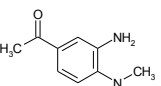
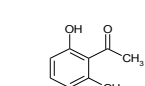
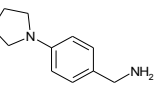
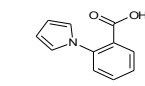
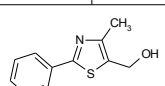
Se detectó actividad inhibitoria de la NAr de los compuestos con las coordenadas de la biblioteca 9H02, 4G07, 5E06, 3H08, 8A10, 4H10, 4H06, 12B02, 10G04, 12H04, 2D05, 5C03, 4G09 (ver Tabla 3).

La señal obtenida de la actividad de la NAr en el escrutinio para los compuestos (figura 17) fue tratada estadísticamente para evaluar mas fácilmente que compuestos presentaban actividad inhibitoria, los compuestos inhibidores se encontraron mas allá de las 3 desviaciones estándar sobre la lectura de los compuestos sin actividad sobre la enzima. Este es un criterio conocido como 6 sigma usado para una distribución normal en el control estadístico de procesos (Tennant, 2001) para evaluar si hay variaciones en el proceso que no son debidas al azar. En la figura 17 se muestra un gráfico estadístico del escrutinio estilo HTS, donde se indican con flechas la fluorescencia del blanco, el control de inhibición por el profármaco del Oseltamivir y la detección del compuesto 9H02.



**Figura 17. Tratamiento estadístico del escrutinio estilo HTS de compuestos con posible actividad inhibitoria sobre la NAr.** Se muestra el efecto sobre la actividad de la NAr de 80 compuestos de la biblioteca Ro3 de Maybridge, que fue graficado para evaluar estadísticamente que compuestos presentaban actividad inhibitoria. La evaluación se realizó mediante el criterio conocido como 6 sigma, empleado en el control estadístico de procesos, para juzgar un fenómeno que debería presentar una distribución normal. Las flechas de izquierda a derecha indican el blanco, el control de la NAr inhibida por el Oseltamivir (figura 16a), y la detección del compuesto 9H02. La línea central representa la media de la actividad de la NAr, y las líneas superiores e inferiores representan  $\pm 1$  y  $\pm 3$  desviaciones estándar.

**Tabla 3. Estructura de compuestos positivos para inhibir a la NAr resultado del escrutinio.**

Coordenada	Estructura	Nombre	CAS. No	Coordenada	Estructura	Nombre	CAS. No
		AzPM					
9H02		1-azepanil(3-piperidinil)metanona	690632-28-1	4H06		Ácido 5-fenilnicotínico	10177-12-5
		AQA					
3H08		6-quinoxalinamina	6298-37-9	12B02		3-(1-pirrolidinil)-5-(trifluorometil)piridin-2-carbotoamida	257287-82-4
		APIB					
4G07		ácido 4-(1H-pirrol-1-il)benzoico	22106-33-8	10G04		7-hidroxi-2,2,8-trimetil-2,3-dihidro-4H-cromen-4-ona	50544-72-4
_5E06		ácido 2-(2,5-dimetil-1H-pirrol-1-il)benzoico	92028-57-4	12H04		3-(1,3-benzotiazol-2-il)tiofen-2-amina	306936-47-0
							5
8A10		1-[3-amino-4-(metilamino)fenil]-1-etanona	18076-19-2	2D05		1-(2,6-dihidroxifenil)etan-1-ona	699-83-2
4H10		[4-(1-pirrolidinil)fenil]metanamina	114365-04-7	5C03		Ácido 2-(1H-pirrol-1-il)benzoico	10333-68-3
				4G09		(4-metil-2-fenil-1,3-tiazol-5-il)metanol	61291-91-6

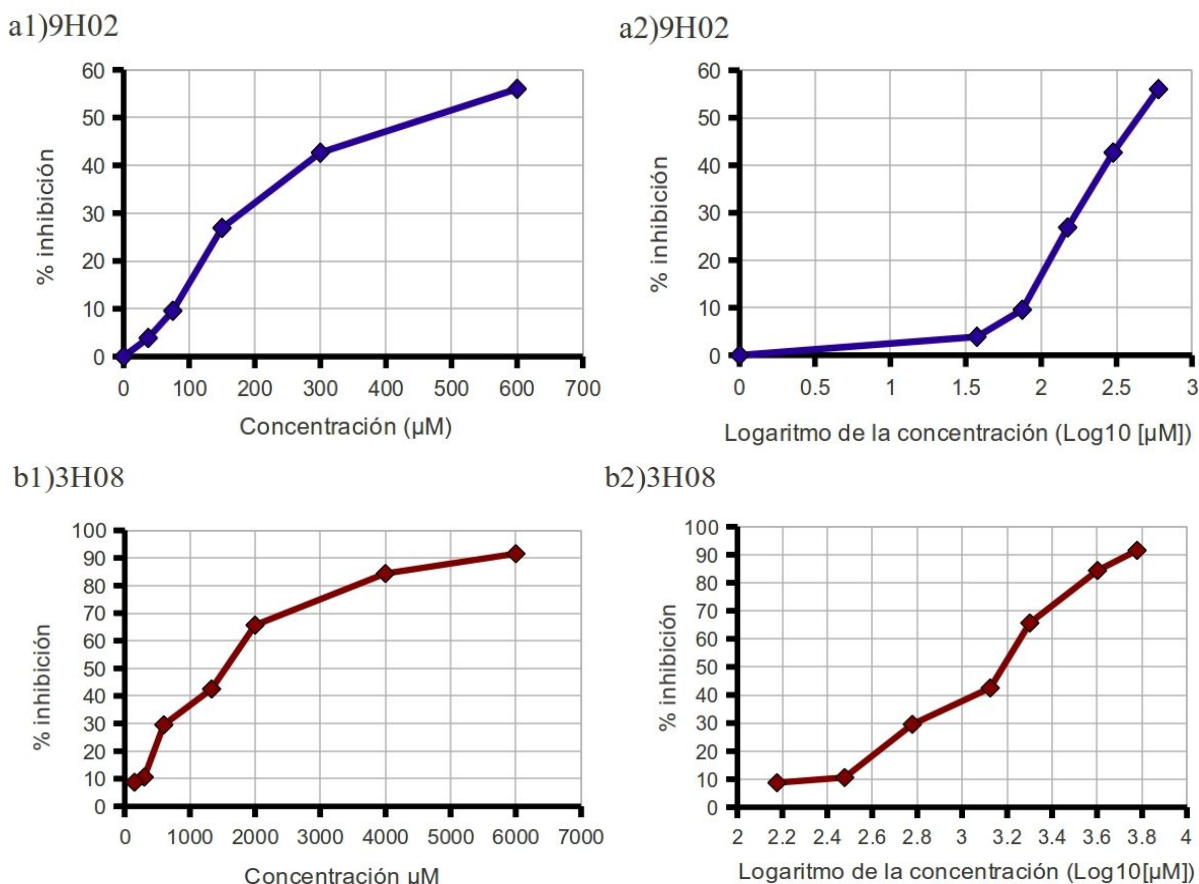
### 8.6.2 Confirmación de la actividad inhibitoria de los trece compuestos detectados sobre la NAr.

El ensayo estilo HTS permitió detectar las variaciones con mayor sensibilidad, por lo que se encontraron 13 compuestos con alguna inhibición de la actividad de la NAr. Los compuestos detectados con una concentración de 600  $\mu$ M en la reacción

fueron corroborados por reacciones individuales determinando para cada uno de ellos la inhibición de la NAr (Tabla 3, para los datos en detalle ver apéndice).

Se determinó de forma preliminar si la inhibición era dosis-dependiente para los compuestos 4G07, 3H08, 4H10, 4H06, 12B02, 10G04 y 12H04, 5E6 y 8A10 (tabla 3), cuyos resultados se muestran en el apéndice.

Para el compuesto 9H02 (el más activo) la concentración en la reacción a la que se inhibiría al 50% la actividad de la NAr es de 390  $\mu\text{M}$  (figura 18a). Para el compuesto 3H08 la concentración en la reacción a la que se inhibiría al 50% la actividad de la NAr es de 1,260  $\mu\text{M}$  (figura 18b)



**Figura 18. Curvas de concentración inhibitoria sobre la NAr de los compuestos 9H02 y 3H08.** La neuraminidasa fue pre-incubada con distintas concentraciones de cada compuesto, y se determinó la inhibición de su actividad. Se muestra la inhibición de la NAr con respecto a: **a1)** distintas concentraciones del compuesto 9H02; **a2)** el logaritmo de la concentración del compuesto 9H02; **b1)** distintas concentraciones del compuesto 3H08; **b2)** el logaritmo de la concentración del compuesto 3H08. El porcentaje de inhibición de la NAr por los compuestos se calculó con respecto a la actividad de la enzima sin inhibidor.

## 8.7 IDENTIDAD DE LOS COMPUESTOS INHIBIDORES DE LA NEURAMINIDASA

Los compuestos de la biblioteca de Maybridge en teoría son proporcionados con una pureza de entre el 95% y el 97% (algunas otras características de la biblioteca se mencionan en la sección 1.3.7). Sin embargo, se ha reportado que es necesario realizar estrictos controles de calidad como análisis de identidad y estabilidad a los compuestos a probar (Aiello *et al.*, 2009, Barelier *et al.*, 2010). En nuestro caso, los compuestos fueron usados directamente del fabricante, por lo que nos enfrentamos a la posibilidad de que fuesen las impurezas las responsables de la inhibición observada (metales, halógenos, etc.), o bien algún precursor usado en la síntesis, o un producto de degradación o de interacción con el DMSO. Así, se procedió a demostrar la composición o identidad de algunos fragmentos de la biblioteca detectados con actividad sobre la NAr.

### 8.7.1 Actividad del compuesto 3H08 (6- Aminoquinoxalina) sobre la NAr.

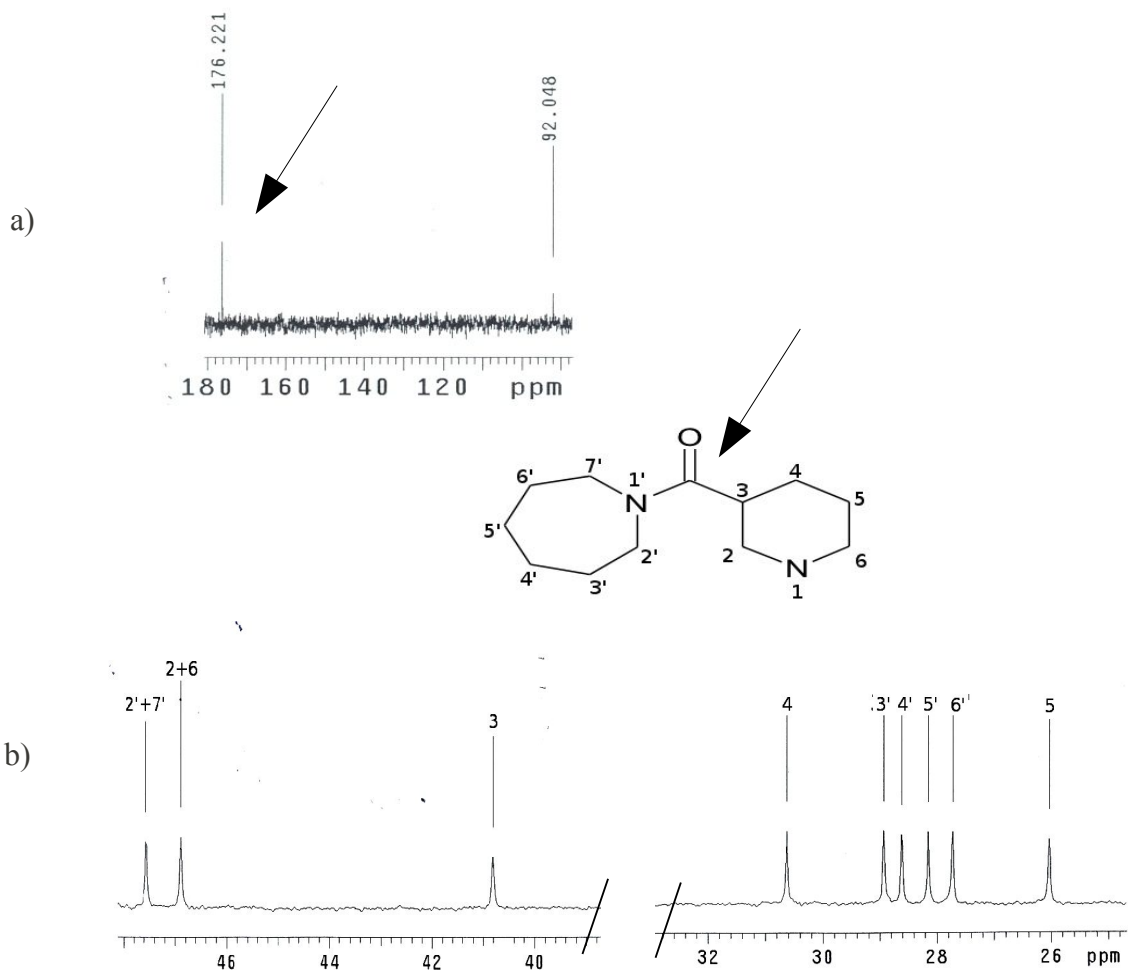
Se evaluó si el compuesto 6-Aminoquinoxalina (AQA) de Sigma-Aldrich, con una pureza de 95% determinada por cromatografía de gases por el proveedor, presentaba la misma actividad inhibitoria sobre la neuraminidasa recombinante (NAr) que presentó el compuesto con las coordenadas 3H08 de la biblioteca de Maybridge (tabla 4). Se encontró que la actividad inhibitoria del compuesto con coordenadas 3H08 corresponde al compuesto AQA, pues ambos compuestos presentaron 26% de inhibición sobre la NAr usando 600  $\mu$ M del compuesto y las mismas condiciones de reacción.

### 8.7.2 Identidad del compuesto 9H02 (1-azepanil (3-piperidinil) metanona) por RMN.

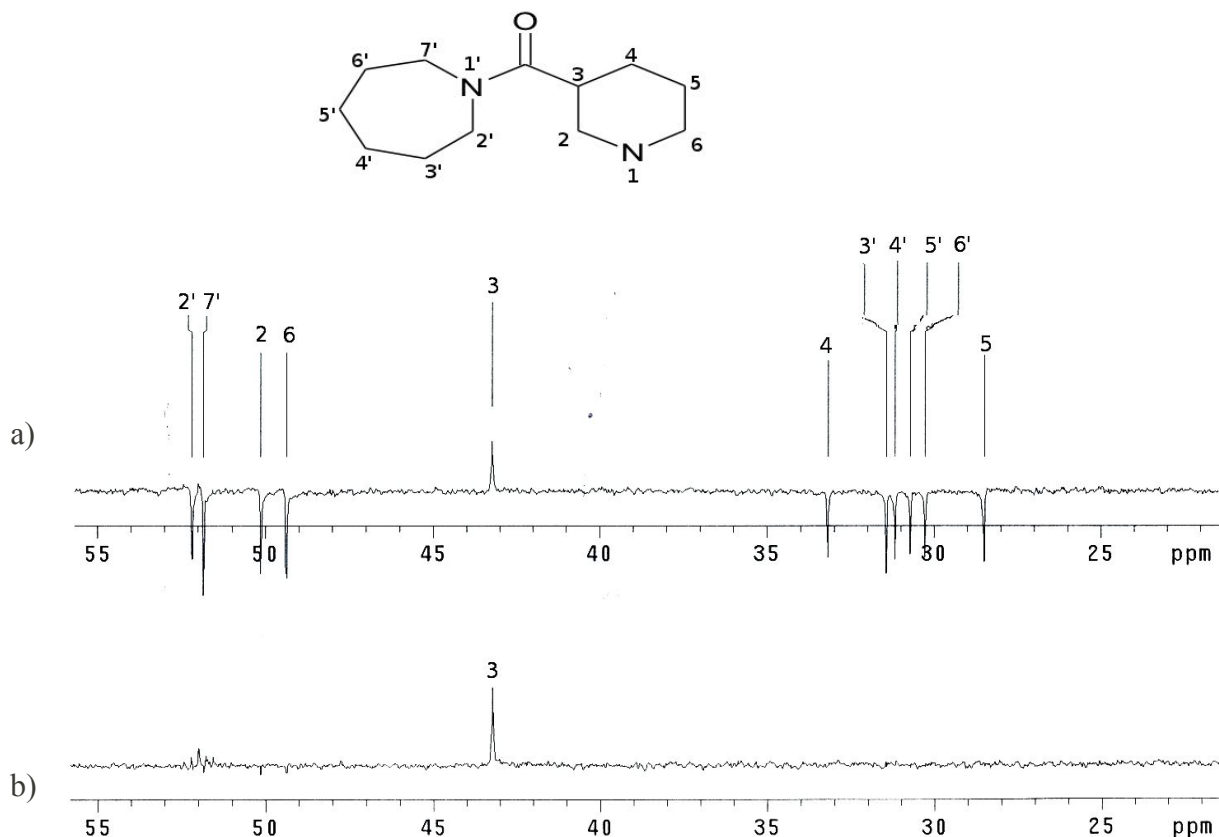
El compuesto con las coordenadas 9H02 (tabla 4) de la biblioteca de Maybridge debería corresponder a la 1-azepanil (3-piperidinil) metanona (AzPM). El espectro por RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto analizado debe corresponder a la predicción (simulación computacional) del espectro de  $^{13}\text{C}$  del compuesto. El compuesto 9H02 en metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) fue analizado por RMN de  $^{13}\text{C}$  y DEPT (distorsionless enhancement polarization transfer, incremento sin distorsión por transferencia de polarización) con una longitud del pulso variable de  $90^\circ$  y  $135^\circ$ , encontrando que las señales observadas en el espectro corresponden con la estructura de la 1-azepanil (3-piperidinil) metanona, y aparentemente no se detecta ninguna otra señal en el rango, por lo que fue identificada como el único componente del compuesto de la biblioteca con una pureza de al menos 97% (figura 19).

El experimento DEPT permite detectar y distinguir las señales del núcleo activo  $^{13}\text{C}$  en función del número de átomos  $^1\text{H}$  acoplados (el  $^1\text{H}$  es un núcleo más sensible). Además en el DEPT la selección de la longitud de uno de los pulsos de radiofrecuencia variable en  $45^\circ$ ,  $90^\circ$  o  $135^\circ$  hace posible discernir las señales correspondientes a “carbonos” metilenos ( $\text{CH}_2$ ) de los otros carbonos unidos a hidrógeno (a  $90^\circ$ ) o entre los “carbonos” metino ( $\text{CH}$ ) y metilos ( $\text{CH}_3$ ) (a  $135^\circ$ ).

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  se observa una señal a 176.2 ppm que corresponde a un grupo carbonilo de amida (figura 19a), y en el experimento DEPT se observaron cuatro señales en 31.4, 31.1, 30.7, y 30.2 ppm para cuatro metilenos del azepanilo (C-3', C-4', C-5' y C-6' respectivamente, figura 20a). En 52.1 y 51.8 ppm se observan las señales de los dos metilenos alfa al nitrógeno del azepanilo (C-2' y C-7' respectivamente, figura 20a); las señales en 50.1, 49.4, 33.2, y 28.5 ppm se asignan a los metilenos del anillo de piperidinilo (C-2, C-6, C-4 y C-5 respectivamente, figura 20a), y la señal en 43.2 ppm corresponde al metino del piperidinilo (C-3, figura 20a y 20b).



