



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Estudio de Modelación Molecular y Síntesis de

Compuestos con Actividad Viricida

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUIMICO

PRESENTA

Jonathan Martin Benítez Ramírez

MÉXICO, D.F.

AÑO 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Marta Eugenia Albores Velasco

VOCAL: Dra. Roció Pozas Horcacitas

SECRETARIO: Dr. Carlos Antonio Rius Alonso

1er. SUPLENTE: Quim. Alejandrina Acosta Huerta

2° SUPLENTE: M. en C. Marta Yolanda González Quesada

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 204,

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA,

CIUDAD UNIVERSITARIA.

Contenido

INTRODUCCIÓN	6
Gripe Española.	8
Influenza Asiática.....	9
Influenza de Hong Kong	10
Influenza H1N1 2009	11
Estructura del virus.	14
Estructura del genoma.....	15
I.-IDENTIFICACION DE LA CÉLULA <i>HUESPED</i>	16
II.- ENTRADA DEL VIRUS A LA CÉLULA.	18
III. Síntesis de RNA viral, proceso de varios pasos.	18
IV SINTESIS DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE.	19
V Formación de el virion y expulsión.	20
HEMAGLUTININA Y SUS FUNCIONES.....	21
NEURAMINIDASA.....	22
M2 CANAL IÓNICO	23
PB1-F2.....	24
PB2.....	24

NS1.....	24
Deriva antigénica.....	25
AMENAZAS ACTUALES, VIRUS H1N1 Y H5N1.....	25
DOCKINGS.....	30
.....	32
.....	32
.....	32
Dockings con la Neuraminidasa.....	37
Síntesis de antivirales.....	45
JUSTIFICACIÓN.....	50
HIPÓTESIS.....	51
OBJETIVOS.....	51
Obtención del [2-(ciclohexilamino) etil]dimetilamina.....	52
Obtención de [2-(ciclohexilamino) etil]dietilamina.....	52
Obtención de tert-butil N-[2-(ciclohexilamino)etil]carbamato.....	53
Obtención de etil-ester-5-((dimetilamino)etil)amino-4-acetilamino-3-(1-etilpropoxi)cyclohexeno-1-ene carboxílico.....	53
Obtención de etil-ester-5-((dietilamino)etil)amino-4-acetilamino-3-(1-etilpropoxi)cyclohexeno-1-ene carboxílico.....	54

Etil-4-acetamido-5-((tertbutoxycarbonil)amino)-3-(pentan-3-iloxy)ciclohex-1-encarboxilato)	54
Material Usado.....	55
Equipo.....	56
Discusión de Resultados	56
RESULTADOS OBTENIDOS DE AUTODOCK VINA	66
<i>Conclusiones</i>	74
Bibliografía.....	75

INTRODUCCIÓN

El Oseltamivir es un medicamento antiviral. Sirve para tratar infecciones por el virus de la influenza. Su efectividad se ha perdido en los últimos años por alteraciones en el genoma del virus impulsando la búsqueda de nuevos medicamentos. La modelación molecular se está usando para encontrarlos pero hasta la fecha no se ha logrado este hecho, haciendo la búsqueda un tema de investigación actual. [1, 2, 3, 4,5, 6].

En este trabajo se llevó a cabo un estudio de *docking* usando modelación molecular en base a este se propuso la síntesis de tres derivados de Oseltamivir para recuperar la efectividad. El método para desarrollar los derivados fue probado primero usando la ciclohexilamina con los siguientes compuestos:

- 1.- Clorhidrato de 2-cloro-N,N-dimetiletilamina.
- 2.- Clorhidrato de 2-cloro-N,N-dietiletilamina.
- 3.- Clorhidrato de 2-cloroetilamina.

Luego este método se usó con el Oseltamivir para obtener los 3 derivados siguientes:

- Etil-ester-5-((dimetilamino)etil)amino-4-acetilamino-3-(1-etilpropoxi)cyclohexano-1-ene carboxílico
- Etil-ester-5-((dietilamino)etil)amino-4-acetilamino-3-(1-etilpropoxi)cyclohexano-1-ene carboxílico
- Etil-ester-5-((terbutoxicarbonilamino)etil)amino-4-acetilamino-3-(1-etilpropoxi)cyclohexano-1-ene carboxílico.

A los compuestos se les hizo un *docking* para ver su efectividad y se explicó los factores que hacen que, unos derivados sean más efectivos que otros.

MARCO HISTORICO

Gripe Española.

Los daños causados por el virus de la influenza de 1918, fueron los más catastróficos que se ha tenido historia. El número de muertes fue de 40-50 millones. La esperanza de vida se redujo 10 años y más de 500 millones de personas fueron infectadas, principalmente personas menores a 65 años, poco comunes en los virus de la influenza [7, 8, 9, 10].

El origen geográfico de la influenza española no se conoce con mucha precisión. Existen varias teorías sobre el origen del virus la más convincente de todas fue propuesta por Jordán, basada en los informes de alerta escritos por el doctor Loring Miner, en el diario *Public Health Reports*. [15,16,17,18].

La biología molecular en ese tiempo no existía y no se pudo desarrollar una vacuna. Lo cual hizo que el número de muertes fuera muy alto. Tuvo tres apariciones, la primera fue de febrero a marzo con pocos casos de contagio. La segunda fue de septiembre a diciembre, siendo la más devastadora porque fue cuando se presentó el pico más alto de muertes por contagio. Y la tercera fue en enero de 1919 con muertes escasas [19, 20].

Se transmitió de los humanos a los cerdos, también tres veces seguidas en un año. La forma de propagarse de este virus, varias veces en un año, contrasta con la forma normal de propagación del virus, una vez al año. Algunos investigadores piensan que las tres temporadas se debieron a características de su genoma.

Pasaron alrededor de 15 años para aislar el virus de la influenza de 1918 con los trabajos de Smith, Andrewes y Laidlaw [21]. Las características genéticas del virus aún son temas de investigación porque tratan de identificar el gen responsable de la aparición repetida de los virus.

Influenza Asiática.

El virus de la influenza asiática, fue el segundo virus causante de una pandemia. Surgió por primera vez en una pequeña localidad de China, expandiéndose rápidamente a Singapur y Hong Kong, puntos donde se dispersarían a diferentes partes del mundo.

La pandemia surgió por el brote de un nuevo virus, producto de una recombinación genética entre dos tipos de virus: uno de origen aviar y uno de origen humano [21]. Como resultado de la recombinación, sus glicoproteínas de superficie presentaban nuevas características nunca vistas en las otras influencias. Una de ellas fue que permitió a las glicoproteínas, usar a los humanos para su propagación y transmisión.

La pandemia se presentó una sola vez sin tener ningún tipo de réplica en meses posteriores, comenzó en el mes de octubre y finalizó en el mes de noviembre. En años posteriores la influenza pasó a formar parte de las influencias estacionales y actualmente ya no se encuentra en circulación. En los Centros de Control de Desastres de Estados Unidos tienen bajo resguardo algunas cepas de H2N2 [21].

Esta pandemia respondió muchas preguntas existentes sobre las manifestaciones de la influenza, una de ellas era la innecesaria co-actividad con bacterias para generar la muerte en las personas infectadas, siendo autosuficiente en el ciclo de infección. Hizo notorio que, para generar una influenza pandémica se necesitaban nuevos antígenos producidos por mutaciones.

A pesar de ser la segunda pandemia más devastadora creada por los virus de la influenza, dejó más respuestas que preguntas porque los estudios generados de la influenza servirían para poderlos aplicar en las próximas pandemias emergentes y tener una gama mayor de medidas a tomar [21].

Influenza de Hong Kong

El virus apareció por primera vez en Hong Kong en el mes de Julio de 1968, días después el virus arribó a Vietnam y Singapur. Cuando comenzó el mes de agosto el virus arribó a Filipinas, Australia, Europa y Estados Unidos. Para finales de diciembre el virus ya se había expandido por todo el mundo.

El impacto del virus en diferentes regiones fue muy diverso causando patrones extraños de infección y mortalidad: En Japón los brotes de la influenza fueron pequeños y dispersos, en Estados Unidos el virus provocó un número elevado de personas infectadas y un número alto de muertes asociadas pero en Inglaterra el número de infecciones fue alto con un bajo número de muertes.

De manera general se estima que el total de muertes por los virus de la influenza fueron de 1 millón, número inferior comparado con el de la pandemia de principio de siglo, porque ya había personas vacunadas contra el virus de la influenza [22].

Influenza H1N1 2009

En abril del 2009 surgió un brote de influenza en México y Estados Unidos. A principios de mayo del 2009 la Organización Mundial de la salud elevó el problema a una alerta de Salud Pública de nivel mundial. Para la segunda semana de mayo se confirmó la causa de las enfermedades, un virus proveniente de un triple arreglo, originado por recombinación de virus de cerdos americanos y virus de cerdos euroasiáticos. Debido a la propagación por todo el mundo, se elevó la alerta sanitaria a pandemia y los países tomaron diversas medidas para la contención y mitigación del virus [23].

Los daños provocados por el virus de la influenza fueron muy diversos. La Organización Mundial de la Salud determinó que el número de muertes por la influenza del 2009 fueron 18 000, pero los datos emitidos por los Centros de Control de Desastres de Estados Unidos reportaron 18 000 muertes solo en Estados Unidos. Además reportaron que los jóvenes presentaron tasas de transmisión altas y bajas tasas de muertes y adultos con tasas bajas de infección y tasas altas de fatalidad [24-27].

El reporte, *Assessment of the 2009 Influenza H1N1 Pandemic* [28], escrito por orden del Consejo de Seguridad de la Casa Blanca de Estados Unidos, estudió el

impacto de la influenza y características del virus en países seleccionados del Hemisferio Sur, por sus similitudes demográficas y económicas a Estados Unidos. Los países seleccionados fueron: Argentina, Chile, Australia, Nueva Zelanda y Uruguay. Se investigó las medidas de mitigación, la respuesta de los sistemas de salud, poblaciones más afectadas, impacto económico y usos de antivirales en los países. De manera general podemos decir que sufrió un decremento en su actividad en el mes de julio. Las personas más infectadas fueron personas con riesgos de salud severos y embarazo. Los estudios virológicos demostraron que tenía semejanza con el virus que circuló en Estados Unidos y los hospitales fueron poco afectados en su capacidad para responder a las demandas de hospitalizaciones y consultas.