**Figura 19. Espectro de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  del compuesto 9H02 (1-azepanil (3-piperidinil) metanona).** Análisis para identificar el compuesto con las coordenadas 9H02 de la biblioteca Maybridge observando la presencia aparentemente única de la 1-azepanil (3-piperidinil) metanona. **a)** Se muestra la región del espectro de  $^{13}\text{C}$  en el rango de 90 a 180 ppm observándose una señal en 176.2 para el grupo carbonilo (indicado por la flecha). **b)** Se muestra la región del espectro de  $^{13}\text{C}$  en el rango de 26 a 48 ppm; la asignación de las 11 señales aquí observadas se realizó con los datos del espectro de RMN del experimento DEPT (figura 20). Se muestra la estructura química con la asignación de las señales de los carbonos de la 1-azepanil (3-piperidinil) metanona.



**Figura 20. Espectro de resonancia magnética nuclear de DEPT a 135° y 90° (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) del compuesto 9H02 (1-azepanil (3-piperidinil) metanona).** Para asignar las señales del espectro de RMN de <sup>13</sup>C se analizó el compuesto con las coordenadas 9H02 de la biblioteca Maybridge mediante: **a)** Experimento DEPT con pulso variable de 135°, observando las diez señales que corresponden a “carbonos” metilenos (CH<sub>2</sub>) (en la gráfica se observan como señales “negativas”: cuatro señales del piperidinilo [C-2,C-4,C-5,C-6] y seis señales del azpanilo [C-2', C-3', C-4', C-5', C- 6', C-7']), y una señal que corresponde al “carbono” metino (C-3, en la gráfica se observa como “positivo”: del piperidinilo). **b)** Experimento DEPT con pulso variable de 90°, que permite distinguir el C-3 entre un “carbono” metino (CH) del piperidinilo de un “carbono” metilo (CH<sub>3</sub>). Se observa la presencia aparentemente única de la 1-azepanil (3-piperidinil) metanona, de la cual se muestra la estructura química con la asignación de las señales de los carbonos.

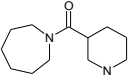
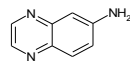
### 8.7.3 Evaluación del efecto de AQA y AzPM sobre la neuraminidasa del vH1N1.

En la tabla 4 se muestra un resumen de los resultados de evaluación de actividad de estos 2 compuestos ensayados sobre el vH1N1. El compuesto AQA presento una inhibición de 26% sobre la neuraminidasa recombinante (NAr) y conservo su actividad inhibitoria sobre la neuraminidasa del vH1N1 (30%). Por otro lado, el compuesto AzPM tuvo una inhibición de 57% sobre la NAr y solo 14% sobre la

neuraminidasa del *vH1N1* en las condiciones ensayadas, a una concentración de AzPM de 600  $\mu$ M en la reacción.

La actividad inhibitoria de los otros compuestos detectados en el escrutinio se muestra en el apéndice.

**Tabla 4. Inhibición de la NAr y la neuraminidasa del *vH1N1* por los compuestos identificados y corroborados.**

Estructura	Coordenada	Nombre	Estatus de comprobación del compuesto	NAr					Virus Influenza A (H1N1)	Dependencia del Calcio
				Concentración en la reacción					600 $\mu$ M	
				600 $\mu$ M	300 $\mu$ M	150 $\mu$ M	75 $\mu$ M	42 $\mu$ M	2 hrs	
				4 hrs	4 hrs	4 hrs	4 hrs	4 hrs	% Inhibición	% Inhibición
	9H02	AzPM								
		1-azepanil(3-piperidinil)metanona	Identidad corroborada por RMN	57%	45%	30%	15%	10%	14 % (en Presencia de Calcio 2mM)	Dependiente de Ca
	3H08	AQA								
		6-aminoquinoxalina (también denominado 6-quinoxalinamina)	El compuesto puro de Sigma presentó Actividad.	26%	11%	9%	nd	0%	30% (para compuesto de Sigma)	Independiente de Ca

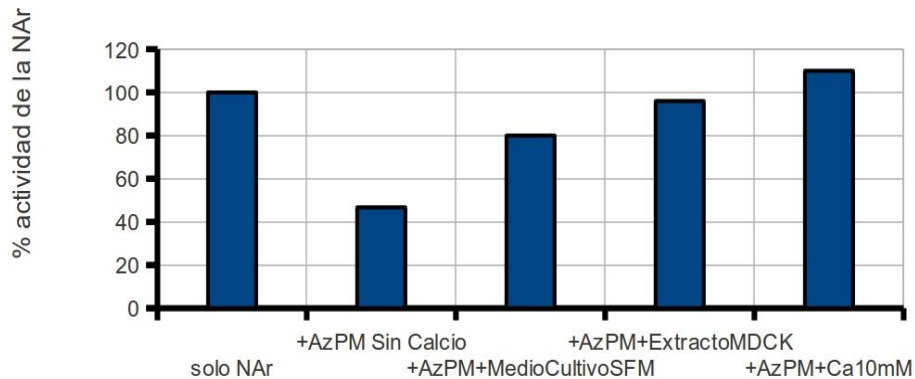
\*nd: no determinado

#### 8.7.4 Efecto inhibitorio del AzPM sobre la neuraminidasa en presencia de calcio.

Dado que la inhibición de la neuraminidasa del *vH1N1* con la 1-azepanil (3-piperidinil) metanona (AzPM) fue limitada, comparada con la inhibición de la neuraminidasa recombinante (NAr) (tabla 4), se consideró que la reducción del efecto inhibitorio podía deberse a diferencias intrínsecas entre las 2 proteínas, o bien a diferencias en el medio de reacción. Se observó que la diferencia se centraba en el calcio presente en el fluido viral, ya que la NAr es suministrada con una somera purificación, que no es especificada por el proveedor, pero posiblemente involucra la remoción del medio de cultivo (apéndice).

Se comprobó que la diferencia entre en la inhibición de la AzPM (9H02) sobre la NAr y sobre la neuraminidasa del *vH1N1*, se debía a que el medio de cultivo con que se produjo el virus contiene 1.8 mM de calcio (que introduce 500  $\mu$ M de calcio a la reacción). Sin la adición de calcio, la inhibición de actividad de la NAr fue de 57% con 600  $\mu$ M de AzPM. Como resultado de la adición de medio de cultivo, la inhibición de actividad de la NAr con 600  $\mu$ M de AzPM se redujo a solo 15% (figura 21). La adición de una solución de  $\text{CaCl}_2$  10 mM, en las condiciones mencionadas, incluso incrementó la actividad de la neuraminidasa un 10% sobre la enzima sin inhibidores (figura 21). Por lo que se concluyó que la inhibición de la NAr por el AzPM disminuye de forma proporcional a la concentración de calcio.

Existe una aparente diferencia entre el efecto del medio SFM y el efecto con el extracto de células MDCK, al ser adicionados a la reacción conteniendo el AzPM. Dicha diferencia puede ser explicada por el tiempo de pre-incubación con cada una de las fuentes de calcio; ya que únicamente en la adición del medio SFM fresco, no se dio un tiempo de pre-incubación con la enzima NAr. Sin embargo, la dependencia de la fuente de calcio para la inhibición de la NA por el AzPM debe ser demostrada con más experimentos (figura 21).

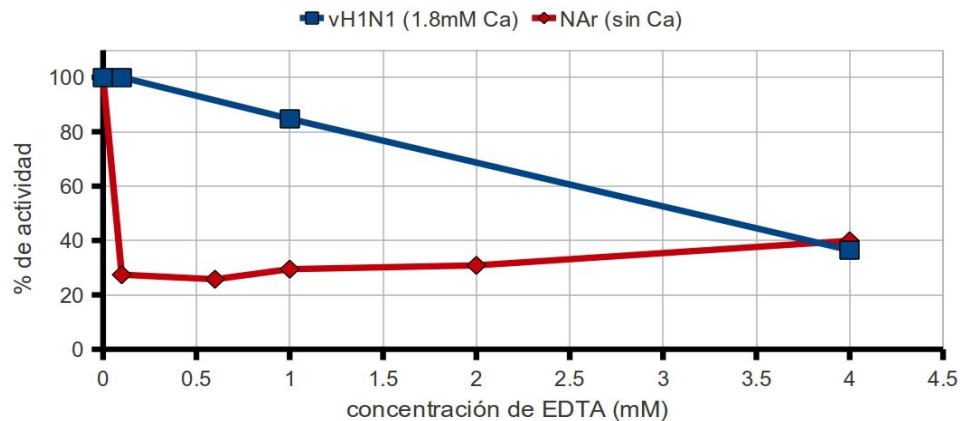


**Figura 21. Efecto de la 1-azepanil (3-piperidinil) metanona (AzPM) sobre la NAr en presencia de calcio.** Se pre-incubó la NAr con distintas fuentes de calcio (medio de cultivo SFM fresco, extracto de células MDCK, o una solución 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ ), o sin la adición de calcio, por 1 hr a temperatura ambiente; tras lo cual se evaluó la inhibición de actividad de la NAr por adición del compuesto AzPM, o sin la adición del compuesto como control. Se calculó el porcentaje de actividad en base a la reacción enzimática sin inhibidor.

Para corroborar el efecto del calcio sobre la estabilidad de la NAr, se realizaron reacciones con la enzima pre-incubada con EDTA a pH 6.0 a concentraciones desde 0 hasta 4 mM. La actividad de la neuraminidasa del *vH1N1* no fue inhibida por el EDTA a 0.1 mM, fue inhibida 15% por la adición de 1 mM de EDTA y 63% por la adición 4 mM de EDTA. En el caso de la NAr fue inhibida en promedio 65% con todas las concentraciones de EDTA desde 0.1 mM a 4 mM (figura 22). De forma inesperada, pudo observarse un pequeño incremento de la actividad de la NAr proporcional a la concentración de EDTA; sin embargo, para demostrar que el incremento no se debe a la variabilidad propia del ensayo sería necesario realizar más experimentos.

El efecto del EDTA sobre la NA del *vH1N1* ha sido descrito por Burmeister *et al.*, 1994 y Gubareva *et al.*, 2002, mencionando que en la estructura existen 2 sitios de unión de calcio en la NA: un sitio de alta afinidad cercano al sitio activo de cada monómero esencial para la estabilidad térmica de la NA, y otro de baja afinidad en el centro del tetrámero el cual posiblemente esté implicado en mantener la unión de las subunidades.





**Figura 22. Efecto de la adición de EDTA a la NAr y la neuraminidasa del vH1N1.** Se realizó la pre-incubación de la NAr o la neuraminidasa del virus con distintas concentraciones de EDTA durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se determinó la actividad enzimática.

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1 VIRUS PRODUCIDO EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

Para el montaje de los ensayos de inhibición de las proteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), y posiblemente en algún momento llegar a la cristalización con los inhibidores detectados, se requería contar con las 2 proteínas virales en suficiente cantidad. Una de las estrategias que se planteó fue la producción del vH1N1 en células de mamífero a mediana escala, con la posibilidad de obtener las proteínas con los residuos y glicosilaciones nativas, y llegar a obtenerlas purificadas. Se llegó a visualizar que la optimización de la producción de virus, podría servir también como piloto para la transferencia de esta tecnología a la industria para la producción del antígeno viral.

#### 9.1.1 El virus producido en células MDCK y uso de tripsina

La producción del virus en células Vero requiere la adición diaria de tripsina y se ha comentado que incluso adaptación del virus a esta línea celular (Govorkova *et al.*, 1996, Genzel *et al.*, 2010). En contraparte, las células MDCK fueron reportadas por Meguro *et al.* 1979 originalmente como un sustrato para aislar virus de la influenza, y el mismo autor evaluó que no existía diferencia en la cantidad de virus aislados al adicionar tripsina o no; también indicó que la diferencia en la adición de tripsina, radicaba en el tiempo que tardaba en evidenciarse el daño citopático en la infección. El corte de la HA del virus, que expone el péptido de fusión, puede ser incrementado en el cultivo por la adición de tripsina, lo que se denomina activación viral. Distintos autores han reportado un incremento del rendimiento viral al adicionar tripsina al inóculo viral

(células MDCK) o diariamente durante la infección (células Vero), aunque no reportan diferencias en la MOI que pudieran indicar la proporción de virus activado que realmente esta entrando a las células (ver sección 9.1.2).

Gekle *et al.* (1994) reportan que las células MDCK consisten de 2 subtipos celulares distintos: las células principales y las células intercaladas del ducto renal, de las cuales la proporción varía de una línea celular a otra y con los pases de cultivo. Noma *et al.* (1998) reporta que existen 2 tipos de células MDCK que denomina MDCK(-) y MDCK(+), indicando que la línea MDCK-CCL-34 (MDCK-) no secreta proteasas autógenas capaces de activar la HA, y la MDCK+ si las secreta. Lo anterior fue reforzado por Nishiyama *et al.* (2008), que indica que las células que estudió secretan un inhibidor de la tripsina (posiblemente las MDCK-). Sin embargo en los casos reportados por estos autores, el cultivo se realizó en presencia de suero fetal bovino en el medio de cultivo, lo que podría promover alguna diferencia en la activación viral; pues incluso, el suero se emplea en el sembrado de células, para detener la actividad de la tripsina residual (sirviendo de sustrato) en algunos cultivos .

En este trabajo, tanto el alto título de unidades hemaglutinantes (UHA's), como la detección por inmunofluorescencia del virus producido, indican que el virus se replicó sin necesidad de adición de tripsina a partir del séptimo pase (figuras 6, 7 y apéndice). Sin embargo, no se realizó una evaluación paralela del virus activado y sin inactivar respecto al título de producción de UHA's; tomando en cuenta los resultados abajo reportados para la MOI, sería interesante evaluar el efecto de la MOI en el rendimiento de producción de virus, con virus activado con tripsina y sin activar.

### **9.1.2 Efecto de la MOI**

Es posible que la optimización del cultivo además de la multiplicidad de infección (MOI), definida como la proporción de virus por célula, tendría que abarcar el tiempo de infección (TOI), que puede definirse como el tiempo posterior a la siembra al que las células son infectadas. Ya que todos los cultivos son sembrados a una densidad inicial, el TOI puede corresponder a una concentración celular en el cultivo, evaluando la infección cuando las células están en un estado fisiológico específico.

Recientemente fue publicado un artículo por Aggarwal *et al.* (2011) confirmando los resultados de nuestra curva de optimización, empleando los mismos materiales usados por nosotros al inicio del proyecto hace 2 años, como medio de cultivo libre de suero (SFM) y tripsina recombinante. Aggarwal *et al.* reporta el rendimiento viral obtenido con la infección a una MOI hasta de  $1 \times 10^{-6}$ , aunque el máximo rendimiento lo encuentra entre  $1 \times 10^{-4}$  y  $1 \times 10^{-5}$  uff\*/célula. En el trabajo mencionado reportan los resultados de optimización del TOI, indicando que cuando el cultivo se infecta 4 días posteriores a la siembra de las células, se obtiene el mayor título viral, por lo que parecen no existir efectos negativos por una alta concentración de células al momento

de la infección; lo que es consistente con lo reportado por Bock *et al.* (2010) para producción en cultivos a alta densidad celular.

\*unidades formadoras foco: por el método empleado para titular el virus, un foco es una célula o cúmulo de células infectadas aisladas, que son detectadas por tinción inmunofluorescente o inmunoenzimática.

Hu *et al.* (2008) trabajaron con el virus de influenza A (H5N1) empleando medio con suero y Aggarwal *et al.* (2011) usando medio SFM, presentan una optimización de la producción del virus de influenza, a una MOI en el rango en el que se empleó en el presente trabajo ( $1 \times 10^{-4}$  y menores), siendo nuestros resultados consistentes con los reportados, aunque para este escrito solo se evaluó el máximo título de producción de virus en función de la hemaglutinación (figura 5 y 6).

En el presente trabajo, los cultivos en suspensión se infectaron a una MOI de 0.002. En la optimización de la infección del cultivo adherente, se obtuvo el mismo título de UHA's de una infección con una MOI de 0.001 (en 3 días) que con MOI de  $1 \times 10^{-4}$  (en 4 días), siendo la diferencia el tiempo en el que se llega al máximo título (figura 6). Solo se probó esta condición de infección, tomando en cuenta que la optimización en cultivo adherente es aplicable. Sin embargo, a pesar de que el resultado de 2048 unidades de hemaglutinación/ 100uL (512 UHA's/25  $\mu$ L) en suspensión es superior al máximo en cultivo adherente de 1024 UHA's/100  $\mu$ L, quizás exista una optimización posible en nuestro cultivo en suspensión, que se obtendría realizando cinéticas de infección de células creciendo en microacarreadores (figura 7).

Una de las explicaciones al fenómeno de que una MOI mas alta no mejore el máximo título de producción de virus (en UHA's), es debido al incremento de las partículas defectivas interferentes (ID) a altas MOI's, que son viriones en los cuales el genoma viral se encuentra parcialmente deletado y actúan inhibiendo la infección productiva (De y Nayak, 1980). Además, los virus envueltos tienen muchos mecanismos para tratar de evitar la infección de una célula por mas de un virión, lo que se denomina exclusión de superinfección. La exclusión de superinfección, para el caso de la influenza, ocurre mediante la expresión de la neuraminidasa (NA) en la superficie de una célula infectada; la NA remueve los receptores del virus, con lo que se evita la entrada de mas viriones a la misma célula (Huang *et al.*, 2008).

### 9.1.3 Cultivo en suspensión

Se buscó una forma de producir el virus para obtener las proteínas nativas por un modo de producción homogéneo y escalable, con alto título de producción de virus (UHA's), y que eventualmente facilitara recuperar las proteínas de los viriones de la influenza. El sistema que ha sido reportado como el más adecuado para producir alto rendimiento del virus de la influenza es mediante el cultivo de células MDCK creciendo sobre microacarreadores sólidos en medio SFM (Tree *et al.*, 2001, Bock *et al.*, 2010), el cual permite un cultivo casi homogéneo con los beneficios de un cultivo en suspensión y brinda la posibilidad posterior de ser optimizado por el control automático en biorreactor.

## - Sembrado

En ocasiones los cultivos libres de suero requieren una densidad celular de sembrado mínima, aunque en el caso de los medios para MDCK al contener el factor de crecimiento epitelial o la insulina y transferrina recombinantes (Optipro y ultraMDCK respectivamente) parece sobrellevar el problema de la falta de señales de crecimiento endógenas durante bajas densidades en el sembrado.

En el sembrado en nuestro cultivo las células MDCK se adhirieron adecuadamente empleando un rango de 17 células por cada acarreador (75,000 células/4,300 acarreadores/mg)(figura 5). Se han usado hasta 10 y 2 células por acarreador (Chen *et al.*, 2011), aunque debido a que las células MDCK aparentemente no pueden migrar de un acarreador a otro, el problema se centra en que al menos una célula se adhiera a un acarreador, ya que los acarreadores en que no se adhiera ninguna célula será superficie de cultivo desperdiciada.

## - Optimización de la producción de virus (unidades hemaglutinantes).

El título viral puede ser expresado en cualquier unidad (dosis infecciosa de cultivo de tejidos al 50%/mL, unidades formadoras de placa/mL, unidades de hemaglutinación/100µL) según el método usado para cuantificar el virus. Lo importante en la validación de un método, es que el incremento de unidades virales cuantificadas sea proporcional a la concentración de partículas de virus en la preparación (Knipe y Howley *et al.*, 2001).

La cuantificación del título viral por el ensayo de hemaglutinación no es suficientemente sensible para detectar bajas concentraciones virales en los tiempos iniciales de la infección (como ejemplo 12 horas post-infección). Pero el seguimiento de la infección con el virus de la influenza puede ser evaluado en UHA's, considerando que se requieren de  $2 \times 10^7$  partículas virales físicas (detectadas por microscopía electrónica) para detectar una UHA (Tyrrel y Valentine, 1957). Aunque la proporción entre partículas infecciosas/unidades hemaglutinantes puede variar según las condiciones de cultivo, cosecha y almacenamiento del virus (Blumenthal *et al.*, 1949), es posible establecer una relación para determinar el avance de la replicación del virus en un cultivo (Rimmelzwaan *et al.*, 1998; Genzel *et al.*, 2010).

La producción máxima de unidades de hemaglutinación (UHA's) es específica para cada subtipo del virus de la influenza. En el caso de los reportes que indican las UHA's producidas, es difícil comparar realmente los títulos de hemaglutinación obtenidos y los reportados anteriormente, a menos que exista un estándar de hemaglutinación en común, o bien que uno de los autores repita ambos experimentos en paralelo. El máximo título de producción de virus (en UHA's) que obtuvimos en este trabajo de 2048 UHA's/100 µL (figura 7), está en el orden reportado en las publicaciones del grupo de Reichl y Genzel, como:

- Lohr *et al.* (2010) con influenza A/PR/8/34(H1N1) obtiene 800 UHA's/100uL,

- Bock *et al.* (2010) obtiene 759 y 1778 UHA's/100  $\mu$ L con el mismo virus, y de otros grupos:

-Hu *et al.* (2011) reportan también 2048 UHA's/100 $\mu$ L para el virus A/Vietnam/1194/2004(H5N1).

Aggarwal *et al.* (2011) realizan la optimización de la MOI y TOI con distintas cepas virales, entre ellas el virus de influenza A/South Dakota/6/07(H1N1) con el que obtiene un rendimiento viral de  $10^{8.9}$  ffu/ml, infectando 4 días post-siembra las células con una MOI de  $1 \times 10^{-5}$ . Chen *et al.* (2011), quienes realizan la producción de virus en células Vero, reportan rendimientos virales arriba de  $10^{10}$  TCID<sub>50%</sub>/mL para un virus vacunal careciendo de la proteína NS1. Ninguno de los dos trabajos mencionados reporta las UHA's obtenidas.

- Potencial escalamiento

Las condiciones reportadas para ser usadas para la producción industrial que se emplean en biorreactor son una densidad de acarreadores de 2mg/mL como usamos en este trabajo. Control de pH en 7.4 por aspersión de CO<sub>2</sub> y adición de NaOH. El oxígeno disuelto alrededor del 40% de saturación. Dentro de los medios SFM usados se encuentran EpiSerf (Gibco), EX-CELL MDCK (Sigma) y OptiPro (Invitrogen) (Aggarwal *et al.*, 2011, Chen *et al.*, 2011, Hu *et al.*, 2011). En este trabajo probamos el medio EX-CELL MDCK encontrando un crecimiento adecuado, pero se contaba con material limitado. Los medios que usamos ultraMDCK y Optipro son medios completamente definidos y realizamos la adaptación de las células y la producción del virus en estos medios de cultivo (figura 5 y 7), lo cual no había sido reportado antes del año 2010.

Para obtener la cantidad de células para sembrar un reactor de mayor tamaño se ha reportado el uso de botellas de cultivo giratorio "Roller" (Tree *et al.*, 2001). Con el crecimiento celular reportado en este trabajo, para un reactor con 100L de medio, se necesitarían 200 g de acarreadores sembrados con al menos  $1.5 \times 10^{10}$  células totales. Para sembrar dicha cantidad de células a partir del cultivo giratorio en botellas ("Roller") se requerirían alrededor de 187 botellas confluentes para sembrar el reactor. Aún en el caso de emplear 2 células/acarreador se necesitarían 22 botellas "Roller" que sigue siendo una operación multi-recipiente.

Una opción para sembrar el cultivo a gran escala, actualmente en evaluación, sería realizar el cultivo en microacarreadores con tres reactores semilla (secuenciales), tripsinizar las células de cada reactor una vez llegadas a la confluencia, y separar la tripsina de las células-acarreadores por microfiltración o bien agregando el inhibidor de tripsina de frijol de soya, y entonces sembrar los nuevos acarreadores agregando la mezcla células-acarreadores "viejos", dejando para la adherencia en suspensión. De esta forma, considerando 10 células/ acarreador, para sembrar un reactor de 100 L y eliminar la operación multi-recipiente, se podrían utilizar los tres siguientes pasos secuenciales:

- un cultivo de primera semilla de 300 mL
- un cultivo de segunda semilla de 2 L
- y un cultivo de tercera semilla de 11 L.

Al llegar a confluencia las células de cada cultivo semilla se emplearían para sembrar el siguiente, hasta llegar al reactor de 100L. El volumen de los cultivos mencionados podría reducirse a 60 mL, 400 mL y 2.2L respectivamente, si se emplea la relación de 2 células/acarreador. En la mayoría de los trabajos citados el cultivo se ha realizado en una escala de 1.5 L, existiendo solo un reporte en 7.5 L para el trabajo con el virus de influenza A (H5N1).

En cuanto a la agitación, en nuestro trabajo, utilizando matraces con agitación orbital, la adhesión de células se realizó toda la noche a 30 rpm, y a continuación se elevó a 90 rpm. También, fue suficiente la aireación superficial para suministrar el oxígeno disuelto a las células y la incubación con tapón de esponja en una incubadora con CO<sub>2</sub> para mantener el pH del medio. Para el escalamiento de la producción del virus los trabajos antes mencionados reportan el empleo de reactores de tanque agitado de dimensiones estándar con un impulsor axial, empleando una velocidad de punta de un impulsor inicial de entre 0.15 y 0.17 m/s (metros/segundo), dejan adherir las células a los acarreadores por aproximadamente 6 hrs, y entonces elevan la velocidad a 0.28 m/s y comienza el ajuste de pH (Aggarwal *et al.*, 2011, Chen *et al.*, 2011, Hu *et al.*, 2011). Los flujos de aire reportados son de 0.007vvm's (flujo de aire dado en volúmenes de aire por volumen de medio, ejemplo 7 mL por minuto de aire en 1L de medio)(Chen *et al.*, 2011).

## 9.2 EFECTO DEL DMSO SOBRE LA HEMAGLUTINACIÓN

Se ha reportado un incremento en el rendimiento viral obtenido (eficiencia de infección) del virus de la polio al adicionar 40% de DMSO en el periodo de la adsorción (Amstey *et al.*, 1966), así como un incremento en el rendimiento del virus del Bosque de Semliki, Newcastle e influenza (virus de la plaga de las aves) (Scholtissek *et al.*, 1988, Pleschka *et al.*, 2001). En este trabajo encontramos un efecto de incremento sobre la actividad hemaglutinante del *vH1N1* con DMSO al 20%, lo que indica que posiblemente el DMSO tenga algún efecto sobre la unión de la HA al ácido siálico de las proteínas o lípidos sobre la superficie de los eritrocitos (figura 8).

## 9.3 APLICACIÓN DE LA REACCIÓN DE LA NEURAMINIDASA

Compañías productoras de vacunas actualmente siguen empleando el ensayo de la hemaglutinación para cuantificar las cosechas y formular las vacunas de la influenza, ya que llega a ser un ensayo poderoso por su economía, los pocos reactivos y poca tecnología usada (eritrocitos, PBS, placas con fondo en V y estándar), y a pesar de su sencillez brinda una cuantificación aproximada de la proteína funcional. La WHO (2002) incluye en la técnica el empleo de un estándar de hemaglutinación específico y la calibración de los eritrocitos que además no pueden ser almacenados por más de un par de días sin sufrir hemólisis. Nosotros también usamos un estándar de virus para

tratar de obtener un resultado confiable (sección 8.3.1). Sin embargo, para un resultado exacto de cuantificación de la HA se requiere mucha labor y eritrocitos frescos y calibrados cada corrida.

La reacción de la neuraminidasa del virus de la influenza fue recomendada por Eichelberger *et al.* (2008) para ser empleada en escrutinios de fármacos inhibidores por HTS. La metodología propuesta por estos autores consta de dos pasos: en el primero, varios pozos sembrados con células son infectados en presencia de los inhibidores; en el segundo, emplea la detección de la actividad de neuraminidasa para evaluar en que pozos se inhibió la replicación del virus (llamado ensayo de AVINA). Para validar el método, los autores determinan la variación del título viral con respecto a la actividad de neuraminidasa detectada, indicando que la actividad de la neuraminidasa es una medida de la concentración de virus, y constituye un método para medir de la replicación del virus a baja MOI.

En el presente trabajo, aún no ha sido determinado el efecto de los compuestos inhibidores de la NA sobre la replicación del virus en cultivo, por lo que es una de las perspectivas. La prueba de replicación en cultivo es el ensayo *in vitro* que mas se asemeja a las condiciones reales de proliferación del virus, y representa un fuerte indicador de que un fármaco tendrá efecto sobre la replicación de la influenza en un modelo animal.

El ensayo de la neuraminidasa con el sustrato fluorogénico MUNANA puede ser empleado como una poderosa herramienta, que no solo es capaz de cuantificar por ensayo enzimático la cantidad de moléculas activas de neuraminidasa e indirectamente la cantidad de virus presente (figura 13 y 14), sino además es capaz de detectar las variedades del virus resistentes (Gubareva *et al.*, 2002) (figura 16) y con la inclusión de un anticuerpo neutralizante contra cada NA específica poder determinar el título de anticuerpos o tipificar el virus. Es ampliamente recomendable extender el uso de este ensayo a las compañías productoras de vacunas, para la cuantificación exacta del título la producción viral y para la toma de decisiones en la formulación. Los reactivos del ensayo de la neuraminidasa podrían ser producidos y comercializados como un estuche (kit) con la correspondiente capacitación a las compañías conteniendo los controles adecuados.

#### **9.4 DETECCIÓN DE FRAGMENTOS CON ACTIVIDAD SOBRE LA HA Y LA NA**

En este trabajo se detectaron 13 compuestos con alguna actividad sobre la neuraminidasa (tabla 2) y 5 compuestos con clara actividad sobre la HA (tabla 3).

Se eligió la opción del escrutinio bioquímico por la problemática inicial de producir la proteína recombinante, que limitó la aplicación de la metodología para detección de los fármacos en el cristal de la proteína. Barker *et al* (2006) menciona que el combinar una biblioteca de fragmentos de alta calidad con un escrutinio bioquímico muy sensible es una alternativa viable a los métodos comunes de RMN y cristalografía

de rayos X para realizar los escrutinios por fragmentos. Sin embargo para la etapa de la decisión de fusionar fragmentos, de la optimización y el diseño del fármaco, la estructura por rayos X sigue siendo la herramienta mas poderosa para visualizar las relaciones estructura-actividad (SAR).

Las aproximaciones de escrutinio de fragmentos por RMN y cristalografía de rayos X, se basan en la detección de fragmentos con muy pocos grupos funcionales, que se unen de una forma no muy específica a una proteína, y con una afinidad tan baja como 10 o 17 mM como se ha reportado para los fragmentos iniciales de fármacos exitosos (figura 23)(Hajduk *et al*, 2002/Abbot, Congreve *et al*, 2007 /AstraZeneca, Barker *et al*, 2010 /Evotec). Los fragmentos reportados en nuestro trabajo tienen afinidades en el orden reportado para los fragmentos iniciales mencionados para los detectados por cristalografía de rayos X y RMN y se detectaron por actividad inhibitoria sobre las proteínas HA y NA, por lo que los resultados podrían ser prometedores (figura 23).

Barker *et al* 2006 (Evotec) y Boettcher *et al*. 2010 (Novartis) mencionan que al detectar un fragmento por inhibición enzimática nos estaremos asegurando que no solo se detecta una unión a la proteína, la cual podría no ser relevante para su actividad, sino que además el compuesto detectado por escrutinio bioquímico posiblemente está unido a un sitio de relevancia en la actividad de la proteína. En los trabajos mencionados, se concluye que cuando se realiza un escrutinio por inhibición enzimática, es baja la frecuencia con que los compuestos detectados son falsos positivos, al comparar con la frecuencia de falsos positivos detectados en un escrutinio por RMN o cristalografía; también ponderan la menor cantidad de proteína necesaria para realizar un ensayo enzimático, comparada con la empleada en un ensayo por RMN o cristalografía.

El escrutinio inicial llevado a cabo de forma individual para cada compuesto tenía en la pre-incubación una concentración de los compuestos de 600  $\mu$ M, 5% de DMSO,  $\text{CaCl}_2$  4 mM y un tiempo de pre-incubación de la NAr con los compuestos de 30 min. Al no tener ningún compuesto activo detectado y con el propósito de mejorar la detección, las condiciones fueron cambiadas montando el ensayo estilo HTS en placas de 96 pozos, incrementando en la pre-incubación la concentración de los compuestos a 2mM, 10% de DMSO, sin  $\text{CaCl}_2$  y un tiempo de pre-incubación de la NAr con los compuestos de 4 hrs (figura 17). Posiblemente fué el mejor control de la variabilidad del ensayo y la elevación de las concentraciones lo que permitió la detección de los 13 compuestos con actividad sobre la NAr.

Uno de los propósitos de incrementar el tiempo de pre-incubación de los compuestos con la NAr fue tratar de abarcar la detección de posibles compuestos en los que la proporción de inhibición fuese dependiente del tiempo de pre-incubación. Inhibidores con una dependencia de un equilibrio en la unión del compuesto a la proteína previa a una inactivación se han reportado para la glicerol cinasa de *Escherichia coli* (Pettigrew 1987) y la triosafosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*



(Téllez-Valencia *et al.*, 2002), y fue demostrada por los autores mediante cinéticas de inactivación de las respectivas enzimas.

En ninguno de los compuestos detectados para la NA fue evidente una diferencia entre la inhibición sin pre-incubación o con pre-incubación por 4 hrs. En el caso de la HA, al parecer 3 compuestos son dependientes del tiempo de pre-incubación (figura 12, tabla 2), sin embargo aún faltan experimentos para demostrar dicha dependencia y para indicar que estos compuestos pertenecen a la clase de compuestos mencionados, entre los que se halla demostrar la identidad de los fragmentos con actividad sobre la HA.

Los compuestos de la biblioteca usados en este trabajo no fueron sometidos al control de calidad inicial recomendado (ver sección 9.7), primero por desconocimiento y segundo por costos y gestión del proyecto. Por ello se realizó el control de calidad solo para algunos fragmentos positivos, lo cual se realizó adquiriendo los fragmentos de Sigma-Aldrich o bien con el análisis por RMN, que dada una visión estilo HTS podría solo descartar los compuestos sin identidad definida con facilidad y profundizar en aquellos en que la identidad y pureza son adecuados.

## **9.5 FRAGMENTOS INHIBIDORES DE LA HA**

La identidad de un inhibidor se podría definir como la identificación del compuesto inhibidor para demostrar que su estructura química corresponde exactamente a la estructura que el proveedor indica. De los 5 fragmentos detectados con actividad inhibitoria de la hemaglutinación, para ninguno se ha demostrado la identidad ni pureza del compuesto (ver sección 9.7). Sin embargo se hizo evidente que es posible detectar compuestos tan pequeños como fragmentos que sean capaces de impedir la unión de la HA al ácido siálico en los eritrocitos (tabla 2, figura 10). Lo que procedería sería demostrar su identidad. Una vez demostrada la identidad del compuesto se determinaría si actúa sobre la estructura de la HA o bien solo sobre su unión al ácido siálico. Si su identidad es demostrada, la estructura cristalográfica con el inhibidor en complejo sería una necesidad para proceder en el proceso del diseño de fármacos.

## **9.6 FRAGMENTOS INHIBIDORES DE LA NA**

Cabe resaltar que el escrutinio de compuestos con actividad sobre la NA se llevo a cabo con una proteína no purificada, lo cual puede ser evaluado desde la perspectiva de que no se tuvo una actividad aislada. Fueron dos las problemáticas que resolver, por un lado, la necesidad de un sistema seguro para trabajar con la enzima y por el otro nuestra incapacidad para expresar una proteína recombinante activa con las construcciones proporcionadas por los colaboradores (apéndice). Sin embargo, el método de detección del producto fluorescente brindó la posibilidad de detectar específicamente la actividad de la enzima. Por otra parte, al detectar los compuestos en un entorno de proteínas celulares posiblemente podría servir como un primer filtro de especificidad de los inhibidores.

### 9.6.1 El fragmento 1-azepanil(3-piperidinil)metanona (AzPM).

Se demostró la identidad del compuesto 1-azepanil(3-piperidinil)metanona (AzPM, 9H02, tabla 4) por RMN de  $^{13}\text{C}$  y DEPT (figura 19 y 20). Se encontró que el AzPM es capaz de inhibir la actividad de la NAr. Se determinó que la inhibición del 50% de la actividad de la NAr ocurre a una concentración de 390  $\mu\text{M}$  de AzPM (figura 18a).

La inhibición del AzPM sobre la neuraminidasa del *vH1N1* fue limitada, comparada con la inhibición sobre la neuraminidasa recombinante (NAr) (tabla 4). Agregando a la reacción de la NAr medio de cultivo, o una solución de  $\text{CaCl}_2$  10 mM, se encontró que la inhibición de la enzima por el AzPM disminuye de forma proporcional a la concentración de calcio (figura 21). Por lo anterior, se concluyó que la limitada inhibición del AzPM sobre la neuraminidasa del *vH1N1*, se debió al calcio presente en el medio de cultivo (que introduce 500  $\mu\text{M}$  de calcio a la reacción) (figura 21). Para verificar el efecto del calcio sobre la NA se realizaron experimentos agregando distintas concentraciones de EDTA. La adición de cualquiera de las concentraciones ensayadas de EDTA a la NAr inhibió su actividad un 70%, incluso a una concentración de EDTA tan pequeña como 0.1 mM. El mismo porcentaje de inhibición, se alcanzó sobre la neuraminidasa del *vH1N1* con una concentración de EDTA de 4mM (figura 22).

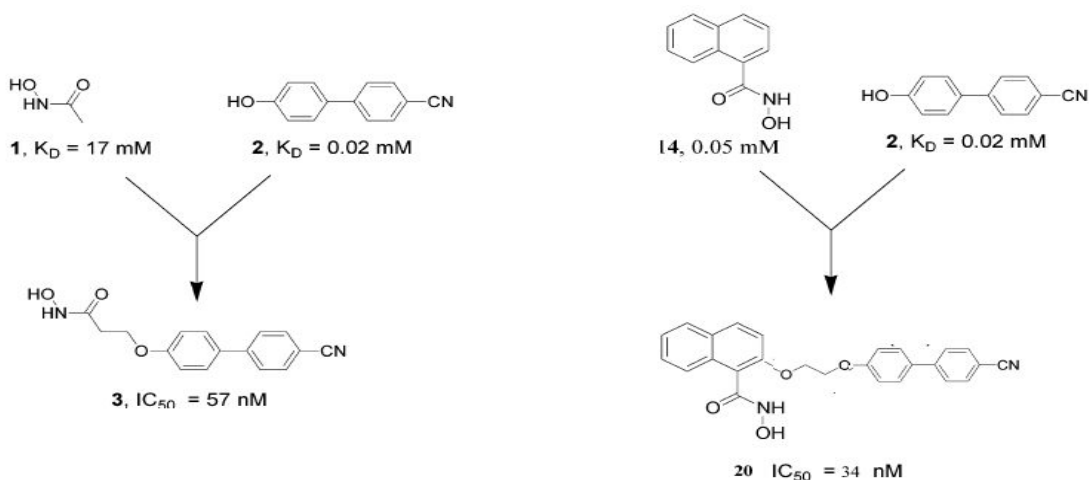
El efecto del EDTA relacionado con el papel del calcio en la neuraminidasa (NA) del *vH1N1* ha sido indicado por Burmeister *et al.* (1992) y Gubareva *et al.* (2002) mencionando que en la estructura de la NA existen 2 sitios de unión de calcio, uno de alta afinidad cercano al sitio activo de cada monómero y uno de baja afinidad en el centro del tetrámero y posiblemente implicado en mantener unidas las subunidades (figura 1a y 1b).