La entrada del virus fue a finales de abril y principios de mayo. De forma parecida a los países del Hemisferio Norte, el virus se expandió rápidamente en pocos días. A mediados de julio se experimentó el pico más alto de infección, seguido de una disminución a finales de julio. El virus tenía una estructura semejante a la de Estados Unidos, por lo que la aplicación de la vacuna, desarrollada en Estados Unidos, no era riesgosa. El grupo de edad más vulnerable eran los niños menores de 4 años, que requirieron de más hospitalizaciones en comparación con los otros grupos.

Las medidas de mitigación y prevención tomadas en los diversos países fueron diferentes. Argentina optó por el cierre escuelas, medida que disminuyó la actividad. No se puede sacar el impacto total porque julio fue el mes de disminución de la actividad de forma global en todos los países. En las fronteras,

Chile, Australia y Nueva Zelanda tomaron medidas de contención más rigurosas usando el escaneo termal para detectar a pacientes contagiados con Influenza. Como mitigación se optó por el uso de Oseltamivir debido a que los virus no tenían mutaciones que disminuyeran la efectividad del medicamento. Fue administrado a pacientes con riesgos severos, mujeres embarazadas y personas infectadas. Argentina fue el país más afectado económicamente, porque reportó la pérdida de 1 billón de dólares en ventas al por menor, cancelación de vuelos e interrupción de eventos sociales [28].

Biología Del Virus

Estructura del virus.

La superficie del virus de la influenza tiene tres tipos de proteínas: la Hemaglutinina, que introduce el material genético del virus en la célula; la Neuraminidasa, que participa en el proceso de corte de los receptores de la célula y el canal iónico M2, que permite el paso de iones hidrogeno al interior de la célula. En la superficie del virus de influenza B solo se encuentran dos tipos de proteínas, la NB, que funciona de canal iónico y la HB que funciona como Neuraminidasa y Hemaglutinina a la vez. El virus de la influenza C tiene un solo tipo de proteína, la HEF, realiza funciones parecidas a la Hemaglutinina y Neuraminidasa de manera simultánea. En la Figura 1 se muestra una estructura de la influenza A, marcando como está en la superficie.

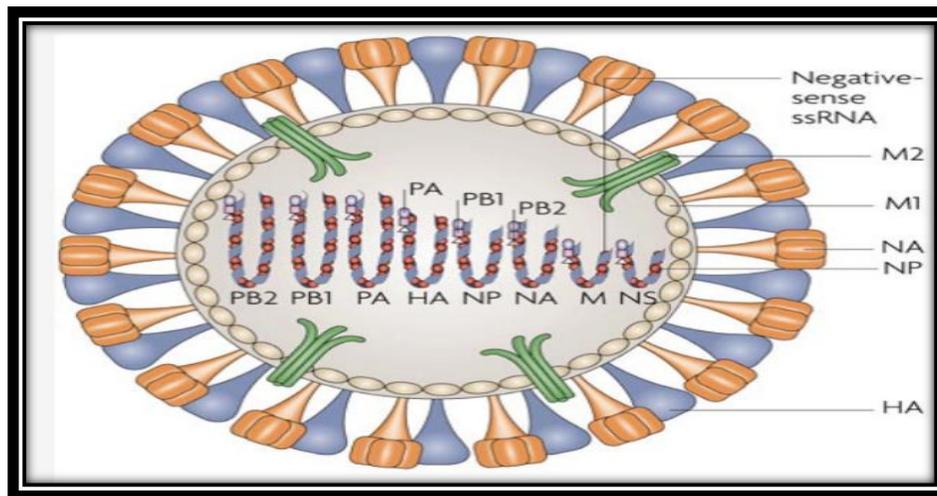


FIGURA 1 ESTRUCTURA DEL VIRUS DE LA INFLUENZA. EN LA SUPERFICIE SE ENCUENTRAN LAS PROTEÍNAS HA, M2 Y NA, CERCA DE LA SUPERFICIE SE ENCUENTRAN LAS PROTEÍNAS M1, MÁS ADENTRO PODEMOS UBICAR LAS RIBO NUCLEOPROTEÍNAS Y LAS PROTEÍNAS PA, PB1 Y PB2.

En el interior del virus, la proteína más cercana a la superficie es la proteína M1, evita que las ribo-nucleoproteínas emerjan del virus hasta que exista un cambio de pH. Después de la proteína M1, se encuentra la ribo-nucleoproteína (RNP), encargada de pasar el material genético al núcleo de la célula huésped para formar nuevos viriones. Junto a la RNP, encontramos la RNA polimerasa, un homo-trímero compuesto por tres tipos de proteína: PB1, PB2 Y NA, encargadas de duplicar el RNA.

Estructura del genoma

Los genomas de los virus de influenza A y B están formadas por ocho segmentos de RNA, con polaridad negativa y se enumeran en base a su extensión. El genoma del virus de influenza C tiene siete segmentos de polaridad negativa porque tiene menos proteínas de superficie debido a la proteína HEF, que realiza las actividades de las enzimas Hemaglutinina y Neuraminidasa. Cada segmento de los tres tipos de virus de la influenza tiene un tamaño de 2,350 nucleótidos para los segmentos más grandes y un tamaño de 890 nucleótidos para los más cortos. El genoma, en total, tiene 13,600 nucleótidos que codifican para once proteínas virales [29] [30][31]]. El tamaño relativo de los segmentos de RNA se puede ver en la Figura 2.

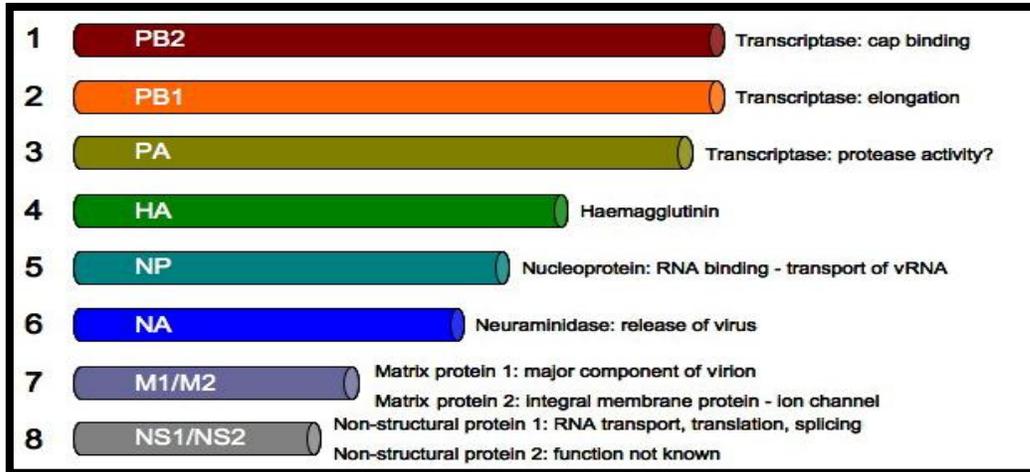


FIGURA 2 ESTRUCTURA DEL GENOMA DE VIRUS DE LA INFLUENZA A. EL GENEOMA ESTÁ DIVIDIDO EN 8 PARTES, CADA PARTE CODIFICA PARA UNA PROTEÍNA EN ESPECÍFICO, LA PB2 TIENE LA FUNCIÓN DE PONER LA CABEZA A UN RNA SECUESTRADO DE LA CÉLULA PARA REPLICACIÓN DEL GENOMA DEL VIRUS, LA PB1 AYUDA EN LA ELONGACIÓN, PA ES DESCONOCIDA SU ACCIÓN, HEMAGLUTININA UNE AL VIRUS A LA CÉLULA, NA, M1, NS1 ENCARGADAS DE LA INFECCIÓN A LA CÉLULA.

CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIRUS DE LA INFLUENZA

I.-IDENTIFICACION DE LA CÉLULA *HUESPED*.

El ciclo de transmisión comienza con la expulsión del virus, a través de la tos, gripe o platica, que encapsulan al virus en forma de pequeñas gotitas. Por el tamaño tan pequeño de estas, son absorbidas por la inhalación de las personas. Una vez adentró, estas buscan unos receptores específicos llamados proteoglicanos.

Los síntomas del virus de la influenza tardan en aparecer de tres a siete días y la invasión en el pulmón puede tardar hasta un mes. Como el tiempo de aparición de los síntomas es largo, genera que las personas infectadas estén contagiando a

más personas sin ni siquiera notarlo. Por esta razón una de las medidas tomadas es el aislamiento y cuarentena de la personas de lugares públicos [29-31].



FIGURA 3 SÍNTOMAS COMUNES DE LA INFLUENZA EXPERIMENTADOS EN LA PRIMERA SEMANA.

Seguido de la entrada del virus a la nariz, el virus comienza a buscar células que pueda infectar. El antígeno Hemaglutinina es el encargado de iniciar la infección, uniéndose a moléculas de ácido siálico ubicadas sobre la superficie de células de mucosas nasales y faringe. En esta etapa se inicia la infección de la célula [29-31].

II.- ENTRADA DEL VIRUS A LA CÉLULA.

La iones hidrógeno son cruciales para la entrada del virus en la célula. Después de la unión de la Hemaglutinina con el receptor, sigue un proceso de endocitosis del virus. La iones facilitan la endocitosis de la célula. También provocan que la Hemaglutinina sufra un cambio conformacional, para que el péptido de fusión salga de la estructura y una la membrana endosoma de la célula con la del virus. Además ayudan a la liberación de las ribonucleoproteínas (RNP) en el interior del virus. Al entrar por los canales ionicos M2 ubicados en la superficie celular, producen un cambio de pH, favoreciendo la perdida de interacción de las ribonucleorportienas con las proteínas M1, haciendo la trasferencia de las proteínas al interior de la celula sea rápida [29-31].