El calcio en el centro del tetrámero de la NA solo puede ser evidenciado en la estructura cuando los cristales de la enzima son remojados con calcio 5 mM (Burmeister *et al.* 1992), y la unión del calcio en esta región provoca un cambio conformacional en el sitio activo que optimiza la orientación para la unión del sustrato (Chong *et al.*, 1991). La presencia de las moléculas de calcio de alta afinidad es esencial para la estabilidad térmica de la NA, pues al ser retiradas ocurre la inactivación (inhibición irreversible) de forma cooperativa a temperaturas fisiológicas. La concentración de calcio mínima para la estabilidad térmica es de aproximadamente 20  $\mu\text{M}$  (Burmeister *et al.*, 1994).

Se ha encontrado que cepas de influenza resistentes al Zanamivir generadas *in vitro* alteran la dependencia de la NA a la unión del calcio. Cuando la resistencia al Zanamivir es debida a una mutación cercana al sitio de unión de calcio de alta afinidad, la NA es independiente a la adición de EDTA. Cuando la resistencia al Zanamivir se debe a una mutación en la región que orienta el calcio central del tetrámero, la NA es en extremo sensible a la adición de EDTA (Gubareva *et al.*, 2002).

La oligomerización de la neuraminidasa ocurre en el retículo endoplásmico RE (Saito *et al.*, 1995) donde la concentración de calcio libre va de 12  $\mu\text{M}$  a 1.8 mM (Montero *et al.*, 1995), pero en el citoplasma el calcio libre es de 100 nM (Meldolesi *et al.*, 1990). También ha sido reportado que únicamente la proteína tetramérica presenta actividad, y no lo hacen el monómero ni el dímero (Bucher *et al.*, 1972, Wu *et al.*, 2009). Resultaría interesante si el calcio en el centro del tetrámero estabilizara a la NA volviéndola insensible a la actividad del AzPM. Estas evidencias nos llevan a pensar en la posibilidad de que la actividad inhibitoria del AzPM sobre la NA sea a través de la separación del tetrámero.

Por otra parte, aunque el AzPM fue detectado en este trabajo como un fragmento con actividad sobre la NA (tabla 4), aún falta el proceso de optimización para llevarlo al desarrollo de un fármaco con alta afinidad, proceso en el que podría llegar a eliminarse la oposición del calcio (figura 23).



**Figura 23. Ejemplo del proceso de diseño de un fármaco mediante fusión de fragmentos.** Los fragmentos **(1)** N-hidroxiacetamida y **(3)** N-hidroxi-naftalen-1-carboxamida se detectaron para unirse a la estromelisina. La estromelisina es una endoproteinasa dependiente de zinc, y los fragmentos posiblemente interactúan con el metal dentro de la proteína. Mediante la fusión con un fragmento de estructura privilegiada **(2)** 4-(4-hidroxifenil)benzonitrilo, se obtuvieron fármacos **(3)** y **(20)**, que presentaron una afinidad incrementada por la estromelisina (tomado de Hajduck *et al.*, 2002).

En el peor de los casos el compuesto podría ser usado para estudiar la dinámica del plegamiento del tetrámero de la NA, estudio que fue comenzado por Bucher *et al.*, 1972 y Saito *et al.* 1995. Y en el mejor de los casos podría servir como base para diseñar un nuevo fármaco capaz de inhibir la actividad de la NA mediante la separación del tetrámero a partir de este fragmento y su optimización por la relación estructura-actividad.

Para la demostrar que el mecanismo de acción del inhibidor AzPM sobre la NA, tiene relación con la separación del tetrámero, se propone un experimento con la

neuraminidasa purificada en un gel nativo (como lo reporta Bucher *et al.* 1972), cargando en un carril la enzima sola, y en otro carril la enzima incubada con el AzPM; la actividad del AzPM será evidenciada por la separación de la neuraminidasa en dímeros o monómeros.

¿Es significativa entonces la actividad del inhibidor AzPM al compararla con el EDTA? **1.** El compuesto AzPM no es un fármaco aún, es un fragmento. El fragmento detectado sobre la estromelina (figura 23), partió de una problemática con zinc similar a la que presenta el AzPM con el calcio. **2.** Es importante la especificidad que puede presentar el AzPM (que además tendrá características adecuadas de absorción y permeabilidad al cumplir con la regla de los 5); ya que el EDTA no es específico y es un compuesto polar. Es significativo porque gracias a la especificidad se tienen menos efectos secundarios, además de sus propiedades de permeabilidad. **3.** El AzPM puede usarse como un sustituyente de otro inhibidor ya existente de la NA. **4.** De demostrarse la actividad de separación del oligómero por el AzPM sería significativo, pues no se ha descrito un compuesto con dicha actividad.

Para el proceso de optimización, lo primero sería obtener la estructura en complejo con la NA del *vH1N1*, o incluso con alguna neuraminidasa bacteriana como en el caso del complejo de la NA de *Streptococcus pneumoniae* con Zanamivir y Oseltamivir (Gut *et al.*, 2011). Una vez detectado el compuesto en su sitio de unión se podría emplear la fusión con otros compuestos en la misma cavidad, o bien la fusión con uno de los fragmentos privilegiados reportados como promiscuos para unirse a proteínas (figura 23)(Hajduk *et al.* 2000, Hajduk *et al.* 2002).

Una posibilidad que es importante no descartar, es que la NAr podría carecer de la porción transmembranal y citoplásmica de la neuraminidasa, por lo que sería necesario realizar los experimentos de inhibición de la NA con el AzPM con el virus completo con EDTA, lo cual también sería una posible diferencia en el comportamiento observado del AzPM entre la NAr y la NA del *vH1N1* (figura 22), ya que cerca de esta región del tallo es donde se encuentra el puente disulfuro que estabiliza los dímeros de la NA (Saito *et al.*, 1995).

Es de importancia señalar que podría existir algún compuesto quelante ya conocido en la muestra del compuesto 9H02, el cual por la sensibilidad de la RMN de  $^{13}\text{C}$  podría llegar ser cerca del 3% (figura 19 y 20). Si el contaminante fuese todo EDTA sería el equivalente de tener una concentración en el ensayo de la NA de 40  $\mu\text{M}$  de EDTA. Para demostrar la ausencia de EDTA en el compuesto 9H02 sería necesario realizar el análisis del AzPM por RMN de  $^1\text{H}$  que es más sensible. Aunque resulta poco probable que el EDTA sea empleado en la síntesis de este compuesto. También quedaría pendiente establecer si el AzPM es el isómero L o R, y si tendría alguna implicación en la actividad del compuesto como se ha observado históricamente en algunos fármacos.

### 9.6.2 El fragmento 6-aminoquinoxianilina (AQA).

Se demostró la inhibición de la NAr por el compuesto 6-aminoquinoxianilina (AQA, 3H02) adquirido a granel de Sigma-Aldrich con pureza demostrada por cromatografía de gases. El compuesto conservó su actividad de inhibición del 30% sobre la NA del *vH1N1* a 600  $\mu\text{M}$  (tabla 4). Se determinó que la concentración del compuesto AQA a la que se inhibe 50% la actividad de la NAr es de 1,260  $\mu\text{M}$  (figura 18b), este valor aún está en el rango de los fragmentos con que se ha comenzado el diseño de fármacos exitosos de 17mM (figura 23)(Hajduk *et al.* 2002) a 2mM (Congreve *et al.*, 2007 y Barker *et al.* 2010). Esta posibilidad parece indicar la necesidad imperativa de resolver la estructura 3D del complejo del compuesto con la NA para comenzar el diseño de un nuevo fármaco.

### 9.6.3 Los fragmentos de la familia de los n-fenil pirrólicos.

Dentro de los compuestos indicados en la tabla 3, se encuentran tres compuestos que pertenecen al quimiotipo de los compuestos pirrólicos. El compuesto 4G07 fue analizado por RMN y se encontraron múltiples impurezas (apéndice figura 34 y 35), a la vez que el compuesto puro y recién resuspendido de Sigma no mostró actividad a la concentración ensayada para el 4G07 (apéndice). Sin embargo, son 3 los compuestos de la biblioteca detectados con actividad que tienen el mismo quimiotipo (tabla 4), el ácido 4-(1H-pirrol-1-il)benzoico (4G07), ácido 2-(1H-pirrol-1-il)benzoico (5C03), y su correspondiente compuesto metilado el ácido 2-(2,5-dimetil-1H-pirrol-1-il)benzoico (5E06) cuyos metilos aparentemente incrementaron la actividad inhibitoria (tabla 5).

Los compuestos n-fenil pirrólicos han sido detectados en 3 trabajos en los cuales se muestra su reactividad, pues el compuesto ácido 4-(2,5-dimetil-pirrol-1-il)-2-hidroxibenzóico (denominado NB-2) y 3 derivados inhiben la fusión del VIH-1 a la membrana celular por unión a la gp41 (Jing *et al.*, 2004); el mismo compuesto (denominado 10) inhibe al factor letal del antrax (Schepetkin *et al.*, 2006) y la DNA helicasa de *Bacillus anthracis*, y el compuesto 2-ácido [4-(2,5-dimetilpirrol-1-il)fenil] sulfanilacético inhibe a la DNA helicasa de *Staphylococcus aureus* (Aiello *et al.*, 2009). Coincidiendo con nuestros resultados, Aiello *et al.*, 2009 indican que los compuestos nuevos recién disueltos en DMSO no presentaron actividad y si lo hicieron los compuestos almacenados por mucho tiempo, y aunque ninguno de los 3 trabajos arriba mencionados resuelve la problemática de estabilidad de los compuestos, Aiello *et al.* (2009) comentan que resolverla podría abrir la puerta a una nueva serie de fármacos.

La mas optimista de las explicaciones indica que los compuestos n-fenil pirrolicos pueden ser otro de los grupos de compuestos privilegiados indicados por Hajduk *et al.* (2000) para unirse de forma versátil capaces de detectar los puntos calientes de unión y que pueden ser usados para mapear los bolsillos hidrofóbicos (sitios o cavidades hidrofóbicas) en las proteínas o ser fusionados con otro fragmento específico para comenzar el desarrollo de un fármaco potente (figura 23, ver sección 1.3.6).

Del análisis por gases-masas de las impurezas del compuesto 4G07 (apéndice figura 30) se identificó a la hidrazida del ácido 4-bromo benzóico. Este compuesto es posiblemente un precursor de la síntesis del compuesto 4G07, pero además la hidrazida del ácido 4-bromo benzóico está reportada en las bases de datos de compuestos de Pubchem del NCBI y de Protein-Ligand Binding and Molecular Recognition de la School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences de la Universidad de California para ser un fragmento empleado en bibliotecas, del cual hasta la fecha no se había detectado ninguna actividad inhibitoria en los blancos probados. Así, existe la posibilidad de que la hidrazida del ácido 4-bromo benzóico sea el responsable de la inhibición de la NA del *vH1N1*, lo cual deberá ser validado experimentalmente.

## 9.7 LOS OTROS COMPUESTOS

Al realizar el escrutinio de los 1000 fragmentos de la biblioteca Maybridge Ro3 para tener actividad de inhibición de HA o la NA, no se comenzó con un control de calidad de los compuestos, por lo que posteriormente se realizaron los análisis de identidad (identificación) y pureza posibles correspondientes.

Para realizar el control de calidad mencionado, se han usado distintas metodologías para escrutinios de fragmentos por FRET (transferencia de energía de fluorescencia resonante) o por RMN de 2D. En dichos trabajos, previo al escrutinio, se realizó el análisis de pureza e identidad de los compuestos por cromatografía líquida acoplada a masas (la determinación debe corresponder al PM del compuesto) (Congreve *et al*, 2007, Aiello *et al.*, 2009); o bien se identificaron los compuestos por RMN <sup>1</sup>H y se almacenaron por 3 meses, tras lo cual se repitió el análisis para verificar la estabilidad (Barelier *et al.* 2010).

La necesidad de realizar el control de calidad (identidad) se debe a que los fabricantes de compuestos en grandes cantidades venden a los proveedores de las bibliotecas los compuestos, y en este proceso parece no haber una regulación muy estricta. En nuestro caso llega a ser difícil disponer de la infraestructura necesaria para realizar tales controles de calidad, que podría ahorrar el riesgo de falsos positivos por detección de inhibidores no intencionales, como contaminantes o subproductos de la síntesis del compuesto, sin valor para el desarrollo del proyecto.

No se ha demostrado la identidad de los otros compuestos descritos en la tabla 5 (ver apéndice). Se decidió enfocarse en los compuestos AQA y AzPM por parecer prometedoros o estar en existencia del proveedor Sigma con pureza comprobada. Con algunos de los otros compuestos se está realizando una prueba preliminar de identidad, o bien no fue posible conseguirlos de otro proveedor confiable en el desarrollo del proyecto.

Para retomar los otros compuestos con una afinidad aparentemente baja, primero habría que demostrar su identidad, aunque tal vez sea importante primero

demostrar la interacción en la estructura de la proteína con el AQA y el AzPM para verificar que se está avanzando en la dirección de desarrollo del fármaco. De validarse como positivos, la baja afinidad de los fragmentos podría no ser la razón para descartarlos, como se ha mencionado antes que refieren los principios del diseño de fármacos por búsqueda de fragmentos (FBDD) (figura 23, ver sección 1.3.4) (Hajduk *et al.* 2002, Congreve *et al.* 2007 y Barker *et al.* 2010).

### 9.7.1 Posibilidad de ensayos bioquímicos con los inhibidores

Además de la resolución de la estructura del complejo proteínas-inhibidor por cristalografía con rayos X, existen distintos análisis que pudieran dar la misma información, de los cuales el ensayo de actividad enzimática para evaluar los parámetros cinéticos de los inhibidores brindarían datos importantes, como la naturaleza de competencia o no con el sustrato, el valor de la  $K_i$ , etc. Para este tipo de ensayos se realizarían curvas manteniendo constante una concentración de inhibidor y variando las concentraciones del sustrato, y luego repitiendo las curvas para otra concentración de inhibidor etc. De una forma más compleja, se podrían construir y expresar mutantes puntuales de la enzima neuraminidasa en regiones donde se sospecha podría interactuar con los inhibidores, revisando si al mutar un residuo con que interactúe el inhibidor se pierde su efecto, o la mutación reemplaza el efecto del inhibidor.

La serie de experimentos que arrojarían datos sobre la naturaleza de la inhibición sería el escaneo de calorimetría, con el que se podía identificar el mecanismo de actividad del fármaco sobre el oligómero y determinar con más exactitud las afinidades de unión. En el caso de el AzPM sería de mucha utilidad, si previamente se demuestra que tiene actividad en la separación de las subunidades de la NA.

## 9.8 DISEÑO DE FÁRMACOS COMO OBJETIVO FINAL

El avance del proyecto permitió la detección de fragmentos con actividad inhibitoria sobre las proteínas NA y HA del *vH1N1*. En un comienzo se tenía el objetivo ambicioso de llegar al diseño del fármaco basado en la resolución de la estructura del complejo cristalográfico de las proteínas con los fragmentos detectados. Sin embargo, los resultados obtenidos son prometedores y llaman a la pronta resolución de la estructura del complejo para poder comenzar con las etapas de desarrollo de un posible fármaco novedoso. Aunque quizá la infraestructura necesaria para llevar a cabo la etapa de diseño del fármaco escape a nuestras posibilidades, la estructura del complejo es una posibilidad con la experiencia de varios grupos en colaboración.

Una recomendación para trabajos posteriores puede ser el armado de una biblioteca adquiriendo los compuesto directamente de Sigma-Aldrich con alta pureza demostrada, ya que según Barelier *et al.* 2010 con una biblioteca tan pequeña como con 100 fragmentos con las características adecuadas puede cubrirse una proporción adecuada del espacio químico.

## 10. CONCLUSIONES

1. Se implementó a nivel laboratorio la producción del virus de la influenza A (H1N1) en células MDCK creciendo en suspensión sobre microacarreadores en medio libre de suero (SFM).
2. Se implementó el ensayo de cuantificación de actividad enzimática de la neuraminidasa (NA).
3. Mediante el escrutinio de la biblioteca Maybridge Ro3 de 1000 fragmentos químicos, se detectaron 5 compuestos con actividad inhibitoria de la hemaglutinación y 13 compuestos con inhibición de la actividad enzimática de la NA.
4. La concentración mínima inhibitoria de los compuestos con actividad sobre la hemaglutinina (hemaglutinación) fue de 500  $\mu\text{M}$ . Se hizo evidente que es posible encontrar fragmentos químicos que sean capaces de impedir la unión de la hemaglutinina (HA) a los receptores en los eritrocitos.
5. De los compuestos detectados con inhibición de la NA, se estudiaron mas a detalle la 1-azepanil (3-piperidinil) metanona (AzPM) y 6-aminoquinoxalina (AQA):
  - La concentración del compuesto AQA a la que se inhibió al 50% la actividad de la neuraminidasa recombinante (NAr) o la neuraminidasa del virus de influenza A(H1N1) fue de 1,260  $\mu\text{M}$ .
  - La concentración del compuesto AzPM a la que se inhibió al 50% la actividad de la NAr fue de 390  $\mu\text{M}$ .
6. Se encontró que la inhibición de la NA por la 1-azepanil (3-piperidinil) metanona (AzPM) es dependiente de calcio. Por lo que la inhibición del AzPM sobre la neuraminidasa del virus de la influenza producido en cultivo, fue limitada comparada con la inhibición de la NAr, debido a la presencia de calcio en el medio de producción del virus.
7. Ya que el calcio está involucrado en mantener la estabilidad térmica y la estructura cuaternaria de la NA, sugerimos que la AzPM tiene actividad sobre la estabilidad del oligómero de la NA.



## 11. PERSPECTIVAS

1. Determinar el mecanismo de inhibición de la neuraminidasa (NA) por el compuesto 1-azepanil (3-piperidinil) metanona (AzPM) y 6-aminoquinoxalina (AQA).
2. Determinar la estructura tridimensional de los complejos NA-AzPM y NA-AQA.
3. Emplear los datos obtenidos para el diseño de nuevos fármacos inhibidores de la actividad de la NA.
4. Buscar la transferencia y escalamiento del cultivo celular, así como de producción viral con la metodología empleada, a la industria de producción de vacunas. Explotación de la reacción de la NA para cuantificación del título de producción del virus (antígeno viral), para la industria de producción de vacunas.
5. Evaluar la identidad de los otros compuestos detectados con actividad inhibitoria sobre la hemaglutinina (HA) y NA. En caso de demostrarse la identidad de los compuestos, determinar el mecanismo de inhibición.

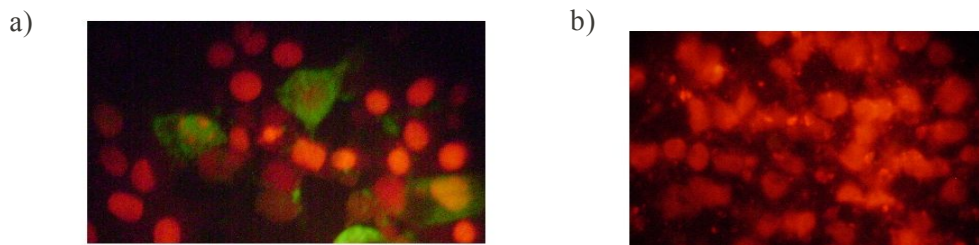
## APÉNDICE

### Inactivación del virus y titulación por tinción inmunofluorescente.

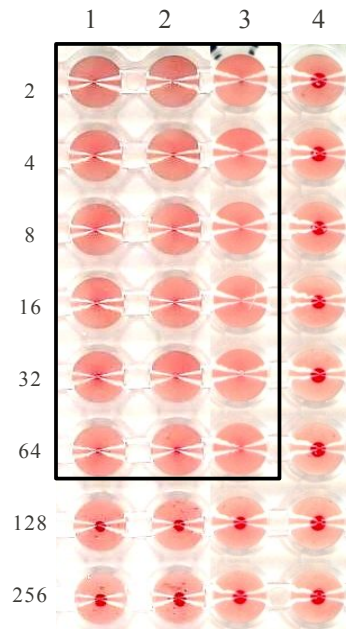
La importancia de la inactivación radica en que el virus pudo ser manipulado en los experimentos subsecuentes de cuantificación e inhibición de forma segura. Así, se determinó la actividad hemaglutinante residual, así como el título viral residual de inactivación viral con etilenimina 4 mM de concentración final (Sarachai *et al.*, 2007).