III. Síntesis de RNA viral, proceso de varios pasos.

Las ribonucleoproteínas buscan al núcleo mediante sus señales de localización. En el nucleo las ribonucleoproteinas secuestran la RNA polimerasa de la celula y la utilizan para sintetizar más RNA. Para hacerlo comienzan con la separación de los componentes de la ribonucleoproteina: RNA, PB1,PB2, NP1,NP2 y NEP. el RNA obtenido por la separación, es utilizado de molde para sintetizar cadenas de RNA complementarias al RNA molde. Cuando se terminan de sintetizar la cadenas complementarias se libera la cadena molde y las cadenas sintetizadas ocupan el lugar de la cadena molde, para sintetizar más cadenas de RNA, convirtiendose en cadenas molde.

Para sintetizar cadenas nuevas de RNA, NP1 Y NP2 secuestran y cortan cadenas de RNA de la celula en dos partes, unas que contienen RNA con cabeza y la otras contienen RNA con cola. Las partes con cabeza son transportadas por las proteínas NP1 y NP2 por tener segmentos iniciadores para sintetizar más cadenas de RNA. Cuando estos segmentos de RNA son puestos en la RNA polimerasa comienza la síntesis de más cadenas de RNA. Estas tienen una secuencia igual a la primera cadena de RNA, usan de molde. El final llega cuando se copia un segmento de 5 uracilos que sirven de cola. Terminando de sintetizar la cola se despegan de la RNA polimerasa y se van a la pared del núcleo, donde se une con las proteínas NP1, NP2, PB1, PB2, formandose nuevas ribonucleoproteínas. Seguido de la formación se da la exportación total de las nuevas ribonucleoproteinas y es la etapa donde finaliza el proceso de síntesis de RNA [29-30].

IV SINTESIS DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE.

Las proteínas se sintetizan en el retículo endoplasmático. Cuando las ribonucleoproteínas salen del núcleo tienen dos caminos, el primero de ellos es llegar al retículo endoplasmático y el segundo es dirigirse a la superficie celular. En el retículo endoplasmático se unen al ribosoma y este va usar los nucleótidos de la Ribonucleoproteinas para transformarlos a una cadena de aminoácidos (estructura primaria de las proteínas). Cuando terminan de convertir la cadena de RNA en

aminoácidos, se separa esta secuencia de aminoácidos del ribosoma y se van al Aparato de Golgi donde se pliegan (adquiriran su forma estructural) [29-30].

V Formación de el virion y expulsión.

La formación del virion requiere un proceso de maduración. Las proteínas terminan su etapa de maduración en el Aparato de Golgi (plegamiento y cortes) y se dirigen a la superficie celular para ser reunidas con las ribonucleoproteínas. El encargado de unir las proteínas con las ribonucleoproteínas es la proteína M1. Después de la unión, M1 comienza un proceso de germinación para la extraer el virus, llevándose una parte de la membrana celular. Esta parte extraída se convertirá en la membrana del virus.

La etapa final de la expulsión total del nuevo virus de la superficie, es mediante la Neuraminidasa, encargada de romper los enlaces formados de los receptores con las Hemaglutinina de los nuevos virus.

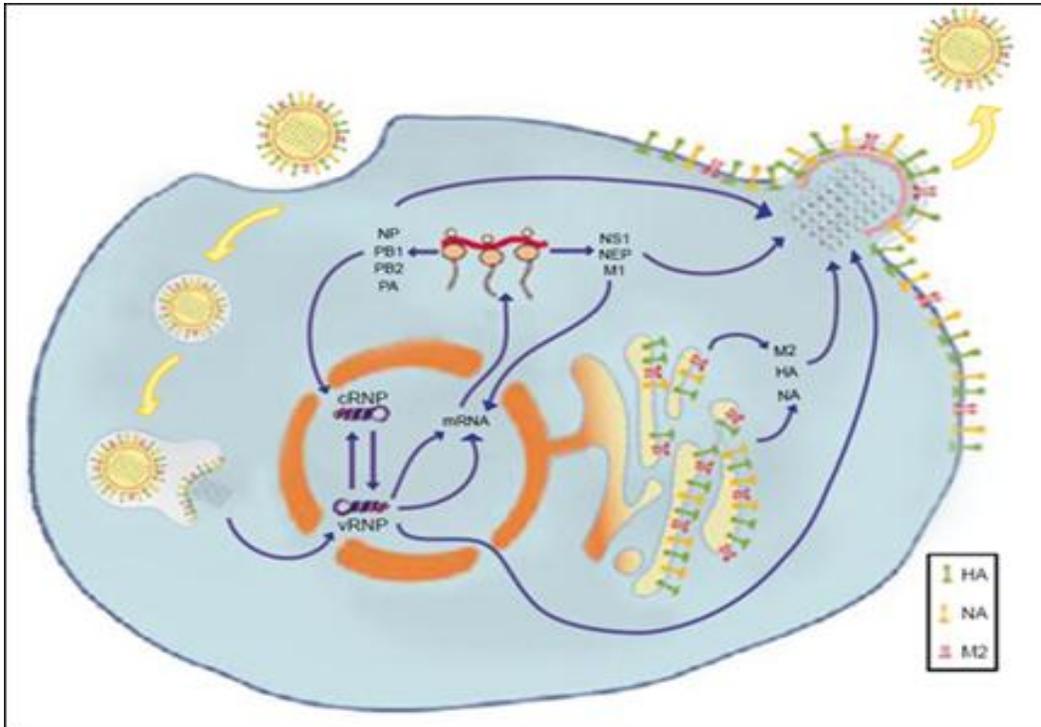


Figura 4 el ciclo de Infección del virus comienza con la unión del virus a la célula mediante la hemaglutinina, luego surge una endocitosis (la formación de un hueco de la célula del lado superior izquierdo de la imagen) para que entre la célula al citoplasma, lugar donde es transportado al núcleo para síntesis de más copias de RNA del virus, después estas copias van a ser transportadas al retículo endoplasmático para sintetizar más proteínas. Una vez sintetizadas las copias de RNA y proteínas van a emerger a la superficie donde la proteína M1 va a ser la encargada de reunir todas las partes y atravesar la membrana interior (germinación) y luego la Neuraminidasa va a ser la encargada de que se desprenda de la célula. Ciclo de replicación del virus de la influenza A, Raquel Almanza http://epidemiologiamolecular.com/wp-content/uploads/2012/10/clip_image012.png

HEMAGLUTININA Y SUS FUNCIONES.

La Hemaglutinina es una de las proteínas encontradas en la superficie, es responsable de los procesos de fusión e interiorización del material genético del virus en la célula huésped. Se ha observado que dependiendo la especie a atacar, el virus tiene aminoácidos diferentes, por ejemplo, las hemaglutinina H3 de especies aviares, tienen residuos de Aspartato y Glicina en la posición 226 y 228, pero las hemaglutinina H3 de especies humanas tienen residuos de Serina y de

Leucina en esas posiciones, para Hemaglutinina H1, de origen aviar, los residuos de Ácido Glutámico y Glicina están en las posiciones 190 y 225, pero para H1 de origen humano hay residuos de Ácido Aspártico en estas posiciones.

Se conoce como proteína de neutralidad del virus, porque aglomera eritrocitos, por una proteína llamada Glicoforina, que es poli-proteína con un alto contenido de ácido siálicos. La estructura de la hemaglutinina está compuesta en la cabeza por hojas B anti paralelas y hélices alfa. La parte central tiene hélices alfa y hojas beta anti paralelas en menor proporción. [33]

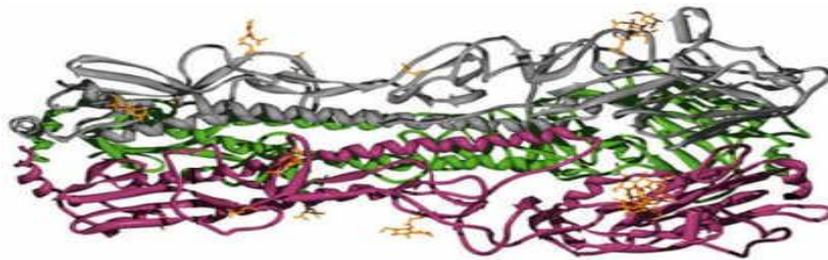


FIGURA 5 Trímero de Hemaglutinina. En ella se observa que está compuesta por cadenas alfa helicoidales principalmente y algunos segmentos están en plegamiento beta. [HTTP://WWW.SCIENTIFICPSYCHIC.COM/HEALTH/HEMAGGLUTININ.JPG](http://www.scientificpsychic.com/health/hemagglutinin.jpg)

NEURAMINIDASA

La Neuraminidasa tiene funcionalidad sialiadasa, rompe las uniones sialicas de la célula. Este rompimiento otorga al virus capacidad de desprenderse de la membrana celular.

La Neuraminidasa funciona como transporte del virus en las células epiteliales de la nariz, por la ruptura de las uniones ácido Siálico-Hemaglutinina. Por esto es el

objetivo de encontrar compuestos activos que la inhiban para reducir su avance a través de la tráquea. Hasta ahora se ha investigado una gama de moléculas como posibles candidatos a inhibir la Neuraminidasa pero muy pocas cuentan con la aprobación para ser utilizada en la profilaxis del virus entre ellos están: el Oseltamivir producido por Roche y el Relenza o Zanamivir, producido por Glaxo Smith Kline [33].



FIGURA 6 Estructura terciaria de la Neuraminidasa obtenida con Autodock. En ella se presenta los plegamientos beta con los que está formado.

M2 CANAL IÓNICO

El canal iónico trans-membrana permite el paso de iones hidrógeno para la disociación del ribonucleoproteínas, lo que permite al RNA pasar al núcleo de la célula para su posterior replicación.

Existe también una gama de antivirales diseñados para inhibir la funcionalidad de M2, conocidos como adamantos virales, de los cuales solo se han aprobado por la FDA amantadina y Rimantidina. En los últimos años se ha encontrado resistencia por parte de los virus a este tipo de antivirales, haciendo que ya no se usen más.

Como ejemplo de virus con resistencia a este tipo de antivirales está el virus H1N1 del 2009.

PB1-F2.

PB1-F2 es una proteína interesante, hablando de patogenicidad. La inserción de estas proteínas en la mitocondria, provocan muerte celular por apoptosis. Además aumenta la severidad de las neumonías una vez infectadas las células [33].