Se realizó la titulación por inmunofluorescencia para el virus sin inactivar e inactivado con etilenimina 4mM por 2 hrs. El virus sin inactivar mostró un título estimado de  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50%</sub>/mL, mientras el inactivado 2 hrs con etilenimina no mostró señal en una dilución 1:1000 por lo que representa un título menor de  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50%</sub>/mL (figura 24). La dosis infectiva al 50% (HID<sub>50%</sub>) en humanos se ha reportado en aerosol de 3 TCID<sub>50%</sub> para sujetos libres de anticuerpos neutralizantes (Alford *et al.*, 1966), y por gotas directamente administradas de 127 a 320 TCID<sub>50%</sub>, necesitándose menor dosis en aerosol que por goteo (Couch *et al.*, 1971, 1983, Teiller, 2006). El significado de estos datos es que con un título de  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50%</sub>/mL, y considerando la HID<sub>50%</sub> de 3 TCID<sub>50%</sub>, se requerirían 3  $\mu$ L por aerosol o bien 127  $\mu$ L por goteo dentro de la nariz, para infectar a una persona. Por los reportes de Sarachai *et al.* 2007 que coincidieron con la inactivación encontrada se incrementó a 6 hrs el tiempo para obtener una inactivación completa. Esta metodología puede ser empleada para evaluar el efecto sobre la replicación viral de los compuestos encontrados en este trabajo.

Para determinar el efecto sobre la proteína hemaglutinina del virus se determinó la actividad hemaglutinante residual posterior a la inactivación por medio del ensayo de hemaglutinación con eritrocitos humanos tipo O+, resultando que para la inactivación con etilenimina por 2 hrs no se detectó influencia de la inactivación sobre las proteínas dada por la actividad hemaglutinante al comparar con el virus sin inactivar (figura 25).



**Figura 24. Comprobación de inactivación con iminas del virus de la influenza A H1N1 México 2009 mediante titulación por inmunofluorescencia.** Fotografías digitales tomadas del microscopio de fluorescencia de células MDCK infectadas con el virus de la influenza A (H1N1) del brote de México/2009 **a)** inactivado con iminas o **b)** sin inactivar. La detección de replicación del virus se realizó por inmunofluorescencia con un anticuerpo 1° anti-influenza y un 2° acoplado a fluoresceína. **a)**: Pozo con una dilución  $1 \times 10^{-7}$  del virus sin inactivar. **b)**: Pozo con una dilución  $1 \times 10^{-3}$  del virus inactivado por 2 hr con imina al 4 mM.

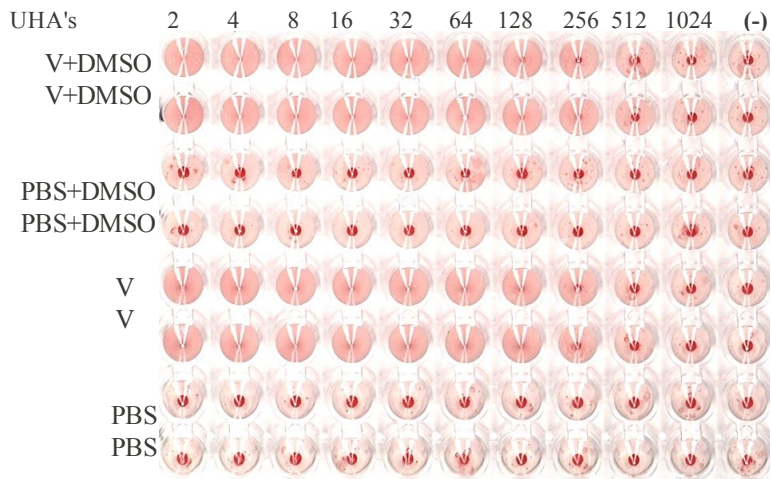


**Figura 25. Ensayos de actividad de hemaglutinante del virus de la influenza A (H1N1) tratado en distintas condiciones.** Hemaglutinación del *vH1N1* inactivado con BEI, realizada con eritrocitos humanos tipo O+ en PBS pH7.2. El cuadrado muestra los pozos que presentan hemaglutinación. Las filas indican las UHA's. Columna 1 y 2: Virus inactivado por 2 hr. Columna 3: Virus sin procesar, Control positivo. Columna 4: PBS, Control -.

## ENSAYOS DE ACTIVIDAD Y ESCRUTINIO

### Efecto del DMSO al 10% sobre la hemaglutinación y la sedimentación.

Se encontró que no existe efecto del DMSO al 10% sobre la actividad de la hemaglutinina y ni sobre la sedimentación de los eritrocitos (figura 26), adicionando DMSO al agente hemaglutinante diluido en PBS pH 7.2, el análisis se desarrolló como se describió anteriormente para el efecto de las distintas concentraciones del DMSO.

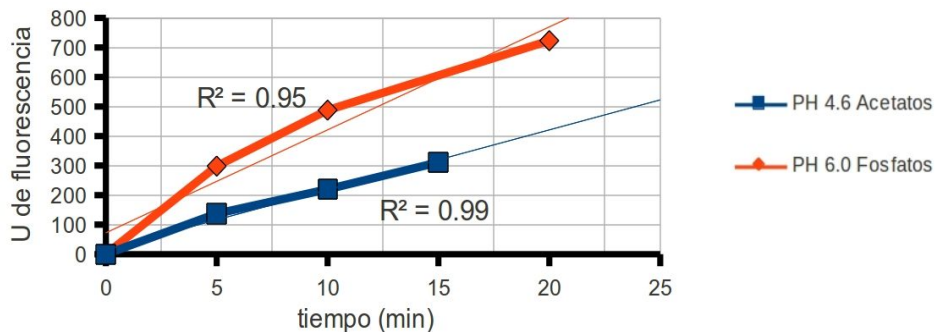


**Figura 26. Efecto del DMSO 10% sobre el título de la hemaglutinación.** Hemaglutinación del vH1N1 con eritrocitos humanos tipo O+ en PBS conteniendo o no DMSO al 10%. En las filas se muestran V: diluciones del virus en PBS sin DMSO, V+DMSO: diluciones del virus en PBS con DMSO al 10%, PBS: eritrocitos sin virus en PBS sin DMSO, PBS+DMSO: eritrocitos sin virus en PBS con DMSO al 10%. Columnas indicando las UHA's.

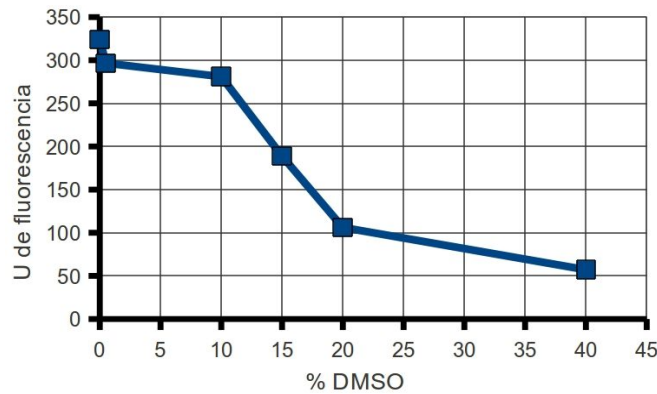
### Neuraminidasa del *Clostridium perfringens* IX.

Para el montaje inicial de los ensayos de neuraminidasa reportados en este trabajo se empleó la enzima de *Clostridium perfringens* (NAClos, Sigma-Aldrich). Como en el caso de las reacciones con la NAr de influenza se evaluó el comportamiento de la enzima con respecto al tiempo de reacción, de la concentración de la enzima y de la pre-incubación con DMSO sobre la actividad de la Naclos.

La enzima neuraminidasa NAClos se comportó de forma lineal con respecto al tiempo de la reacción en un intervalo cercano a 20 minutos a pH 4.6, y sin ajustarse a la linealidad a pH 6.0 (figura 27), y presenta una baja estabilidad en la pre-incubación con DMSO (figura 28), lo que en el inicio del trabajo obligó a poner especial énfasis en el efecto del DMSO sobre la actividad de las proteínas, y parecía que dificultaría los ensayos con los compuestos. Sin embargo en las condiciones ensayadas para la NA y la HA fue posible tener un efecto bajo de DMSO haciendo posible la realización de los escrutinios .



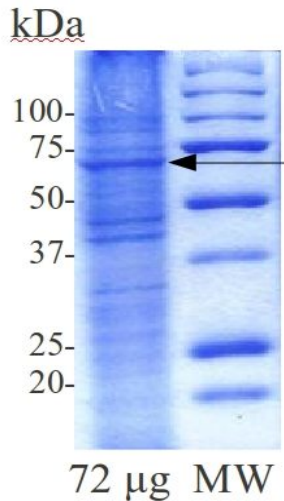
**Figura 27. Comportamiento de la NAClos con respecto al tiempo de reacción.** Lectura en el fluorómetro Shimatzu RF-5000 del ensayo de neuraminidasa para distintos tiempos en amortiguador de acetatos pH 4.6 y fosfatos pH 6.0 como se describe en materiales y métodos.



**Figura 28. Efecto de la concentración de DMSO sobre la actividad de la NAclos a pH=4.6.** Lectura en el fluorómetro Shimatzu RF-5000 del ensayo de neuraminidasa con el empleo del MUNANA.

### Enzima neuraminidasa recombinante (NAr)

Dentro de las posibilidades que se probaron para emplear una proteína recombinante para el ensayo de la neuraminidasa fue utilizar la neuraminidasa recombinante (NAr) del virus de la influenza H1N1 A/California/04/2009, expresada en células HEK293 creciendo en medio SFM, producida por la compañía Sino Biological y proporcionada como extracto celular total, por lo que se evaluó la proporción presente en la preparación de neuraminidasa de 52 kDa en base a la secuencia de aminoácidos (que migra alrededor de los 65 kDa) por SDS-PAGE al 12 % (figura 29). Esta preparación enzimática fue evaluada para tener actividad de neuraminidasa y resultó adecuada para realizar los ensayos de actividad (que se mencionan posteriormente).

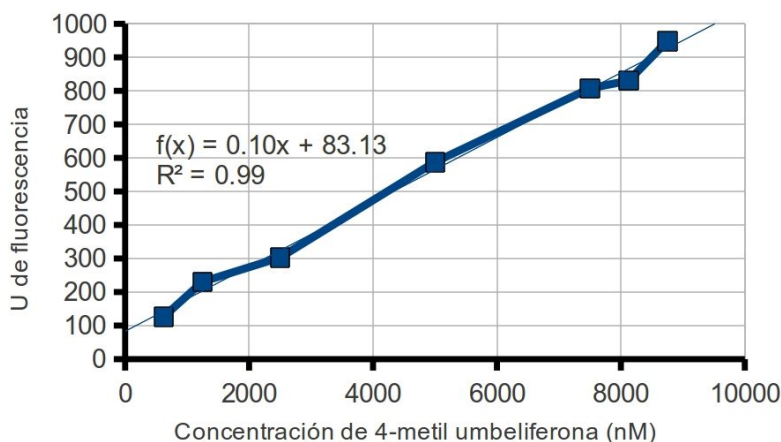


**Figura 29. Extracto de células HEK293 expresando la Neuraminidasa recombinante NArH1N1 en su forma activa.** SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie. La flecha indica la banda correspondiente a la NAr. Carril 1: Extracto de células HEK293 crecidas en medio SFM expresando la proteína NArH1N1 activa. Carril 2: Marcador de peso molecular para proteínas Precision Plus All blue (Bio-rad).

## Relación de la fluorescencia y la concentración de la 4-metil umbeliferona

Se evaluó la relación de la intensidad de la señal fluorescente con la concentración de la 4-metil umbeliferona. La 4-metil umbeliferona es el producto fluorescente de la reacción catalizada por la neuraminidasa (NA) sobre el sustrato 2'-(4-metilumbeliferil)- $\alpha$ -D-N-acetilneuraminidato de sodio (MUNANA). Para ello se realizó una solución 25mM de 4-metil umbeliferona (Sigma-Aldrich) en etanol absoluto. A partir de la solución stock se realizaron diluciones con incrementos de 625 nM de 4-metil umbeliferona en el amortiguador de paro de la reacción de glicina 0.1mM/etanol 25%; y se determinó la señal fluorescente como se describe en las reacciones de la NAr, en el fluorómetro Shimatzu RF-5000 a una longitud de onda de absorción de 365 nm y emisión de 450nm (figura 30).

El coeficiente de correlación del comportamiento de la fluorescencia en función de la concentración de la 4-metil umbeliferona (figura 30), indica que es lineal en el intervalo de concentraciones probado, lo que puede permitir cuantificar el monto del producto de la reacción enzimática de la NA. Aunque la relación debe ser determinada para cada distinto fluorómetro, por ser arbitraria la escala de unidades de fluorescencia reportadas por cada aparato.

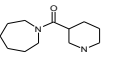
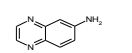
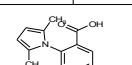
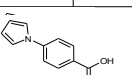
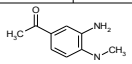
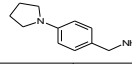
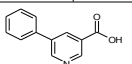
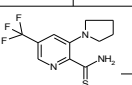
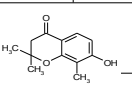
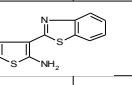
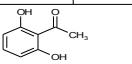
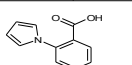
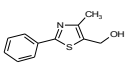


**Figura 30. Comportamiento de la fluorescencia en función de la concentración de la 4-metil umbeliferona.** Señal fluorescente obtenida a distintas concentraciones de 4-metil umbeliferona a una longitud de onda de absorción de 365 nm y emisión de 450nm, en el fluorómetro Shimatzu RF-5000. La 4-metil umbeliferona es el producto de la reacción que cataliza la neuraminidasa sobre el sustrato MUNANA, por lo que la relación de la gráfica permite cuantificar el producto de la reacción.

## Ensayo aproximación estilo HTS completo

Se realizó el escrutinio de 1000 compuestos de la biblioteca Maybridge Ro3 para tener actividad inhibitoria sobre la NAr (figura 31). Los 13 compuestos detectados con alguna inhibición de la actividad de la NAr fueron verificados por reacciones individuales, determinando para cada uno el porcentaje de inhibición a una concentración de 600  $\mu$ M en la reacción. Los fragmentos detectados fueron los compuestos con las coordenadas de la biblioteca 9H02, 3H08, 5E06, 4G07, 8A10, 4H10, 4H06, 12B02, 10G04, 12H04, 2D05, 5C03, 4G09. (tabla 5).

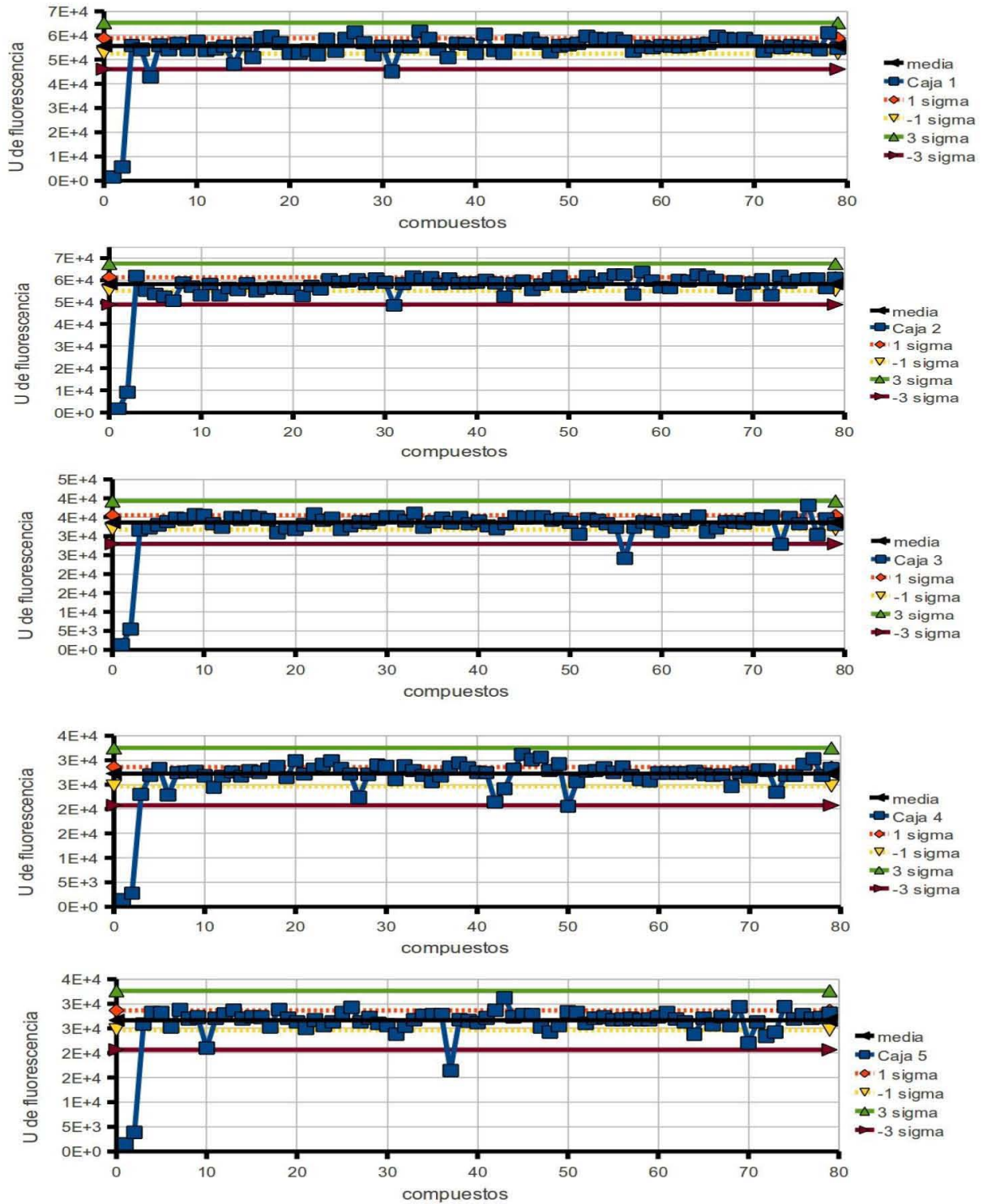
**Tabla 5. Características de los compuestos positivos evaluados para tener inhibición de sobre la NAr y la neuraminidasa del vH1N1.**