PB2.

La PB2 es la encargada de aumentar la transmisión y la replicación del virus. Ciertas modificaciones marcan inclusive hasta el grado de reproducibilidad y transmisión. Por ejemplo se ha visto que residuos en la posición 627 de Aspartato en la PB2 mejoran la reproducibilidad comparados con residuos de lisina [33] [34].

NS1.

La NS1 también eleva el grado de patogenicidad del virus, ayuda a bloquear las señales de transcripción estimulantes de la funcionalidad del interferón. Es una proteína dimérica unida al RNA de la célula, cuya función es modular la respuesta del interferón de célula [33] [34].

Deriva antigénica.

El genoma está compuesto de RNA y es propenso a sufrir mutaciones. Como el RNA no tiene mecanismos de corrección es frecuente encontrar mutaciones puntuales de nucleótidos en el proceso de duplicación de RNA. Dichas mutaciones puntuales se les conoce con el nombre de *shift*. Cuando se presenta este cambio en la Hemaglutinina o en la Neuraminidasa se generan virus resistentes y los antivirales dejan de ser efectivos. Estos antivirales fueron diseñados para formar enlaces no covalentes con el virus por formación de puentes hidrogeno, por lo tanto se pierde su efectividad convirtiendo al virus en una amenaza pandémica.

En cambio cuando el virus entra en especies mamíferas como el cerdo, reservorio de otros subtipos de influenza, intercambia su material genético con otros virus de Influenza, generando nuevas especies que no son reconocidas por la respuesta inmune. Convirtiéndose con facilidad en epidemias o pandemias. Un virus resultado de un rearreglo genético fue precisamente la gripe de Hong Kong que desplazó a la Gripe Asiática y provocó la pandemia de ese año [33-34]

AMENAZAS ACTUALES, VIRUS H1N1 Y H5N1

El creciente número de casos, de personas contagiadas por el virus de influenza H5N1, ha marcado el posible surgimiento de una nueva pandemia [35]. El virus de la Influenza H5N1 es totalmente distinto al virus de influenza H1N1. Este virus es una cepa encontrada normalmente en especies aviares, debido a su

Hemaglutinina, que se une a receptores específicos por un enlace β 2-3 de los monómeros de azúcar del receptor de la célula.

El virus H5N1 surgió por primera vez en 1996 en una provincia China, Guangdong y mató a millones de gansos. Su aparición no fue considerada importante hasta la detección de aves de consumo con signos de contagio, provocando el contagio de 9 personas. Las autoridades sanitarias ordenaron la matanza de aves contagiadas. Por alguna razón el contagio se transmitió a unas aves que vivían en el lago de Qinghai. Las aves del lago son migratorias y provocaron la expansión del virus a Europa, Indonesia y África. Los mercados de aves europeos después comenzaron a presentar la enfermedad. Se realizó el aislamiento y sacrificio de aves en Europa para evitar la transmisión a más aves, pero las aves de los lagos y de hábitat silvestre de la región se contagiaron, generando un problema grave porque a pesar de estar tomando normas estrictas para aves de consumo, las aves silvestres seguían contagiando a las de consumo. Como las aves silvestres no fueron vacunadas, surgieron recombinaciones que contagiaron a aves de consumo a pesar de estar vacunadas.

Se ha descrito recientemente que el virus H1N1 tiene mutaciones y vuelven al virus más peligroso. Los pacientes encuentran que los antivirales no son efectivos. Las causas generadoras de mutaciones son muy diversas, la causa principal es el mal uso del Oseltamivir como se demostró en Japón en 2004.

Las mutaciones son detectadas por diversos métodos, los más usados son el análisis estructural y estudios de PCR (reacciones de polimerasa) una técnica sintetizadora de cadenas de RNA complementarias del virus, mediante técnicas

especiales de identificación, detectan los codones presentes en el RNA. De esta forma se descifra la secuencia de aminoácidos formadores de proteínas y se detectan cambios con respecto a una cadena estándar de RNA que no presenta modificaciones. Entre las mutaciones frecuentemente encontradas fueron las mutaciones: R292K, una mutación implicada en el cambio de un residuo de Aspartato por un residuo de Lisina, N294S, Asparagina por Serina y H274K, Histidina por Lisina. Las mutaciones evitan el contacto entre los residuos de Glutamato 276 y el Aspartato 224, esenciales para el grupo grande hidrofóbico de la estructura del Oseltamivir haga contacto con el sitio activo. A continuación se muestra una tabla que describe todas las mutaciones encontradas así como una breve característica de sus consecuencias fenotípicas y las referencias para que poder ver directamente del artículo o reporte de donde fue tomado.

	Posición del aminoácido/ Motivo	Consecuencias Fenotípicas	Virus del H5N1	Referencia	PMID
Mutaciones encontradas en los virus de la influenza H1N1 y H5N1	Eliminación del segmento 49-68	Mejora la virulencia del virus	Es encontrado en los virus circulantes	Matsuoka. Et.al.,2009; Zhou et.al.,2009	19225004 19609439
	Val96Ala(16 in N2)	Se reduce la susceptibilidad a Oseltamivir y Zanamivir		Hurt et al.,2007;Boltz et al.,2010;Ilyushina et al.,2010	17112602 20016836 20523902
	Ile97Val (117 in N2)	Reduce la susceptibilidad a Oseltamivir		Hurt et al.,2007;Ilyushina et al., 2010;Le et al,2008	1711602 20523902 18836532
	Glu99Ala/Gly/V	Reduce la susceptibilidad a		Ilyushina et.al 2010;	205239

	al(119 en N2)	Zanamivir y Oseltamivir		Hurt et al, 2009; Pizorno et al, 2011; Abres et al.	02 223790 77 196519 08 211484 93 173023 66
	Gln116 Leu/Lys/Arg (136 N2)	Reduce la susceptibilidad al Oseltamivir		Hurt et al 2010;Okumo Aohiambo et al.,2009;Hurt et al.,2009	206031 55 199173 9 196410 0
	Val129Ala(149 en N2)	Reduce la susceptibilidad al Oseltamivir		Naughinn et al 2011	213434 50
	Arg136Lys	Reduce la		Ilyusha	213790

	(156 en N2)	susceptibilidad al Oseltamivir		2012	72
	Asp179Gly	Reduce la susceptibilidad al Oseltamivir y a Zanamivir		Hurt et al., 2009; Pizzorroet al, 2011.	196519 08 211484 93

Tabla 1 en ella se muestran las mutaciones más comúnmente encontradas en H5N1, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, influenza h5n1 genetics changes inventory.

DOCKINGS

El *docking* molecular es el estudio que puede predecir la afinidad de moléculas biológicamente activas como las proteínas, con moléculas candidatas a ser medicamentos, y tiene un papel importante en el diseño racional de fármacos.

La simulación del acoplamiento entre proteínas y fármacos calcula la energía total del sistema con diferentes movimientos conformacionales y se busca la conformación que tenga la menor energía y mayor interacción.

La manera de evaluar la afinidad de un ligando por un sitio activo es mediante unas funciones de energía, que calculan parámetros. Suelen ser enlaces, ángulos, rotaciones, interacciones electrostáticas e interacciones de Vander waals. Esos

cambios generan un potencial de energía cada uno y el conjunto global de estas genera una energía total.

La energía total nos dice si un "ligante" que es una molécula que se une a un sitio activo de una enzima se une de manera permanente o total y además nos puede hacer un escalamiento de que moléculas se unen mejor. La energía es una medida de afinidad de moléculas por un sitio activo.

Esta afinidad es necesaria para saber si ocurre la unión del ligante con el sitio activo y a la vez modifiquen la función de la enzima. En el caso de la influenza se estudia la unión de moléculas en el sitio activo de la Neuraminidasa. Esta le permite al virus viajar por todas las vías respiratorias hasta llegar al pulmón. A través de la unión de una molécula con el sitio activo se bloquea la función de la Neuraminidasa y el virus ya no puede llegar al pulmón, que en caso de llegar terminaría en daños alveolares irreparables que se pueden ocasionar la muerte de la persona por asfixia.

Los átomos del ligando y del sitio activo van a sufrir cambios cuando se unen. Si se estudian dos casos por separado: la unión de un ligando con la Neuraminidasa y la unión de un sustrato celular con la Neuraminidasa van a producir una energía potencial en cada caso. Si la energía del primer caso es mayor que la energía del segundo caso, el ligando va a preferir unirse al sitio activo y se bloqueara la

función del virus evitando que se una con el sustrato de la célula, paso indispensable para bloquear la función. La figura 7 ilustra este caso típico.

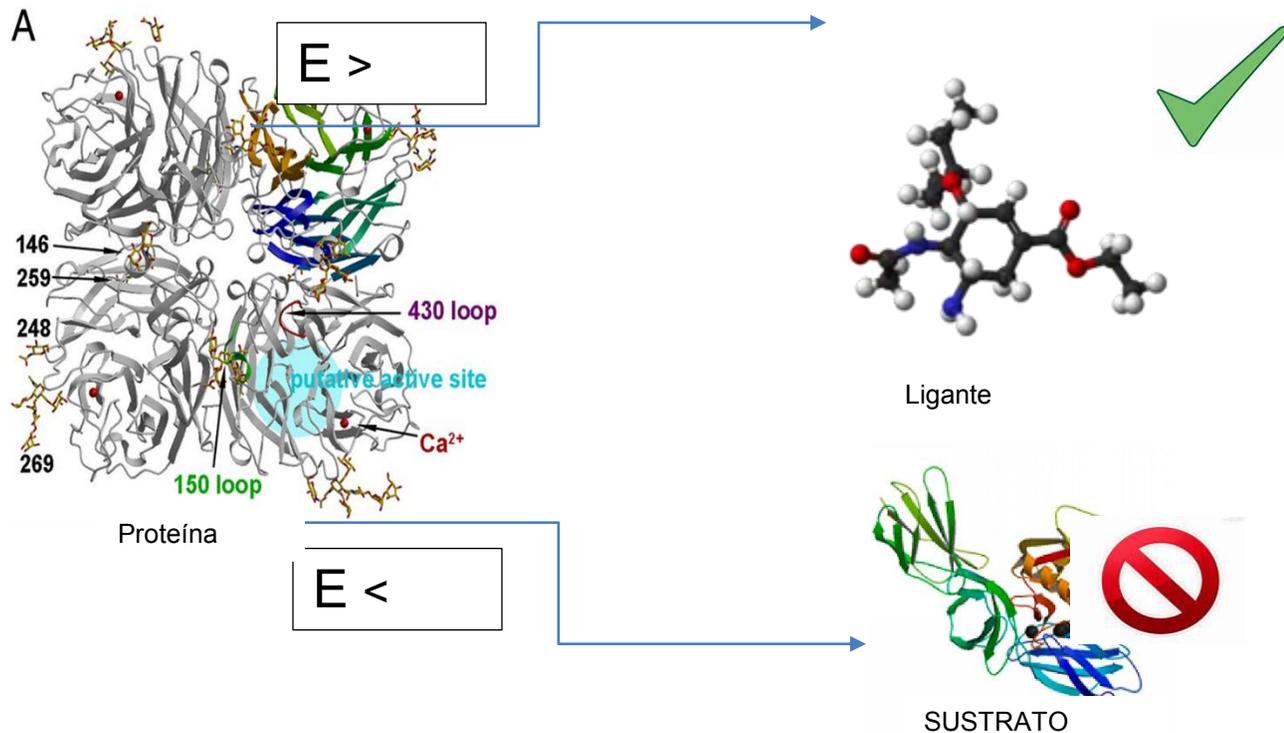


Figura 7 En ella se describe una situación en la que una enzima del virus prefiere unirse a el ligando porque contiene más energía potencial.

En la figura 7 se encuentra la situación real de la Neuraminidasa, cuando se tiene la elección de un ligando y el sustrato. Un sustrato es una molécula diseñada para unirse al sitio activo del virus que es sintetizada por la célula. Si la unión del ligando y la Neuraminidasa tiene una energía que supera la otra unión la Neuraminidasa se unirá al ligando y así se eliminará al virus del organismo ya que no puede duplicarse para generar descendencia.

Los tipos de energía potencial evaluados son los siguientes:

- Energía potencial elástica: Calcula como se modifican los enlaces y ángulos de las moléculas y sitio activo a fin de producir una situación en la que estén juntas ó separadas. Esto va a generar una energía potencial diferente.
- Energía potencial eléctrica: Se calcula a partir de las cargas de los átomos individuales. Según la ley de coulomb si se aproximan dos cargas tendrán un estado que tenga una energía diferente de la que tienen cuando están separadas. De este modo mediante las cargas de los átomos involucrados en una interacción se van a calcular las energías potenciales eléctricas.

La primera función de energía potencial va a calcular como cambian los enlaces

$$E1 - E2 = \int_1^2 F dx$$

Esta función evalúa el cambio de energía al modificar la distancia de los enlaces de los átomos. Si esa modificación produce una energía potencial menor a la de su estado inicial entonces el sistema tendrá preferencia por estar en este estado final. Cuando se une el ligando con la Neuraminidasa, todos los enlaces tanto del ligando como de la Neuraminidasa van a sufrir cambios, si esos cambios producen un estado en el que la suma de esos cambios tenga una energía potencial menor con respecto a su estado inicial, provocara que el ligando se una a la enzima.

Por otro lado no es la única función tomada en cuenta, cuando se fuerza a unir el ligando y la Neuraminidasa, los ángulos de los enlaces se modifican por el cambio de la posición de los átomos y se debe calcular el cambio de energía de los ángulos por estos cambios. Para calcularla se consideran a los ángulos elásticos debido a que los ángulos de los enlaces por tener cierta configuración ya sea sp , sp^2 y sp^3 , solo pueden expandirse hasta cierto punto, esa restricción hace a los ángulos comportarse de acuerdo a la ley de Hooke y también pueden ser calculados esos cambios de ángulos por medio de una función de potencial similar a la utilizada para encontrar el cambio de los enlaces.

$$E1 - E2 = \int_1^2 F d\theta$$

Si al unir el ligando con la Neuraminidasa provoca un cambio en los ángulos que tenga menor energía potencial que cuando estaban separadas el proceso tendrá a mantener a las dos moléculas juntas.

Esta unión modifica los ángulos diedros también. Los ángulos diedros se forman mediante tres enlaces y son usados para describir una molécula. Se forma cuando el átomo 1 y 4 varían de distancia. La mejor manera de representar un ángulo diedro es mediante una proyección de Newman, se muestra abajo.

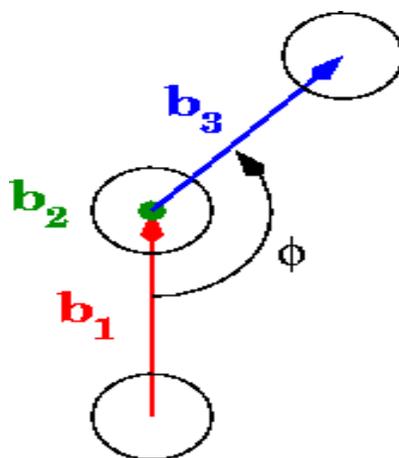


FIGURA 8 REPRESENTACIÓN DE UN ÁNGULO DIEDRO

Este ángulo se forma porque los átomos del centro son forzados a permanecer fijos mientras que los átomos 1 y 4 pueden rotar libremente. Cuando se aplica una fuerza para tener dos átomos en un ángulo diedro de cero grados la molécula tiene una energía potencial más alta que cuando los átomos están a un ángulo de 90 °. La manera de calcular la energía potencial de estos ángulos cambia totalmente porque se usa una función periódica que solo puede tomar ciertos valores de ángulos como parámetros. De esta forma, la energía está cuantizada; la función que se usa es la siguiente:

$$E_{\text{tors}}(\omega) = \sum_{n=1} V_n \cos(n\omega)$$

Finalmente se tienen que obtener la energía potencial electrostática, esta se calcula a partir de la energía potencial electrostática por la ley de Coulomb y una función conocida como Lener-Jones que calcula la energía potencial que se obtiene por las fuerzas de Van der Waals.

La aplicación de todas estas fuerzas produce una energía global potencial que es la que determinará si es posible la unión de un ligando con la Neuraminidasa o no. La contribución de la energía global es la siguiente:

$$E = E_{\text{estiramiento}} + E_{\text{ángulos}} + E_{\text{estiramiento fuera del plano}} + E_{\text{Van-der-Waals}} + E_{\text{fuerzas electrostaticas}}$$

Si la energía global potencial del estado en que las moléculas están juntas es más grande que cuando está separado el proceso es espontaneo y ocurrirá. La Energía de Gibss se define de la siguiente manera:

$$\Delta G = \Delta H - \Delta ST$$

En la que ΔH es la entalpía, y ΔS es la entropía. A presión y volumen constante.

La entalpía puede ser igualada a la energía de conservación:

$$\Delta H = \Delta U$$

Si trabajamos a entropía constante la energía de Gibbs será igual a la energía potencial, por tanto podemos calcular si el proceso es espontáneo con la pura energía potencial. Las ecuaciones descritas en la sección han sido modificadas con la finalidad de describir mejor los procesos [38].

Dockings con la Neuraminidasa.

Varios factores van a determinar qué tan bien se efectúa la interacción ligando-receptor: Las estructuras y grupos funcionales de los ligandos. Estos van formar interacciones con los aminoácidos de la Neuraminidasa. Estas interacciones son importantes porque van a permitir un cambio conformacional donde se tenga una energía potencial menor, permitiendo la unión del ligando a la Neuraminidasa. Suelen considerarse interacciones electrostáticas, interacciones de van der Waals y formación de puentes de hidrógeno con los aminoácidos. Cuando se forman estas interacciones existe una menor energía potencial y por tanto el proceso es espontáneo indicando que el ligando se unirá a la Neuraminidasa.

.Z.Yang [39] vio que la estructura es la que determina que tan buena se haga la unión de la molécula con el sitio activo. Para determinar la importancia de la estructura diseñó 9 moléculas que se muestran en la figura 9.