CAS. No	Estructura	Coordenada	Nombre	Estatus de comprobación del compuesto	NAr					Virus Influenza A H1N1	Dependencia del Calcio
					Concentración en la reacción					600 µM	
					600 µM 4 hrs	300 µM 4 hrs	150 µM 4 hrs	75 µM 4 hrs	42 µM 4 hrs	600 µM 2 hrs	
					% Inhibición	% Inhibición					
		9H02	AzPM								
690632-28-1			1-azepanil(3-piperidinil)metanona	Comprobación de identidad por RMN	57%	45%	30%	15%	10%	14 % (en Presencia de Calcio 2mM)	Dependiente de Ca
		3H08	AQA								
6298-37-9			6-quininoxalina	Puro de Sigma con Actividad.	26%	11%	9%	nd	0%	30% para Sigma	Independiente de Ca
		_5E06									
92028-57-4			ácido 2-(2,5-dimetil-1H-pirrol-1-il)benzoico	No analizado.	42%	37%	32%	32%	20%	48%	Independiente de Ca
		4G07	APIB								
22106-33-8			ácido 4-(1H-pirrol-1-il)benzoico	Puro de Sigma sin Actividad. Posiblemente inhibida por precursor hidrazida del ácido 4-bromo benzoico	41%		27% (200 µM)		13%	73%	Independiente de Ca
		8A10									
18076-19-2			1-(3-amino-4-(metilamino)fenil)-1-etanona	Corresponde a otro compuesto por RMN.	29%	11%	5%	0%	0%	28%	nd
		4H10									
114365-04-7			[4-(1-pirrolidinil)fenil]metanamina	No analizado.	18%		nd		nd	nd	nd
		4H06									
10177-12-5			Ácido 5-fenilnicotínico	No analizado.	18%		9% (200 µM)		0%	26%	Independiente de Ca
		12B02									
257287-82-4			3-(1-pirrolidinil)-5-(trifluorometil)piridin-2-carbotioamida	No analizado.	18%		5%		0%	9%	Independiente de Ca
		10G04									
50544-72-4			7-hidroxi-2,2,8-trimetil-2,3-dihidro-4H-cromen-4-ona	No analizado.	16%		7%		0%	14%	Independiente de Ca
		12H04									
306936-47-0			3-(1,3-benzotiazol-2-il)tiófen-2-amina	No analizado.	11%		6%		0%	9%	Independiente de Ca
		2D05									
699-83-2			1-(2,6-dihidroxi)fenil)etan-1-ona	No analizado.	12%		nd		nd	nd	nd
		5C03									
10333-68-3			Ácido 2-(1H-pirrol-1-il)benzoico	No analizado.	9%		nd		nd	nd	nd
		4G09									
61291-91-6			(4-metil-2-fenil-1,3-tiazol-5-il)metanol	No analizado.	8%		nd		nd	nd	nd

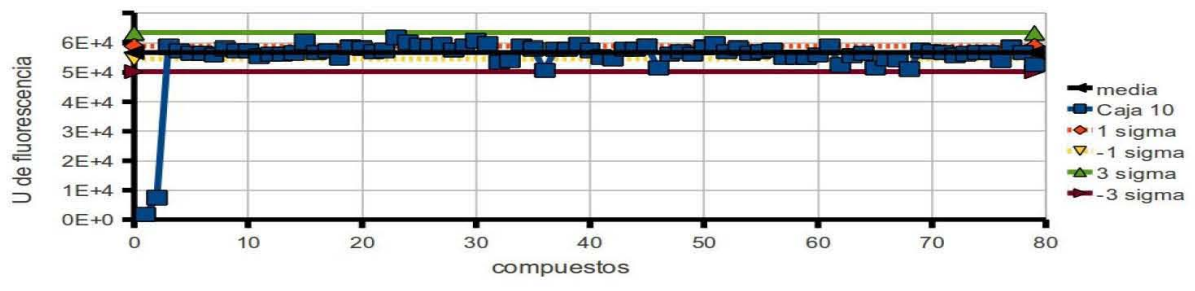
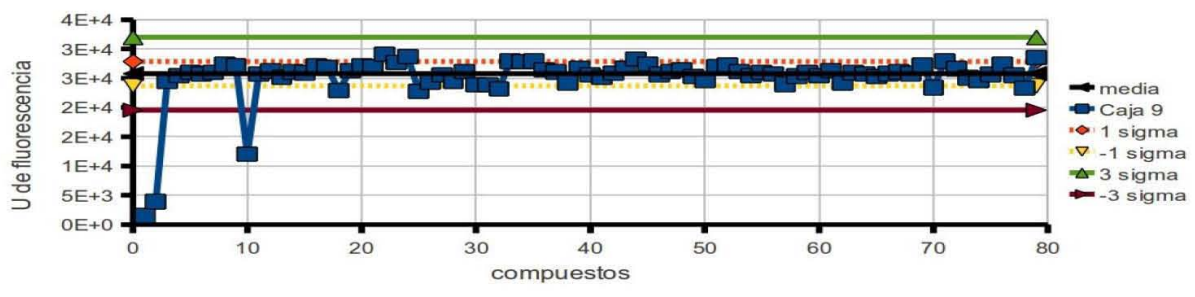
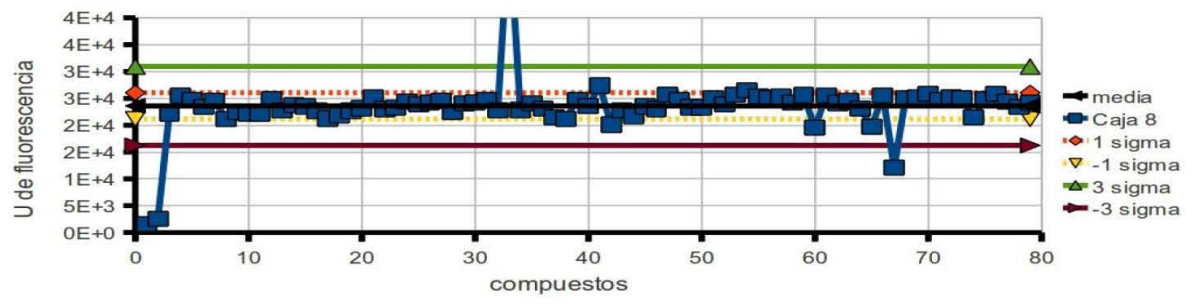
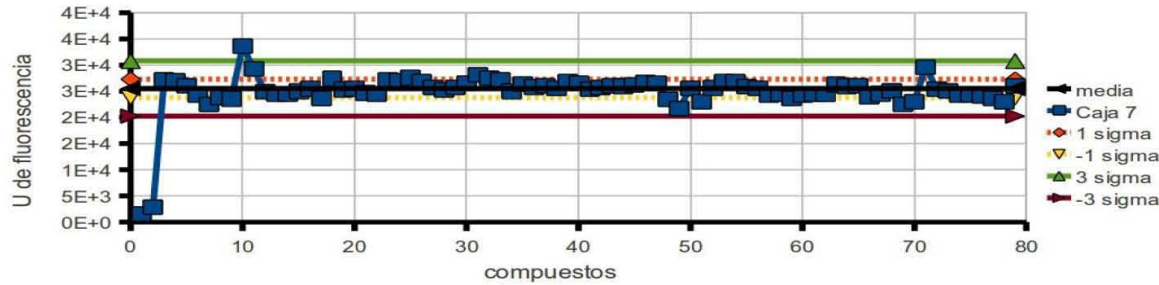
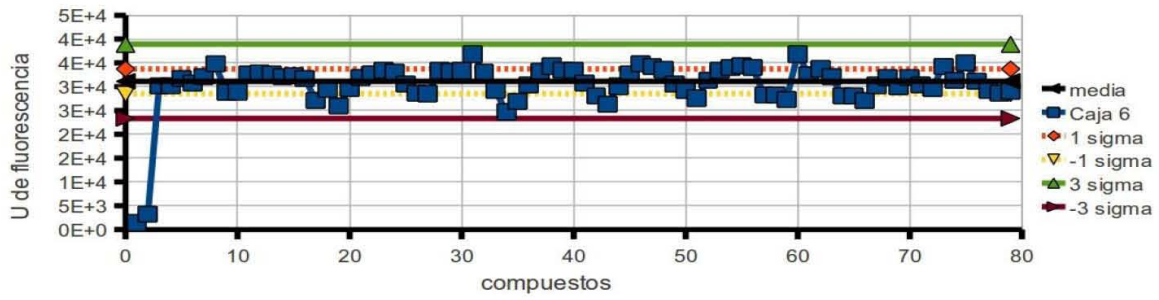
\* nd= no determinado

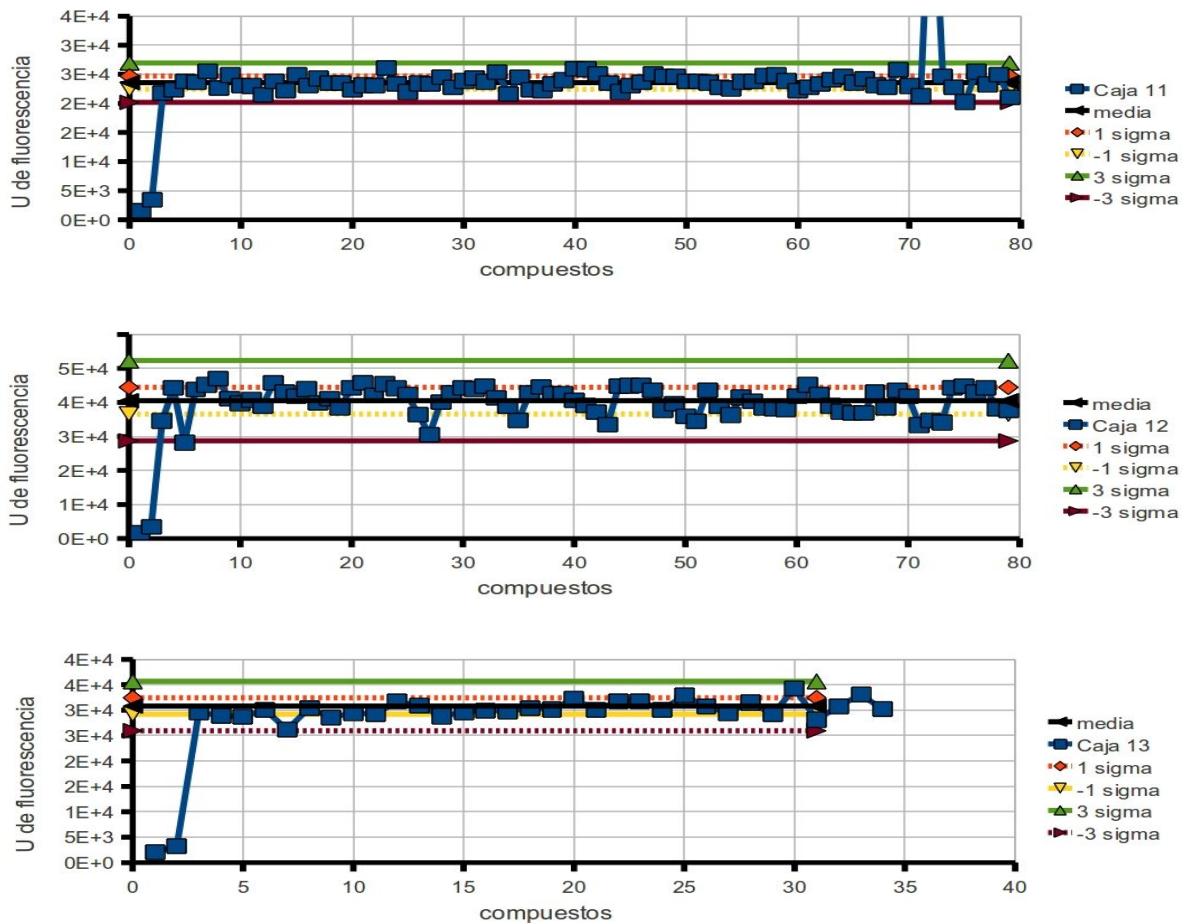


A continuación se muestra el procesamiento estadístico del escrutinio estilo HTS de los compuestos de la biblioteca Maybridge Ro3 contra la NAr (figura 31).





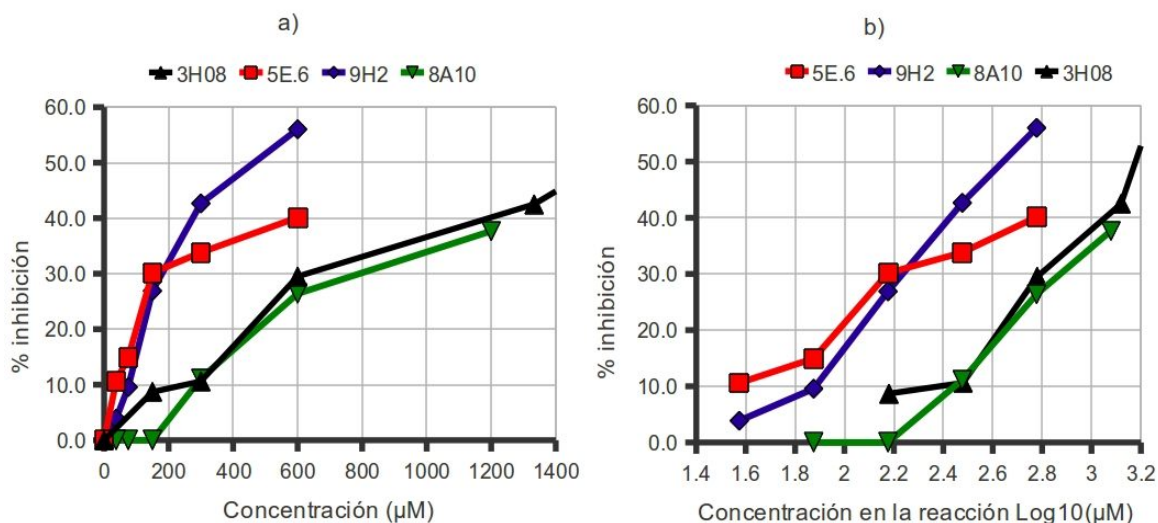




**Figura 31. Tratamiento estadístico completo del escrutinio de la biblioteca de compuestos con posible actividad inhibitoria de la NAr.** Se muestra el efecto sobre la actividad de la NAr de los compuestos de la biblioteca Ro3 de Maybridge, que fue graficado para evaluar estadísticamente que compuestos presentaban actividad inhibitoria. La evaluación se realizó mediante el criterio conocido como 6 sigma, empleado en el control estadístico de procesos, para juzgar un fenómeno que debería presentar una distribución normal. Cada gráfica corresponde a una **caja** de la biblioteca. Se indica la **media**,  $\pm 1$  y  $\pm 3$  desviaciones estándar. De izquierda a derecha, los 2 primeros puntos de cada gráfica corresponden al blanco y al control positivo de inhibición de la NAr por el Oseltamivir. Los puntos con valores menores de  $-3$  desviaciones estándar en general corresponden a los compuestos comprobados para tener actividad inhibitoria sobre la enzima. Los puntos mayores de  $+3$  desviaciones estándar o que se disparan del rango son compuestos que presentan un pico de fluorescencia con excitación a 360 nm y emisión a 460 nm.

## Curvas de concentración-actividad inhibitoria

Se determinó de forma preliminar la correspondencia de la inhibición con la concentración para los compuestos 4G07, 3H08, 4H10, 4H06, 12B02, 10G04 y 12H04 a 666  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  y 133  $\mu\text{M}$  en la reacción. De una forma mas completa se determinó la correspondencia de la inhibición para los compuestos 9H02, 5E06 y 8A10 a las concentraciones en la reacción de 600, 300, 150, 75 y 37.5 mM (tabla 5). La concentración aproximada a la que se inhibiría al 50% la actividad de la NAr en la reacción para el 5E6 sería de 1.8 mM, y para 8A10 sería de 2.5 mM (figura 32).



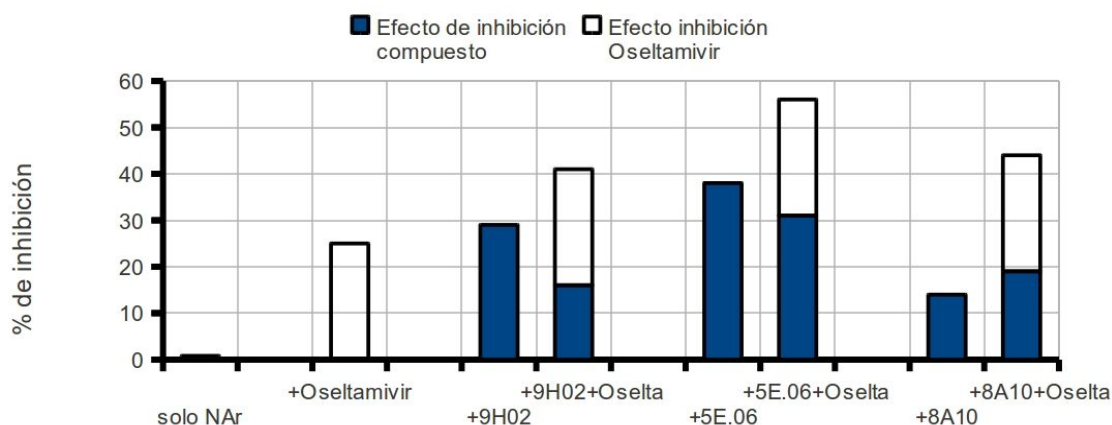
**Figura 32. Curvas de concentración inhibitoria para algunos compuestos inhibidores de la NAr.** Efecto inhibitorio sobre la NAr de los compuestos 3H08, 5E06, 9H02, y 8A10. Se grafica la: a) concentración del compuesto en la reacción. b) el logaritmo de la concentración del compuesto.

## Escrutinio de inhibición de la NA con calcio

500 de los compuestos también fueron ensayados para inhibir la neuraminidasa en presencia del amortiguador MES 33 mM pH 6.0 con cloruro de calcio 4 mM, por reacciones individuales antes del montaje del ensayo estilo HTS. En este primer escrutinio la concentración de DMSO en la reacción fue de 5% en la pre-incubación y el tiempo de pre-incubación con cada compuesto fue de 30 minutos, las demás concentraciones y tiempos se desarrollaron como se ha descrito, y la fluorescencia fue determinada en el espectrofluorómetro Shimatzu RF-5000. Durante este escrutinio no fueron detectados inhibidores como en el caso del inhibidor con las coordenadas 9H02, particularmente debido al bloqueo de su inhibición por el calcio.

## Inhibición de compuestos positivos al ser combinados con el Oseltamivir

Se determinó la inhibición producida por 200  $\mu\text{M}$  de los compuestos con coordenadas de la biblioteca 9H02, 5E06 y 8A10 solos y combinados con 1  $\mu\text{M}$  de Oseltamivir, encontrando en todos ellos una aditividad de la actividad inhibitoria de la NAr (figura 33). Se realizó este experimento previo buscando si era posible a nivel enzimático observar alguna variación que indicara un preliminar a la fusión de fragmentos para comenzar el diseño de un fármaco mas complejo, sin embargo nos lleva a considerar que la metodología adecuada se debe enfocar al complejo estructural tridimensional para esta tarea.



**Figura 33. Efecto inhibitorio de compuestos positivos combinados con el Oseltamivir.** La NAr fue pre-incubada con 200  $\mu\text{M}$  de cada uno de los compuestos con las coordenadas de la biblioteca 9H02, 5E06 y 8A10 (390  $\mu\text{M}$ ), solo o en combinación con 1  $\mu\text{M}$  de Oseltamivir. Posteriormente se desarrolló la reacción de la NAr como se indica en la metodología. Las barras representan el porcentaje de inhibición de la actividad de la NAr. Las barras blancas representan la inhibición de la NAr por el Oseltamivir, considerando que se mantiene sin cambio la proporción del efecto del Oseltamivir cuando se combina con los compuestos. Las barras sombreadas representan la inhibición por cada compuesto, considerando que el efecto al combinarse con el Oseltamivir es aditivo al efecto normal de este fármaco. Este gráfico se presenta solo para visualizar el efecto aditivo de los compuestos.

## IDENTIDAD DE LOS COMPUESTOS INHIBIDORES DE LA NEURAMINIDASA

### Actividad del compuesto APiB (4G07) puro sobre la NAr.

Se evaluó si el compuesto ácido 4-(1H-pirrol-1-il) benzoico (APiB) de Sigma-Aldrich, con una pureza de 99% determinada por HPLC por el proveedor, presentaba la misma actividad inhibitoria del compuesto con las coordenadas 4G07 de la biblioteca de Maybridge. El compuesto 4H07 de la biblioteca presentó una inhibición de 41% de la actividad de la NAr a una concentración 600  $\mu\text{M}$  en la reacción, mientras el APiB no presentó actividad inhibitoria en las mismas condiciones de reacción (tabla 5).

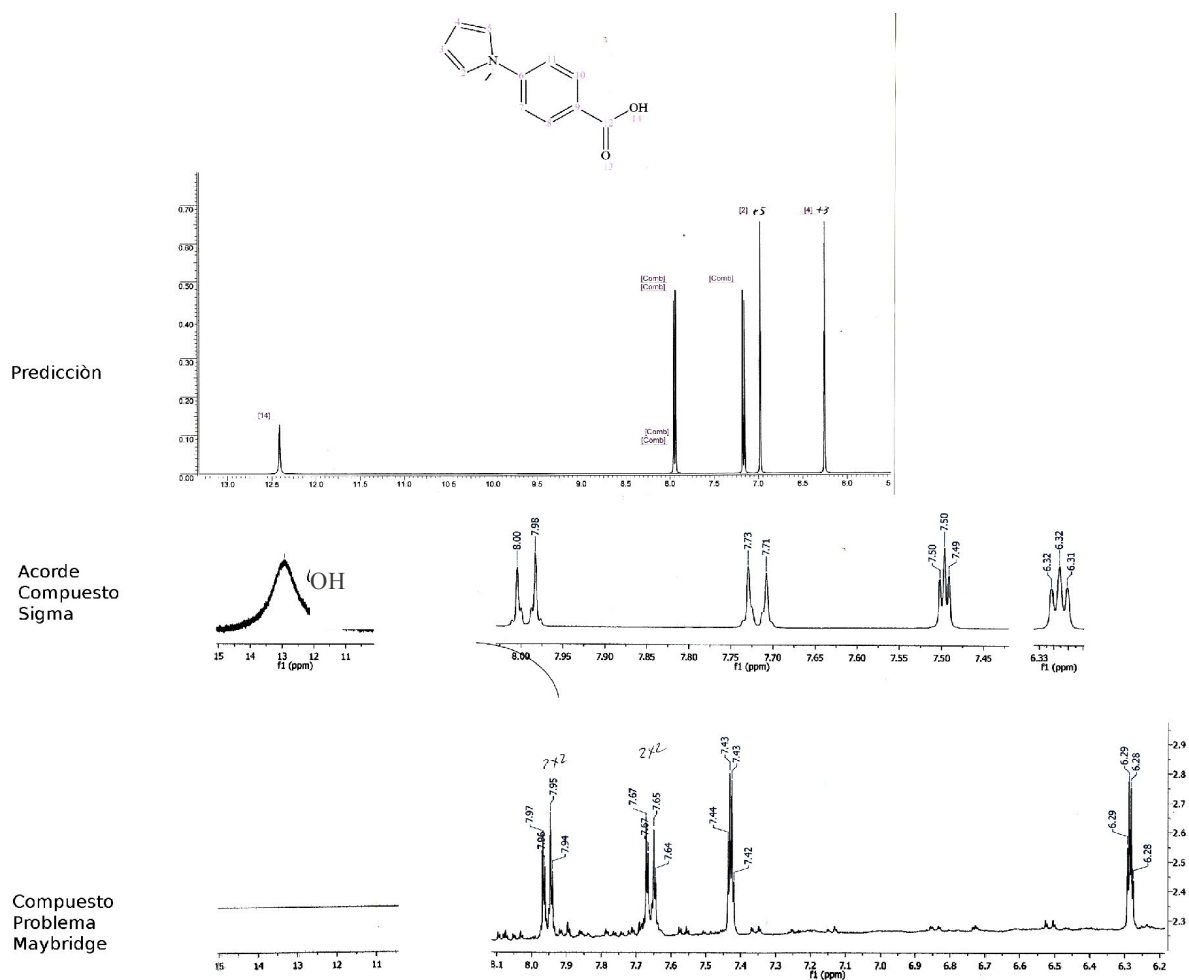
## **Identidad de los compuestos 4G07 y 8A10 por RMN.**

El compuesto con las coordenadas 4G07 de la biblioteca de Maybridge debería corresponder al ácido 4-(1H-pirrol-1-il) benzoico (APiB) y el compuesto con coordenadas 8A10 de la biblioteca de Maybridge debería corresponder a la 1-[3-amino-4-(metilamino) fenil]-1-etanona (AMAFE) (tabla 5).

Debido a los resultados negativos obtenidos con el compuesto APiB puro, el compuesto 4G07 de la biblioteca y el APiB de Sigma-Aldrich fueron analizados por RMN de  $^1\text{H}$ , para evaluar las diferencias entre ellos y al ser comparados con la simulación (predicción) del retardamiento por RMN. Como resultado del análisis realizado por el Dr. Miguel Costas de la Facultad de Química y por el grupo de la Dra. Laura Álvarez del Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM, se observó que el compuesto 4G07 correspondió a la simulación del espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , pero presentó una duplicación de las señales indicando la presencia de muchas impurezas. Además en el compuesto APiB Sigma-Aldrich en la región cercana a un retardamiento de 13 ppm se detectó la señal correspondiente al hidrógeno del carboxilo, mientras en el compuesto 4G07 de Maybridge no fue detectado (figura 34) lo que en primera estancia hizo pensar que se trataba de una sal del compuesto.

El compuesto 4G07 además fue recuperado del análisis de resonancia y sometido al análisis por cromatografía de gases por el grupo de la Dra. Laura Álvarez, detectando además de múltiples impurezas lipídicas un compuesto volátil que pudo ser identificado como la hidrazida del ácido 4-bromo benzoico (figura 35). Por lo que esta impureza pudiese ser la responsable del efecto inhibitorio sobre la NAr del compuesto de la biblioteca.

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 8A10 de la biblioteca no correspondió a la simulación computacional de la 1-[3-amino-4-(metilamino) fenil]-1-etanona (gráfico no mostrado). Sin embargo muestra una alta pureza, por lo que lleva a considerar identificar el compuesto presente.



**Figura 34. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto 4G07.** a) Simulación (predicción) para el compuesto ApiB. b) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto APiB de Sigma en DMSO- $d_6$ . Se observa la señal correspondiente al hidrógeno del carboxilo en 13 ppm. c) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto con las coordenadas 4G07 de la biblioteca Maybridge. Se observa la ausencia de la señal correspondiente al hidrógeno del carboxilo en 13 ppm.



**figura 35. Uno de los contaminantes detectados del análisis del compuesto 4G07 por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.** La correspondencia con la predicción indica que la hidrazida del ácido 4-bromo benzóico es uno de los contaminantes del compuesto con las coordenadas 4G07. a) Predicción computacional del espectro de masas de la hidrazida del ácido 4-bromo benzóico. b) "Resta" del espectro de masas de la predicción menos el análisis. c) Espectro del análisis por gases-masas del compuesto 4G07.



## **Evaluación de los compuestos positivos sobre la neuraminidasa del *vH1N1*.**

Se evaluó si los compuestos inhibidores de la NAr también eran capaces de inhibir a la neuraminidasa del *vH1N1*.

El compuesto 4G07 tuvo una actividad de 41% sobre la NAr y una inhibición del 73% sobre la neuraminidasa del *vH1N1* (tabla 5). Sin embargo el compuesto APiB de Sigma no presentó actividad sobre la NAr y es posible que su actividad se debiera a las impurezas detectadas en el 4G07 por RMN.

El compuesto 5E6 tuvo una inhibición del 42% sobre la NAr y 48% sobre el *vH1N1* (tabla 5). No se han realizado ensayos de identidad para este compuesto.

El compuesto 8A10 tuvo una actividad de 28% sobre la NAr y también sobre la neuraminidasa del *vH1N1*. Al ser analizado por RMN este compuesto no correspondió exactamente a la estructura indicada para esta coordenada en la biblioteca .

En la tabla 5 se muestra un resumen de los resultados de evaluación de actividad de todos los compuestos ensayados sobre la neuraminidasa del *vH1N1*.

## **INTENTOS DE EXPRESIÓN DE LA NEURAMINIDASA RECOMBINANTE**

Se realizaron 2 intentos de expresión de la proteína NA recombinante del *vH1N1* empleando construcciones de 2 grupos con quien se mantuvo colaboración.

### **Baculovirus con la proteína completa con la porción transmembranal**

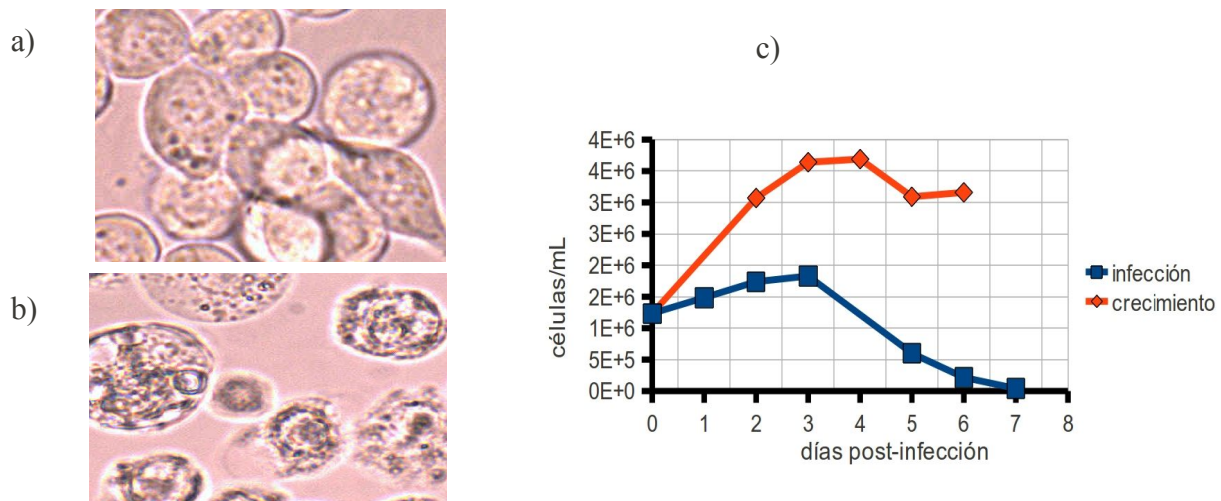
Una construcción constaba de un baculovirus recombinante que contenía el gen de la NA completo con el dominio transmembranal, un sitio de corte para la proteasa del TEV y una cola de 6xHis bajo el promotor de polihedrina elaborado por el grupo de la Dra. Susana López, del Instituto de Biotecnología de la UNAM. También, se nos proporcionó el baculovirus recombinante conteniendo la HA del *vH1N1* completa con el dominio transmembranal, un sitio de corte TEV y una cola de 6His bajo el promotor de polihedrina elaborado por el mismo grupo. Se realizó la amplificación de ambos baculovirus en células Sf9 en placas de 6 pozos infectando con una MOI de 1 y 3, observando el efecto citopático característico a las 120 hpi, comparando con las células control sin infectar (figura 36a y 36b). Los extractos celulares sonicados fueron analizados por SDS-PAGE al 10% (figura 37) y posteriormente por transferencia Western (figura 38) e inmunoblot con un anticuerpo monoclonal antihistidinas conjugado a peroxidasa introduciendo un control de una proteína no relacionada con cola de histidinas, detectando la señal con luminiscencia (ECL) en una placa fotográfica.

En la infección pudo observarse el efecto citopático de los baculovirus sobre las células Sf9 (figura 36a y 36b). En el análisis por SDS-PAGE pudo observarse una expresión diferencial con las células infectadas con los baculovirus conteniendo los genes de la NA y la HA contra las células Sf9 sin infectar (figura 37). Sin embargo, no se detectó señal en el inmunoblot para ninguna de las proteínas, y si se detectó la proteína no relacionada con cola de histidinas empleada como control (figura 38).

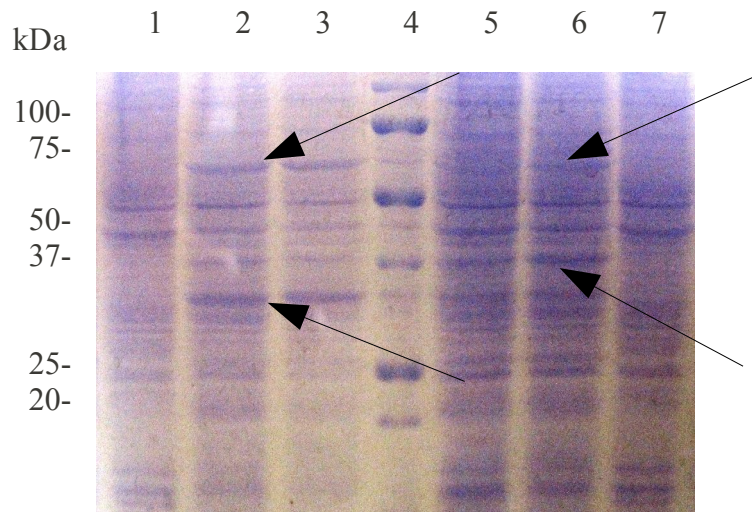


También se realizó una infección con el baculovirus conteniendo el gen de la NA en cultivo en suspensión de células Sf9 infectadas a una densidad de  $1.4 \times 10^6$  millones de células/mL con una MOI de 0.3. Se realizó un muestreo diario para evaluar la viabilidad de las células infectadas y sin infectar contadas en el hematocitómetro con azul tripano (figura 36c). Se observó la curva característica de infección por el baculovirus comparada con las células sin infectar (figura 36c). Sin embargo, no se detectó la expresión de la proteína.

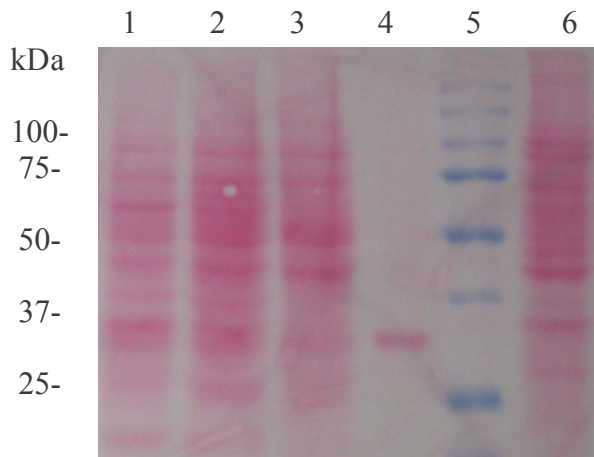
Estos resultados demostraron la existencia de infección por los baculovirus recombinantes de ambas proteínas, sin embargo a pesar de observar una expresión diferencial (figura 37), no logramos detectar ninguna de las proteínas HA o NA, o bien las proteínas ya expresadas no contenían la cola de histidinas de forma que no pudieron ser detectadas (figura 38).



**Figura 36. Efecto citopático característico por la infección por baculovirus en las células Sf9 y curva de muerte característica de la infección.** Fotografía digital tomada del microscopio invertido con un objetivo de 40 X. a) Cultivo adherente de células Sf9 sin infectar en placas de 6 pozos. b) Daño citopático sobre las células S9 al ser infectadas con el baculovirus recombinante conteniendo el gen de la NA a una MOI de 3. c) Curva de crecimiento e infección del cultivo en suspensión de células Sf9, las células fueron infectadas con el baculovirus recombinante conteniendo el gen de la NA o sembradas sin infectar a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/mL.



**Figura 37. Ensayo de expresión de células Sf9 infectadas con los baculovirus recombinantes vb-HA y vb-NA.** Gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras teñido con Azul de Coomassie. Carril 1 y 7: extracto de células Sf9 sin infectar como control negativo. Carril 2 y 3; extracto de células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante vb-HA a una MOI de 1 y 3 respectivamente. Carril 4: Marcador de peso molecular de proteínas Presicion Plus All blue (Bio-rad). Carril 5 y 6: extracto de células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante vb-NA a una MOI de 1 y 3 respectivamente.



**Figura 38. Transferencia Western de las proteínas producidas en el sistema de baculovirus.** Membrana de nitrocelulosa electrotransferida teñida con Rojo de Ponceau. Carril 1: extracto de células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante vb-HA a MOI de 3. Carril 2: extracto de células Sf9 infectadas con el baculovirus recombinante vb-NA a MOI de 3. Carril 4. Proteína control con cola de histidinas. Carril 5: Marcador de peso molecular de proteínas All blue (Biorad). Carril 6: Extracto de células COS-7 transfectadas con el vector pCMV5-NA

### **Porción soluble de la neuraminidasa con señal de exporte de péptido glicano.**

Otra construcción fue elaborada por el grupo del Dr. Fernando López Casillas, del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, conteniendo la secuencia la codificando la fracción soluble de la NA del *vH1N1* incluida en un cassette de expresión, dicho

cassette contiene previo al ORF de la proteína el péptido señal de péptido glicano truncado, una secuencia que codifica para un dominio plegador, la secuencia que codifica para las 6xHis y la secuencia para corte por la proteasa TEV. El cassette de expresión fue evaluado en el vector pCMV5 para expresión transitoria en células COS-7 a las 48% post transfección. El extracto celular lisado por sonicación fue analizado por SDS-PAGE e inmunoblot. También se probó actividad del lisado celular por la reacción de la neuraminidasa antes descrita con 30 µL del extracto celular. No se detectó señal por inmunoblot con anticuerpo antihistidinas. No se detectó actividad alguna de la neuraminidasa (tabla 6).

**Tabla 6. Determinación de la existencia de actividad de Neuraminidasa en el extracto de células COS-7 transfectadas con el vector pCMV5-NA.**

muestra	enzima NAclos.	%extracto	Fluorescencia	Fluorescencia -Blanco
blanco	----	----	16.01	0
Enzima	2 uL	----	987.3	971.29
pCMV5-solo	----	40 uL	16.2	0.19
pCMV5-NA	----	40 uL	17.7	1.69

## Docking

Se realizó un análisis informático para la neuraminidasa, basados en el artículo de Zang *et al.* (2011), donde se comparan los programas para localizar bolsillos hidrofóbicos. En este análisis se empleó el programa metapocket (<http://metapocket.eml.org/>) para detectar los bolsillos hidrofóbicos de un monómero de la neuraminidasa del *vH1N1* con el PDB 2HU4. De este programa se obtuvieron 3 agrupaciones de posibles sitios que fueron considerados para ser bolsillos hidrofóbicos. Para cada uno de estos bolsillos se realizó el escrutinio in silico por “docking” del monómero de la neuraminidasa del *vH1N1* contra la biblioteca de compuestos estilo fármaco Maybridge Hitfinder de 14,400 compuestos, en el servidor de la Universidad de Texas (UTMB) que cuenta con mas de 22 servidores (clusters) conectados, y emplea el programa AutoVina para evaluar las bibliotecas usando el algoritmo de Autodock para evaluar la complementariedad de forma y electroestática, y Autogrid para los cálculos de la energía de unión mínima.