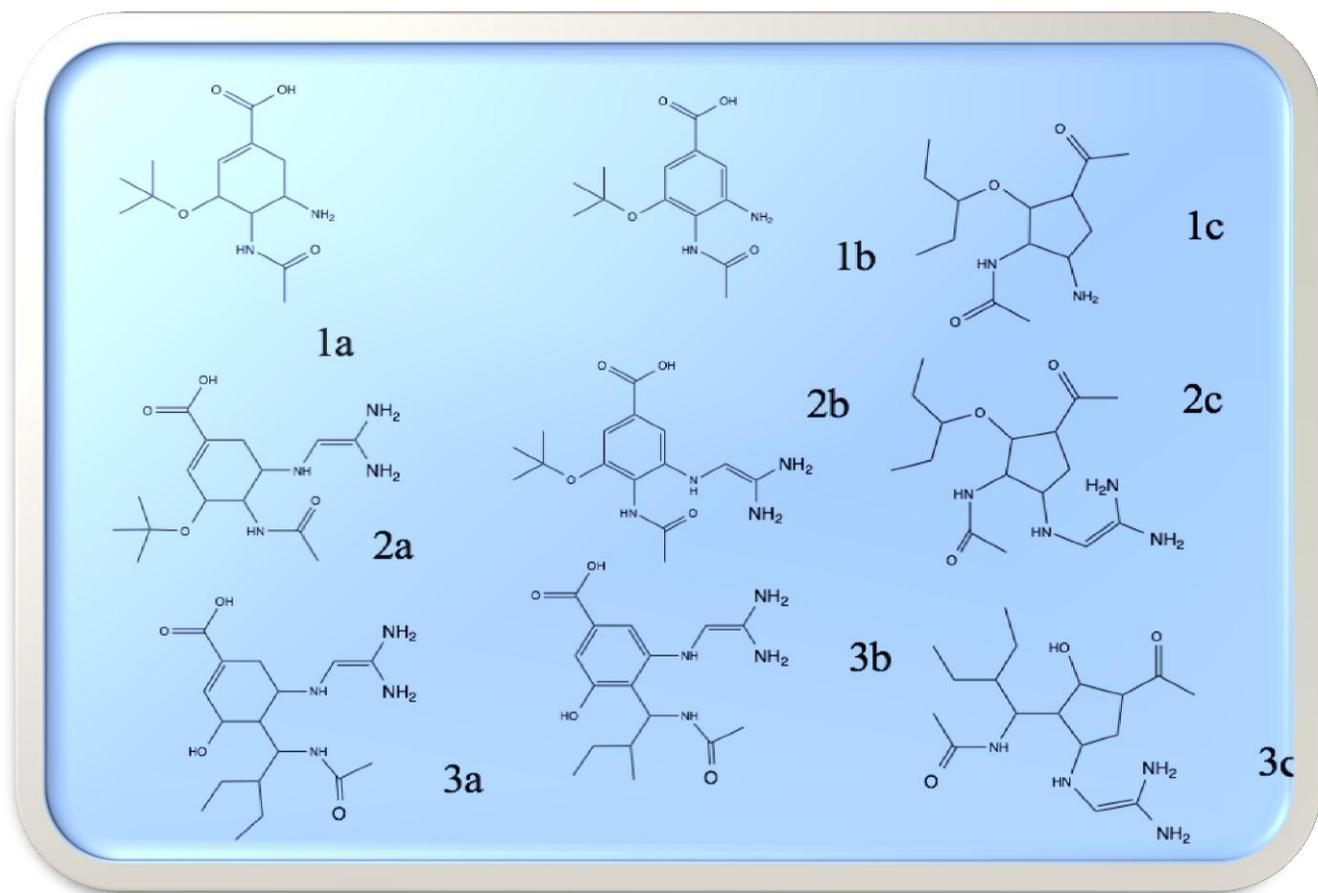


FIGURA 9 DISEÑO DE 9 LIGANDOS POR Z.YANG

Al estudiar 9 moléculas encontró formación de interacciones diferentes con los aminoácidos de Arg271, Glu 227, Glu 277, Asp 151 y Tyr 406 de la Neuraminidasa. Por ejemplo cuando compara las figuras 9(1a), 9(1b) y 9(1c), mismos grupos funcionales: amino, amida, carboxilo e isopentan-3 iloxi encontró interacciones diferentes por tener anillos distintos. La Figura 9(1a) presentó formación de puentes de hidrógeno con los aminoácidos de Glu 227, Glu 277, Asp 151 y Glu 119 por medio de los grupos funcionales de Amina y Amida. El grupo

carboxilato de 9(1a) formó interacciones con los aminoácidos de Arg 292 y Tyr 406. Sin embargo cuando analiza la Figura 9(1b) con una estructura de Benceno y los mismos grupos de 9(1a), esas interacciones fueron distintas. El carboxilo formó puentes de hidrogeno con Arg 371, Arg 292 y Arg 118 a diferencia de los que formó en la figura 9(1a), con Arg 118 y Tyr 406. La Figura 9(1c) al igual que 9(1b) presentó unas interacciones distintas, su grupo carboxilo formó puentes de hidrógeno con los aminoácidos de Arg 292 y Tyr 406, aunque se presentaron las mismas interacciones electrostáticas con los aminoácidos de Glu 227, Glu 277, Asp 151 y Glu 119.

Cuando analiza la segunda línea observa un comportamiento similar, la figura 9(2a) forma interacciones electrostáticas su grupo guanidino con el aminoácido de Asp 151 y su grupo carboxilo forma interacciones con el aminoácido de Arg 371. Sin embargo la Figura 9(2b) formó interacciones diferentes con los aminoácidos Asp 151 y Glu 227 por medio de su grupo carboxilato y 2 más adicionales con su grupo amido con el aminoácidos de Asp 151. Cuando analiza la Figura 9(2c) el anillo ciclopentilo produce formación de interacciones diferentes del grupo carboxilo, este forma puentes de hidrogeno con los aminoácidos de Arg 292 y Tyr 406. El grupo guanidino a diferencia de 9(2b) si formó interacciones con los aminoácidos de Glu 119, Glu 227, y Asp 151.

En la última fila, la Figura 9(3a) no hay un grupo isobutilamido, la molécula no entró en el sitio activo y no hubo interacciones electrostáticas con los aminoácidos de Glu 227, Glu 277, Asp 151 y Glu 119. Lo mismo ocurre con Figuras: 9(3b) y 9(3c).

Del trabajo de Yang se puede concluir que: la estructura determina las interacciones de sus grupos funcionales con los aminoácidos del sitio activo y la otra marcada, la inserción de grupos funcionales grandes como el N-(3etilpentan-2il)acetamida no permite formar interacciones importantes.[39]

En los trabajos de Salam Praadeep y colaboradores [40] se estudiaron moléculas similares a Zanamivir en busca de encontrar nuevos análogos que pudieran remplazar al Zanamivir, en casos donde no fuera efectivo. Estas moléculas tuvieron mejores resultados que Zanamivir. Los autores usaron la base de datos Zinc, una base de datos con 494,515 moléculas disponibles, en formato CIF para facilitar el docking a los usuarios, lo interesante de la base de datos es el contenido de moléculas que se consiguen con los distribuidores de reactivos, como lo pueden ser Sigma Aldrich.

En los estudios se encontraron moléculas con mejores interacciones que el Zanamivir, fármaco distribuido por la empresa farmacéutica Glaxo Smith.

Mediante un programa conocido con el nombre de predicción de Pass se encontró que estos antivirales pasarían las pruebas toxicológicas sin ninguna complicación siendo estos antivirales muestras de cómo deben ser diseñados los nuevos compuestos.

Cuando surgen mutaciones en los aminoácidos con los que interacciona el antiviral se hizo necesario estudiar el efecto de esa mutación en la molécula y buscar una nueva molécula capaz de interaccionar con esos aminoácidos. Shu Qing y colaboradores [41] investigaron la razón por la que H1N1 es susceptible al tratamiento de Oseltamivir pero H5N1 no. Encontró mediante un análisis secuencial un aminoácido que cambio de Histidina a Tirosina en la posición 274. Para saber si esa mutación es la causante de que el Oseltamivir deje de ser efectivo, estudió tres Neuraminidasas una sin mutación, la otra con la mutación de Histidina por Tirosina en la posición 274 y una con una mutación de Asp por Tyr en la posición 274. Encontró que estas mutaciones provocaban que el antiviral no se una por completo al sitio activo. Esto indica que cuando surge una mutación se tienen que diseñar nuevas moléculas capaces de bloquear los virus mutados [40].

El Oseltamivir fue diseñado para tener interacciones con la Neuraminidasa N2 sin embargo se ha visto que tiene también efectividad para las N1.

En la tabla de abajo se muestran los resultados obtenidos por S. Wang

Número	Molécula	Peso	Afinidad	
--------	----------	------	----------	--

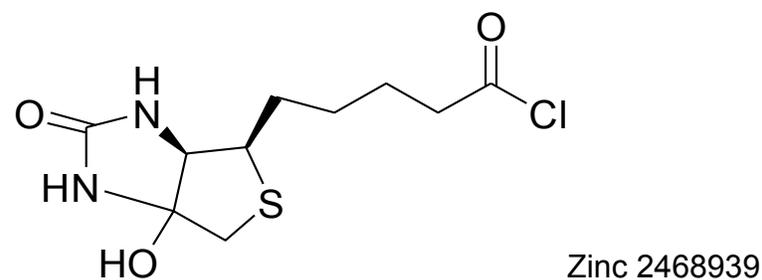
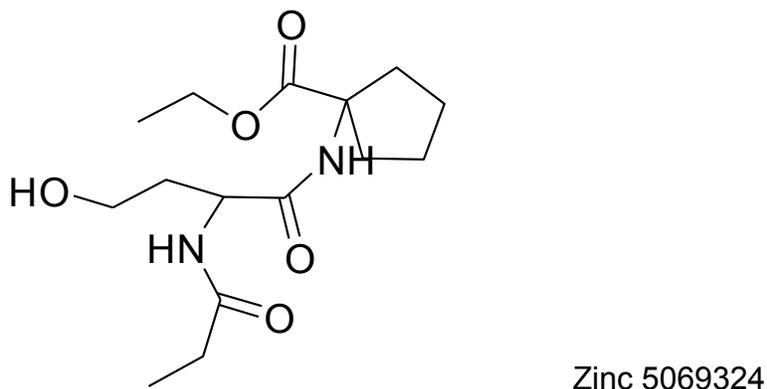
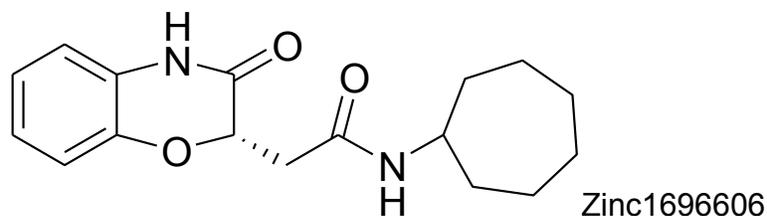


FIGURA 10 Moléculas probadas por Salam Praadeep. En ellas se muestra el nombre con el que son encontradas en la base de datos de Zinc

La molécula 1 denominada como Zinc 1696606 fue la que tuvo mejores resultados formando cuatro puentes de hidrogeno con Arg 292 y dos puentes de hidrogeno con Tirosina 406, igual que Oseltamivir que también forma puentes de hidrogeno con este aminoácido. El compuesto Zinc 05069324 forma puentes de hidrogeno con los mismos residuos que Zinc 1696606. Zinc 2468939, presentó hasta 7 puentes de hidrogeno con los residuos Asp151, Arg156, Glu119 Tyr 406 y Glu 276.

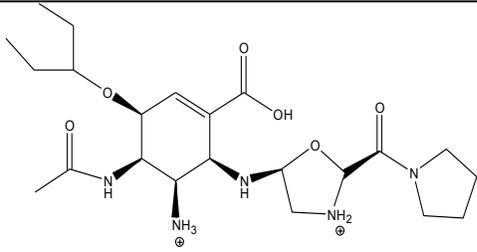
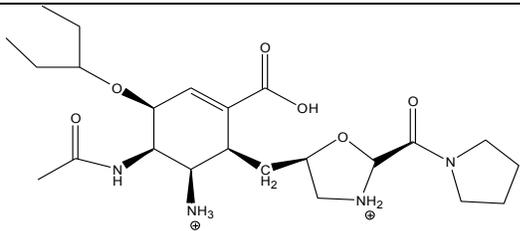
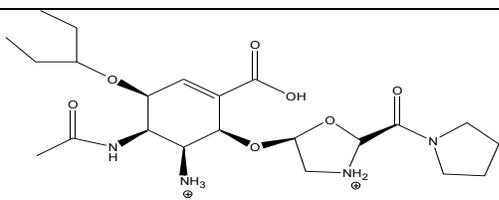
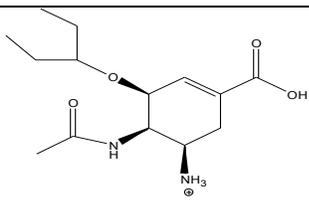
		molecular		
1		469 g/mol	-9.63 kcal/mol	
2		468 g/mol	- 9.12kcal/mol	
3		470g/mol	- 9.31kcal/mol	
4		284 g/mol	-6.92 kcal/mol	

Tabla 3 derivados de Oseltamivir preparados por Shu Qui Wang en el que se muestran dos resultados interesantes, en el que encontró que los derivados con grupos pirrol teniendo como puente un Nitrógeno o un Oxígeno mostraron una mayor afinidad con respecto a la Neuraminidasa.

De todas las moléculas estudiadas por Shu Qui Wang[41], la molécula 1 tiene un puente de nitrógeno y presentó más afinidad por el sitio activo, es un índice de que este grupo ayuda a reorientar el grupo funcional de pirrolidón para acomodar la molécula dentro de esta cavidad 150. Este compuesto presenta más afinidad que

el Oseltamivir porque aumenta el número de puentes de hidrogeno. Específicamente hablando el nitrógeno forma puentes de hidrogeno con Asparagina 151 y el átomo de oxigeno del carbonilo forma puentes de hidrogeno con Arg 118 sin perder los puentes de hidrogeno con Arg 292, Arg 371, Arg 152 y Asp 151, apoyando la teoría de una modificación del Oseltamivir podría mejorar la eficacia en los virus mutados que se han ido expandiendo como H5N1 y H1N1 [8].

Los trabajos de Jin Woo Park [42] también se enfocaron en desarrollar derivados de Oseltamivir con grupos funcionales pertenecientes a aminoácidos para hacer contacto con la cavidad 150. Como parte adicional hicieron sus estudios farmacocinéticos Estos investigadores utilizaron programas de simulación de Dinámica Molecular para calcular la energía de unión. Debido a que la cavidad 150, está compuesta por Asp 151 Arg 118 Y Glu 119 y tiene carácter altamente hidrofílico, Jin Woo Park diseño tres moléculas que modificaban la posición 3 del Oseltamivir. En trabajos anteriores se vio que a introducción de un grupo metilo en esta posición decrecía la Energía de la interacción pero la inserción de grupos hidrofílico en la posición aumenta la energía. Park introdujo la cadena de Serina, $\text{CH}_2 \text{NH}_3^+$, para interactuar con los aminoácidos de Glu 119 y Asp 151. Diseño otro con un grupo CH_2CONH_2 más para hacer contacto con Arg 118. El compuesto 1 hizo fuertes interacciones con Arginina 118, no esperadas y había cierta repulsión de los residuos Glu 119 y Asp 151. El compuesto 2 Si pudo obtener las interacciones deseadas con la Glu 119 y el Asp151 pero la Arginina 118 no pudo hacer contacto hidrofílico.

Síntesis de antivirales

Además de la búsqueda de nuevas moléculas que se puedan unir a la Neuraminidasa mutada por los métodos de Dockings mencionados, la síntesis directa del ligando se puede combinar con el docking, a fin de obtener moléculas activas. Hay investigaciones que sólo se enfocan en sintetizar moléculas que pueden tener una mejor eficacia con respecto al Oseltamivir. En la mayoría de ellos se prueban directamente con los virus mutados, llamados virus resistentes.

Los trabajos de Xue buscan compuestos nuevos que disminuyan la resistencia [43]. Comenzó con la síntesis de varios derivados de flavonoides, pirrolidonas y bencenos, encontrando unos compuestos con benceno como estructura principal y un grupo tiazolidona, que llegaban a la zona conocida como la cavidad 150, hecho que aumentó la unión del compuesto por la Neuraminidasa. Su efectividad fue 7 veces menor con respecto a Oseltamivir. En vista de estos resultados buscó la manera de introducir grupos funcionales diferentes para disminuir la resistencia. En la figura 11 se muestra la fenil tiazolidona que primero encontró. La tiazolidona entró en la cavidad 150 y el benceno se unió al sitio activo.

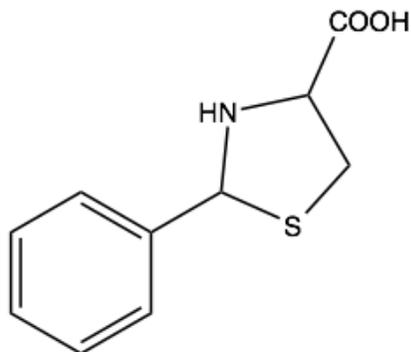


FIGURA 11 MOLÉCULA DE TIAZOLIDONA CON EFECTOS INHIBITORIOS, LA PARTE DEL ANILLO DE TIAZOLIDONA ENTRA EN LA CAVIDAD 150 DE LA NEURAMINIDASA Y EL ANILLO DE BENCENO ENTRA EN EL SITIO ACTIVO.

Cambiando el grupo amino NH₂- de la tiazolidona en la posición 3 por diferentes grupos acilos R-CO-, se encontró que se unía aún mejor a la Neuraminidasa. La urea en esta posición, orienta al grupo tiazolidina para unirse mejor con la cavidad 150 sin modificarse la unión del benceno en el sitio activo.

Para obtener estos derivados Xue y colaboradores utilizaron cloruro de cisteína y Benzaldehído en una solución de etanol/Agua para unir el grupo tiazolidona y el anillo de benceno. En la siguiente etapa, agregó distintos cloruros de cloro acilos con bicarbonato de sodio como catalizador para formar las amidas por medio de la reacción del grupo amina en la tiazolidona. Un compuesto mostró tener mejor efectividad con respecto a los demás, fue al que agregó cloruro de cloro cetilo con amoniaco para formar urea en la posición 3 de la tiazolidona. El esquema de reacción se muestra en la figura 13.

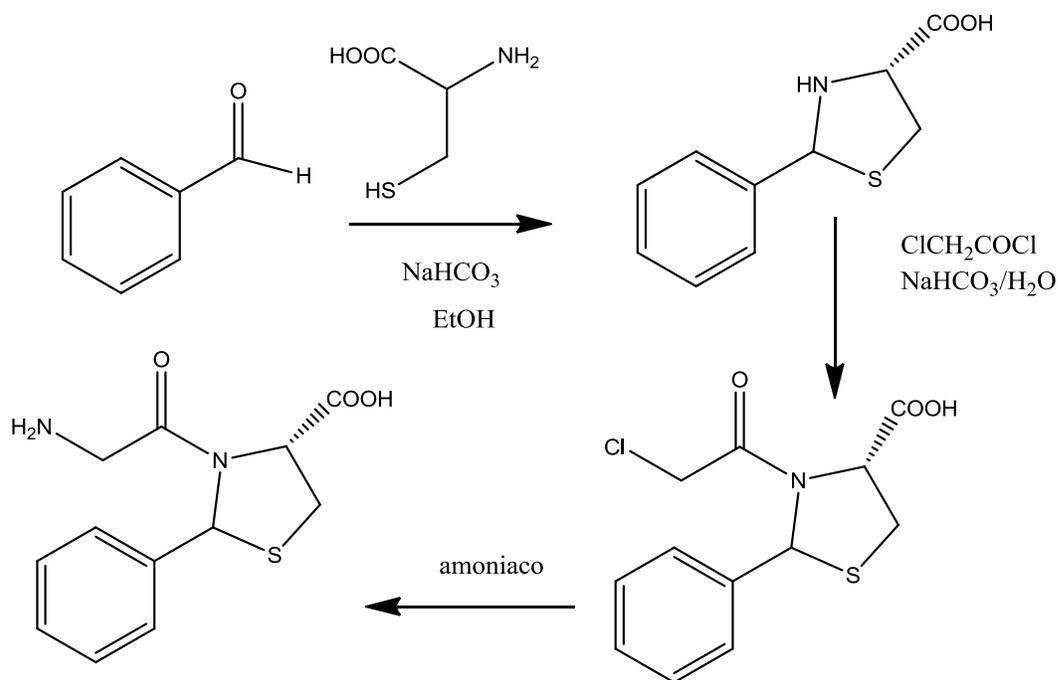


FIGURA 12 DERIVADO DE TIAZOLIDONA DISEÑADO POR XUE

Charlotte D' Souza y colaboradores en 2009, [23] modificaron la estructura del Oseltamivir. Para lograr que tuviera contacto con la cavidad 150, introdujeron los aminoácidos de prolina y glicina en el grupo amino del Oseltamivir. Se obtuvieron haciendo reaccionar durante dos horas 1 mol de Oseltamivir con 1 mol de Boc-Prolina utilizando Diciclohexilcarbodiimida como catalizador de la reacción en cloroformo como disolvente. Para quitar el grupo Boc utilizó ácido trifluoroacético en diclorometano.