Como resultado de los cálculos del escrutinio por “docking”, el servidor de la UTMB genera un informe indicando los compuestos que presentaron la menor energía de unión a la proteína; esos compuestos posiblemente presentarán una unión favorable y podrían tener efecto sobre la actividad de la proteína. También se genera un archivo PDB con las coordenadas del complejo compuesto-proteína; con estas coordenadas, cada compuesto puede ser evaluados de forma visual “dockeado” en la estructura tridimensional de la NA, decidiendo si su interacción es significativa, al observar si la complementariedad y las distancias de unión son adecuadas. Posteriormente, los compuestos evaluados con una interacción adecuada in silico, pueden ser adquiridos para ser evaluados experimentalmente.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal K, *et al.* (2011) Bioprocess optimization for cell culture based influenza vaccine production. *Vaccine* **29**(17):3320-8
- Aiello D *et al.* (2009) Discovery, characterization and comparison of inhibitors of *Bacillus anthracis* and *Staphylococcus aureus* replicative DNA helicases. *Bioorg. Med. Chem.* **17**(13):4466-76.
- Alford RH, *et al.* (1966) Human influenza resulting from aerosol inhalation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **122**:800–804.
- Banks J, *et al.* (2001) Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy. *Arch. Virol.* **146**(5):963-73.
- Barelier S *et al.* (2010) Ligand specificity in fragment-based drug design. *J. Med. Chem.* **53**(14):5256-66.
- Barker J *et al.* (2006) Fragment screening by biochemical assay. *Exp. Opin. Drug Discov.* **1** (3): 225-236.
- Basu D, *et al.*, (2008) Novel influenza virus NS1 antagonists block replication and restore innate immune function. *J. Virol.* **83**(4):1881-91. Epub 2008 Dec 3.
- Blumenthal HT *et al.* (1950). Influenza : I. The hemagglutination and infectivity titre curves of PR8 influenza virus cultivated in embryonated eggs at different temperatures. *J Exp Med.* **91**(3):321-9.
- Bock A *et al.* (2010) High-density microcarrier cell cultures for influenza virus production. *Biotechnol. Prog.* **27** (1): 241.
- Boettcher A, *et al.* (2010) Fragment-based screening by biochemical assays: Systematic feasibility studies with trypsin and MMP12. *J Biomol Screen* **15**(9):1029-41.
- Bosch FX *et al.*, (1979) The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology* **95**(1):197-207.
- Bucher DJ y Kilbourne ED (1972). A 2 (N2) neuraminidase of the X-7 influenza virus recombinant: determination of molecular size and subunit composition of the active unit. *J Virol* **10**(1):60-6.
- Bunin B.A. y Ellman J.A. (1992) A General and Expedient Method for the Solid-Phase Synthesis of 1,4-Benzodiazepine Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 10997-10998.
- Campbell LH y Brockbank KG (2007). Serum-free solutions for cryopreservation of cells. *In Vitro Cell. Dev Biol Anim.* **43**(8-9):269-75.
- CDC (2007-2011). Influenza Season Summary, CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, GA: US Department of Health and human services.
- Chen *et al.*, (2009a), Is That Possible to Design the Versatile Inhibitors for H1N1, H5N1, H5N2, and H5N7 ? . *Biomed. Eng. & Informatics*. 2nd International Conference on, BMEI 2009: 1-4.
- Chen *et al.*, (2009b) Drug design for Influenza A virus subtype H1N1. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **119**; 8p.

- Chu C *et al.*, (2009) Conversion of MDCK cell line to suspension culture by transfecting with human sial7e gene and its application for influenza virus production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **106**(35):14802-7.
- Collee JG *et al.* (2006) Variant CJD (vCJD) and bovine spongiform encephalopathy (BSE): 10 and 20 years on: part 2. *Folia Neuropathol.* **44**(2):102-10.
- Congreve M, *et al.* (2007) Application of fragment screening by X-ray crystallography to the discovery of aminopyridines as inhibitors of beta-secretase. *J. Med. Chem.* **50**(6):1124-32.
- Couch RB *et al.* (1971) Correlated studies of a recombinant influenza virus vaccine. III. Protection against experimental influenza in man. *J. Infect. Dis.* **124**:473–480.
- Dale L *et al.*, (1993) Inhibition of the fusion-inducing conformational change of influenza hemagglutinin by benzoquinones and hydroquinones. *Biochem.* **32** (12): 2967–2978.
- De BK *et al.*, (1980). Defective interfering influenza viruses and host cells: establishment and maintenance of persistent influenza virus infection in MDBK and HeLa cells. *J. Virol.* **36**(3):847-59.
- De Clercq E (2006). Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**(12):1015-25.
- Desai M.C. *et al.* (1994). Recent advances in the generation of chemical diversity libraries. *Drug. Dev. Res.* **33** (2): 174–188.
- Djukic M *et al.* (2012). Overton's rule helps to estimate the penetration of anti-infectives into patients' cerebrospinal fluid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**(2):979-88.
- Donta ST. (1973) The growth of functional rat glial cells in a serumless medium. *Exp. Cell. Res.* **82**(1):119-24.
- Duan S *et al.*, (2010). Oseltamivir-resistant pandemic H1N1/2009 influenza virus possesses lower transmissibility and fitness in ferrets. *PLoS Pathog.* **29**;6(7):e1001022.
- Eichelberger MC *et al.*, (2008) .Neuraminidase activity provides a practical read-out for a high throughput influenza antiviral screening assay. *Viol. J.* **26**;5:109.
- Evans VJ *et al.*, (1958). Studies of nutrient media for tissue cells in vitro. IV. The effect of amino acid mixtures on the proliferation of the long-term strain 2071 of NCTC clone 929 of strain L cells. *Am. J. Hyg.* **68**(1):66-73.
- FDA (2000). History and Characterization of the Vero Cell Line. Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee.
- FDA (2010). Guidance for Industry. Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications.
- FDA(2011)Guidance for Industry. Current Good Tissue Practice (CGTP) and Additional Requirements for Manufacturers of Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products (HCT/PS).
- Fields B *et al.*, (eds) (1996) Fields Virology. 3rd. edition. Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA.
- Freter KR. (1988) Drug discovery--today and tomorrow: the role of medicinal chemistry. *Pharm. Res.* **V5**: 397-400.

- Furuta Y *et al.*, (2005) Mechanism of action of T-705 against influenza virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**(3):981-6.
- Gambaryana AS *et al.* Effects of Egg-Adaptation on the Receptor-Binding Properties of Human Influenza A and B Viruses. *Virology.* **258** (2): 232-239
- Genzel Y *et al.* (2010) MDCK and Vero cells for influenza virus vaccine production: a one-to-one comparison up to lab-scale bioreactor cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol.* **88**(2):461-75.
- Genzel Y *et al.*, (2006) Wave microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and serum-free media. *Vaccine.* **24**(35-36):6074-87.
- Geysen H.M. *et al.* (1984). Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid (antigenic determinant/foot-and-mouth disease virus). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 3998-4002.
- Govorkova EA *et al.*, (1996) African green monkey kidney (Vero) cells provide an alternative host cell system for influenza A and B viruses. *J. Virol.* **70**(8):5519-24.
- Gubareva L.V. *et al.* (2002) Detection of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors by an enzyme inhibition assay. *Antiviral Res.* Volume **53** pp. 47-61.
- Gubareva LV *et al.* (1997). Catalytic and framework mutations in the neuraminidase active site of influenza viruses that are resistant to 4-guanidino-Neu5Ac2en. *J. Virol.* **71**: 3385-3390.
- Gubareva LV *et al.*, (2001). Comparison of the activities of Zanamivir, Oseltamivir, and RWJ-270201 against clinical isolates of influenza virus and neuraminidase inhibitor-resistant variants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**(12):3403-8.
- Ha Y *et al.*, (2002) H5 avian and H9 swine influenza virus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes. *EMBO J.* **21**(5):865-75.
- Habib M *et al.* (2006) Immunogenicity of formaldehyde and binary ethylenimine inactivated infectious bursal disease virus in broiler chicks. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* **7**(8): 660–664.
- Hajduk PJ *et al.*, (2000) Privileged molecules for protein binding identified from NMR-based screening. *J. Med. Chem.* **43**(18):3443-7.
- Hajduk PJ *et al.*, (2002) NMR-based modification of matrix metalloproteinase inhibitors with improved bioavailability. *J. Med. Chem.* **19**;45(26):5628-39. 1988. Págs. 1231-1273.
- Hajduk PJ *et al.*, (2005) Druggability indices for protein targets derived from NMR-based screening data. *J. Med. Chem.* **48**(7):2518-25.
- Hajduk PJ y Greer J. (2007) A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**(3):211-9.
- Halperin S.A. *et al.* (2002). Safety and immunogenicity of a trivalent, inactivated, mammalian cell culture-derived influenza vaccine in healthy adults, seniors, and children. *Vaccine.* **20** (7–8): 1240–1247.
- Hausmann J, *et al.*, (1997) Biosynthesis, intracellular transport and enzymatic activity of an avian influenza A virus neuraminidase: role of unpaired cysteines and individual oligosaccharides. *J. Gen. Virol.* **78** ( Pt 12):3233-45.

- Houghten R.A. (1985) General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: Specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . **82**: 5131-5135.
- Hsieh HP *et al.*, (2007) Strategies of Development of Antiviral Agents Directed Against Influenza Virus Replication. *Curr. Pharmac. Des.* **13**, 3531-3542
- Hu AY *et al.*, (2008). Microcarrier-based MDCK cell culture system for the production of influenza H5N1 vaccines. *Vaccine.* **26**(45):5736-40.
- James JM *et al.* (1998). Safe administration of influenza vaccine to patients with egg allergy. *J. Pediatr.* **133**(5):624-8.
- Jiang S, *et al.* (2004). N-substituted pyrrole derivatives as novel human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors that interfere with the gp41 six-helix bundle formation and block virus fusion. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**(11):4349-59.
- Keiser MJ, *et al.*, (2009) Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature* **12**:462(7270):175-81.
- Kingsford C *et al.*,(2009). 2009 Swine-origin influenza A (H1N1) resembles previous influenza isolates. *PLoS ONE* . **4** (7): e6402 .
- Knipe y Howley (ed) (2001) *Fundamental Virology*. 4a ed, Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA.
- Krug RM y Aramini JM (2009). Emerging antiviral targets for influenza A virus. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**(6):269-77.
- Latham T y Galarza J.(2001). Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J. Virol.* **75**:6154-6165.
- Laver WG *et al.*, (1978). Crystallization and peptide maps of neuraminidase "heads" from H2N2 and H3N2 influenza virus strains. *Virology.* **86**(1):78-87.
- Li W *et al.* Identification of GS 4104 as an orally bioavailable prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**(3):647-53.
- Lipinski CA *et al.*(2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**(1-3):3-26.
- Lou B. (2001) Novel strategies for solid-phase construction of small-molecule combinatorial libraries. *Drug. Discov. Today.* **6** (24): 1288–1294 .
- Mason J.S. *et al.* (1999). New 4-Point Pharmacophore Method for Molecular Similarity and Diversity Applications: Overview of the Method and Applications, Including a Novel Approach to the Design of Combinatorial Libraries Containing Privileged Substructures. *J. Med. Chem.* **42**, 3251-3264.
- Mattos C *et al.*(2006)Multiple solvent crystal structures: probing binding sites, plasticity and hydration. *J. Mol. Biol.* **357**(5):1471-82.
- Meguro H, *et al.* (1979). Canine kidney cell line for isolation of respiratory viruses. *J. Clin. Microbiol.* **9**(2): 175–179.
- Merrifield RB (1963) Solid phase peptide synthesis, I. The synthesis of a tetrapeptide, J. Am. Chem. Soc. **85** (14): 2149
- Merten OW (2004) State-of-the-art of the production of retroviral vectors. *J. Gene Med.*

6 Suppl 1:S105-24.

- Montero M *et al.*, (1995). Monitoring dynamic changes in free Ca<sup>2+</sup> concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells. *EMBO J.* **14**(22): 5467–5475.
- Muegge I. Selection criteria for drug-like compounds. *Med Res Rev.* **23**(3):302-21.
- Nayak DP *et al.*, (2005) Downstream processing of MDCK cell-derived equine influenza virus. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **823**(2):75-81.
- NCBI: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> .
- Nelson, D., and Cox, M. *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th Ed.) W.H. Freeman and Company, New York, 2005, 1216 pp.,
- Newcomb L *et al.*, (2008). Interaction of the influenza A virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. *J. Virol.* **83**(1):29-36.
- Nienow AW (2006). Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotech.* **50**(1-3):9-33.
- Noma K *et al.* (1998). Endogenous protease-dependent replication of human influenza viruses in two MDCK cell lines. *Arch. Virol.* **143**(10):1893-909.
- O'Connor KA *et al.*, (2005) Finding new tricks for old drugs: an efficient route for public-sector drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**(12):1005-14.
- Okomo-Adhiambo M *et al.*, (2010) Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Testing in Human Influenza Viruses: A Laboratory Surveillance Perspective. *Viruses.* **2**(10): 2269–2289.
- Olsen CW *et al.*, (2006) Triple reassortant H3N2 influenza A viruses, Canada, 2005. *Emerg Infect Dis.* **12**(7):1132-5.
- Overton E. 1900. Studien über die Aufnahme der Anilinfarben durch die lebende Zelle (Studies on the absorption of aniline dyes by the living cell) *Jahrb. Wiss. Bot.* **34**:669 –701.
- Oxford J. S. *et al.* (1987). Serological studies with influenza A(H1N1) viruses cultivated in eggs or in a canine kidney cell line (MDCK). *Bull. World Health Organ.* **65**(2): 181–187.
- Patel D.V. Y Gordon E.M (1996).. Applications of small-molecule combinatorial chemistry to drug discovery. *Drug Discovery Today.* **1**(4):134-144.
- Persidis A. (1998) High-throughput screening. Advances in robotics and miniaturization continue to accelerate drug lead identification. *Nat. Biotechnol.* **16**(5):488-9.
- Pettigrew DW (1987). Inactivation of *Escherichia coli* glycerol kinase by 5'-[p-(fluorosulfonyl)benzoyl]adenosine: protection by the hydrolyzed reagent. *Biochem.* **26**(6):1723-7.
- Pleschka S, *et al.* (2001) Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nature Cell Biol.* **3**, 301 - 305 (2001)
- Potier M. *et al.* (1979). Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -D-N-acetylneuraminic acid) substrate. *Analyt. Biochem.* **94** (2): 287-296.
- Reed, L.J., y Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene*, **27**, 493-497



- Reichel A. *et al.*, (2006) The role of blood-brain barrier studies in the pharmaceutical industry. *Curr Drug Metab.* **7**(2):183-203.
- Rimmelzwaan GF *et al.* (1998) Comparison of RNA hybridization, hemagglutination assay, titration of infectious virus and immunofluorescence as methods for monitoring influenza virus replication *in vitro*. *J Virol Methods.* **74**(1):57-66.
- Romanova J *et al.* (2003). Distinct host range of influenza H3N2 virus isolates in Vero and MDCK cells is determined by cell specific glycosylation pattern. *Virology.* **307**(1):90-7.
- Ruigrok RW *et al.*, (1984) Characterization of three highly purified influenza virus strains by electron microscopy. *J. Gen. Virol.* **65** ( Pt 4):799-802.
- Russell RJ, *et al.* (2008) Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **105**(46):17736-41.
- Saito T *et al.* (1995) Steps in maturation of influenza A virus neuraminidase. *J. Virol.* **69**(8):5011-7.
- Santiago N. (Compilador). (2004).Combinatoria molecular. Ed. Elfos Scientiae. La Habana, Cuba. 450 p.
- Sarachai C. *et al.*, (2007). Avian Influenza Virus (H5N1) Inactivation by Binary Ethylenimine. *Thai J. Vet. Med.* **40**(1): 41-46.
- Sauter NK *et al.*, (1992). Crystallographic detection of a second ligand binding site in influenza virus hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**(1):324-8.
- Schepetkin IA *et al.*, (2006). Novel small-molecule inhibitors of anthrax lethal factor identified by high-throughput screening. *J. Med. Chem.* **49**(17):5232-44.
- Schwarzer J (2009). Glycan analysis in cell culture-based influenza vaccine production: influence of host cell line and virus strain on the glycosylation pattern of viral hemagglutinin. *Vaccine.* **27**(32):4325-36.
- Smith B. J. *et al.* (2006). Structure of a calcium-deficient form of influenza virus neuraminidase: implications for substrate binding. *Acta Cryst. Section D.* **62** (Part 9): 947-952.
- Szymański P *et al.*, (2011). Adaptation of high-throughput screening in drug discovery-toxicological screening tests. *Int. J. Mol. Sci.* **13**(1):427-52.
- Tai C *et al.*, (1998) Characterization of human influenza virus variants selected *in vitro* in the presence of the neuraminidase inhibitor GS 4071. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**(12):3234-41.
- Takemae N *et al.* ( 2009 ). Alterations in receptor-binding properties of swine influenza viruses of the H1 subtype after isolation in embryonated chicken eggs. *J. Gen. Virol.* **91**(Pt 4):938-48.
- Téllez-Valencia *et al.* (2002) Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **295**(4):958-63.
- Tellier R (2006). Review of Aerosol Transmission of Influenza A Virus. *Emer. Infect. Dis.* **12** (11).
- Tennant G (2001). Six Sigma: SPC and TQM in manufacturing and services. Gower Publishing, Ltd., 2001.140 p .UK
- Thacker E *et al.*, (2008) Swine influenza virus: zoonotic potential and vaccination strategies for the control of avian and swine influenzas. *J. Infect. Dis.* **197** Suppl 1:S19-24.

- Tree JA *et al.*, (2001) . Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. *Vaccine*. **19**(25-26):3444-50.
- Tyrrell DA y Valentine RC. (1957) The assay of influenza virus particles by haemagglutination and electron microscopy. *J Gen Microbiol*.**16**(3):668-75.
- UniProtKB/Swiss-Prot: Swiss-Prot Protein knowledgebase , TrEMBL . ExPASy Proteomics Server .The ExPASy (Expert Protein Analysis System) proteomics server of the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) <http://www.expasy.org>
- van der Valk J *et al.* (2004) The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicol In Vitro*. **18**(1):1-12.
- Voet, D. y Voet, J. (1992) Bioquímica. Ed. Omega. Barcelona, España. 1315pp
- Wagner R, *et al.* (2000). Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J. Virol*. **74**(14):6316-23.
- Ward CL *et al.* (2004) Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. *J Clin Virol*. **29**(3):179-88.
- Watson K *et al.*, (2004). Highly potent and long-acting trimeric and tetrameric inhibitors of influenza virus neuraminidase. *Bioor. Med. Chem. Let*. **14** (6): 1589-1592.
- Wessman SJ *et al.*, (1999). Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production. *Dev. Biol. Stand*.**99**:3-8.
- WHO (2007). Use of Cell Lines for the Production of Influenza Virus Vaccines: An Appraisal of Technical, Manufacturing, and Regulatory Considerations. Initiative for Vaccine Research.
- WHO (OMS) (2002). WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Geneva, World Health Organization
- WHO (OMS) (2009). Weekly epidemiological report. No. **36** (84) : 361-372.
- WHO (OMS) (2010). WHO Summary of influenza antiviral susceptibility surveillance findings, September 2010 - March 2011. The WHO Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS).
- WHO(2006). A review of production technologies for influenza virus vaccines, and their suitability for deployment in developing countries for influenza pandemic preparedness. Initiative for Vaccine Research.
- Wu ZL *et al.* (2009) Active 1918 pandemic flu viral neuraminidase has distinct N-glycan profile and is resistant to trypsin digestion. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **379**(3):749-53.
- Yoshimoto J *et al.*, (1999). Identification of a novel HA conformational change inhibitor of human influenza virus. *Arch. Virol*. **144**(5):865-78.
- Zang Z *et al.*, (2011) Identification of cavities on protein surface using multiple computational approaches for drug binding site prediction. *Struc. Bioinformat*. **27** (15): 2083–2088.