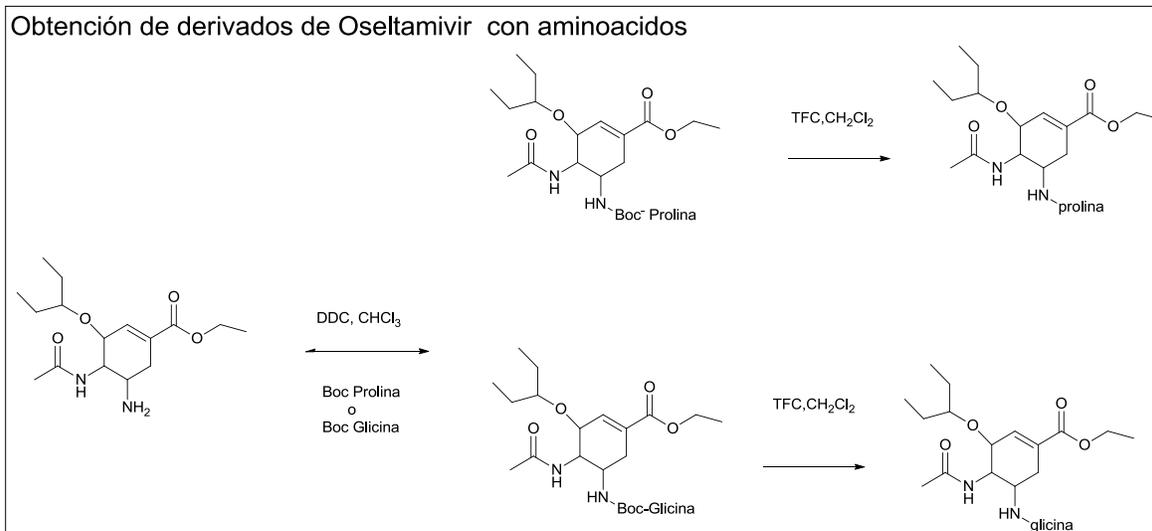


FIGURA 13 ESQUEMA DE REACCIÓN DE LA OBTENCIÓN DE DERIVADOS DE OSELTAMIVIR CON GRUPOS PROLINA Y GLICINA. LA PARTE PEPTÍDICA LLEGA A HACER CONTACTO CON LA CAVIDAD 150

Estos compuestos con aminoácidos alcanzaron hacer contacto con la cavidad 150 y tuvieron mejores efectos de inhibición que el Oseltamivir.

En los trabajos de Xue [43] se sintetizaron varios tipos de moléculas para tener efectos terapéuticos no solo contra el virus de la influenza sino también contra el Herpes tipo 1 y el Herpes tipo 2. Dentro de sus investigaciones Xue llegó a encontrar que metti-6-amido-4-hidroxindol-2-carboxilato (fig.16) puede inhibir a los tres tipos de virus.

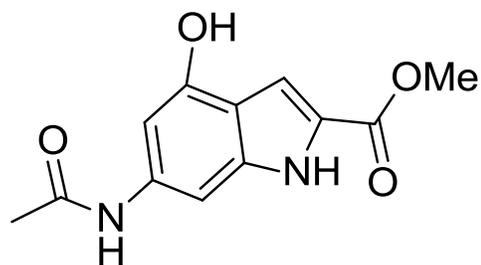


Fig 14 Metil-6-acetamido-4-hidroxi-1H-indol-2-carboxilato

Posteriormente se desarrollaron varios derivados de este indol cambiando el grupo hidróxido del primer compuesto por diferentes éteres: p-fenoxi, p-metoxifeniloxi, p-fluorofenilo y ciclohexiloxi. Para sintetizar estos éteres se partió del ácido 3-hidroxi-4-metoxicarbonil-carbámico, ver figura 17, que se hizo reaccionar: con bromuro de benceno, p-bromofluorobenceno, p-bromometoxibenceno, ó bromociclohexano en presencia de K_2CO_3 y acetona.

Posteriormente se redujo el éster a alcohol, y este se oxidó con cromato de piridinio, obteniéndose el aldehído. Como último paso, se agregó Diazoacetato de etilo para obtener el compuesto final.

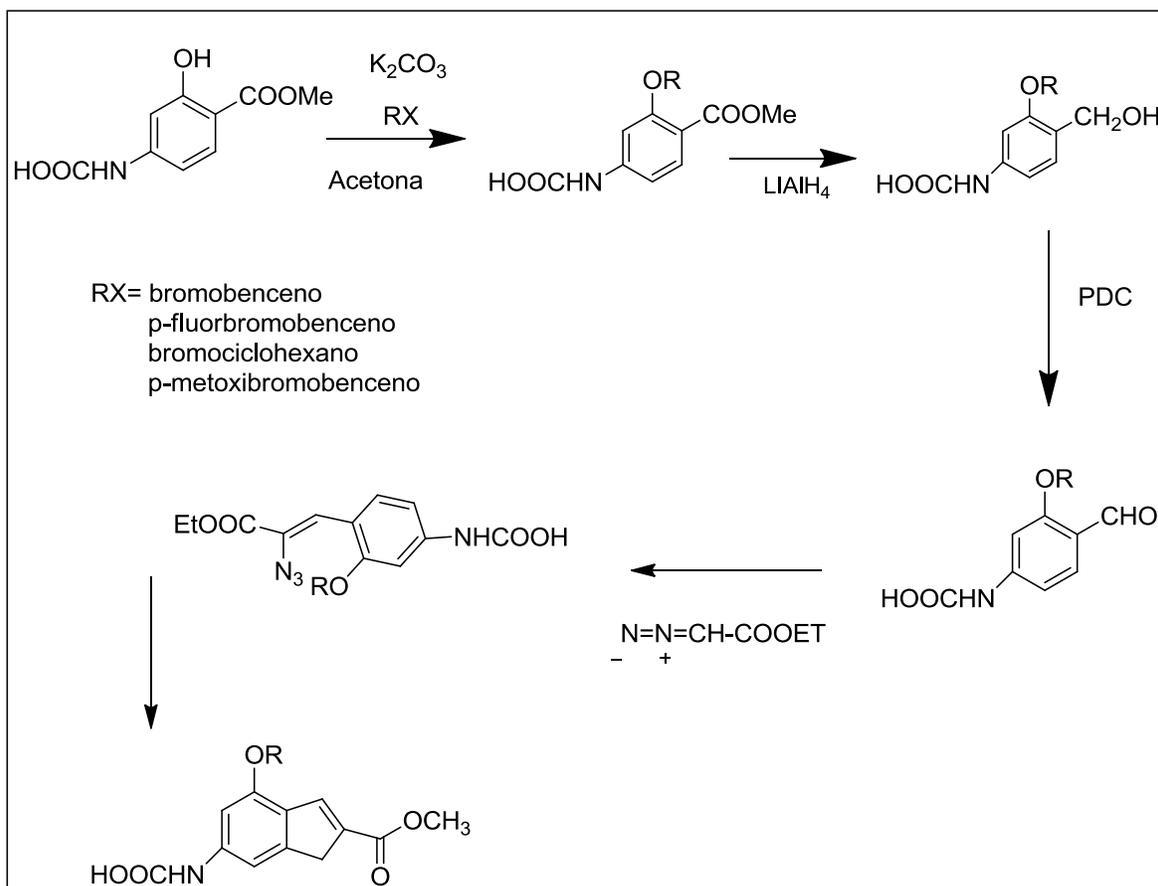


Figura 15 Esquema de reacción de los grupos ácido carboxílicos 4-indol.

JUSTIFICACIÓN

.Debido al creciente número de casos reportados de la disminución de la efectividad del Oseltamivir por virus con mutaciones, se requiere encontrar nuevos derivados de Oseltamivir que puedan devolver la efectividad del ligando.

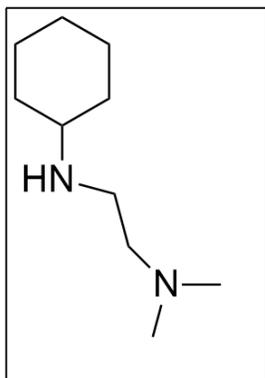
HIPÓTESIS

Puede hacerse una N-alquilación en el grupo amino del Oseltamivir y ciclohexilamina con diferentes cloruros de alquilaminas para obtener derivados potencialmente útiles para interaccionar con la Neuraminidasa

OBJETIVOS

- 1) Encontrar un método de sintetizar derivados de Oseltamivir por medio de una N-alquilación usando aminas cloradas.
- 2) Caracterizar los productos obtenidos
- 3) Realizar estudios de modelación molecular para probar la eficiencia del Antiviral.

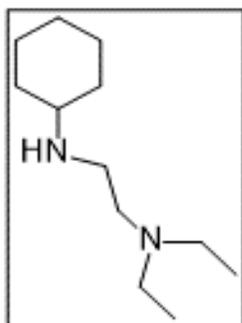
PARTE EXPERIMENTAL



Obtención del [2-(ciclohexilamino) etil]dimetilamina

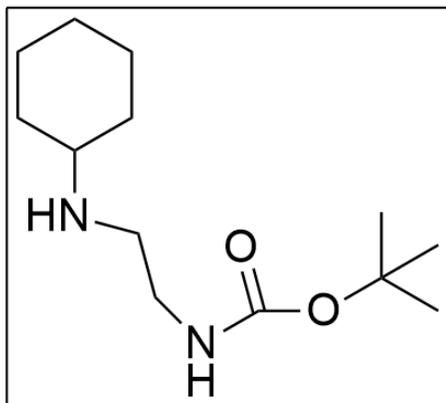
Para la obtención de la [2-(ciclohexilamino) etil] dietilamina se pesó 0.1 gramos de clorhidrato de 2-cloroetildietilamina (0.0007 moles), y se disolvió en 10 ml de una solución de etanol/agua al 70/30 v/v. Después se le agregó 0.1 gramos (0.001 moles) de NaHCO_3 para obtener la 2-cloroetildimetilamina libre. Enseguida se puso a reaccionar con 0.1 ml (0.001 moles) de ciclohexilamina a una temperatura de reacción de 60 °C durante 12 horas de reacción, se evaporó el disolvente a presión reducida y luego se purificó con una extracción usando acetato de etilo. El peso obtenido del producto fue de 0.09 g, lo que equivale a 70 % de rendimiento.

Obtención de [2-(ciclohexilamino) etil]dietilamina



Para la obtención de la [2-(ciclohexilamino) etil] dietilamina se pesó 0.1 gramos de clorhidrato de 2-cloroetildietilamina (0.0007 moles), y se disolvió en 10 ml de una solución de etanol/agua al 70/30 v/v. Después se le agregó 0.1 gramos (0.001 moles) de NaHCO_3 para obtener 2-cloroetildietilamina. Enseguida se puso a reaccionar con 0.1 ml (0.001 moles de ciclohexilamina) a una temperatura de reacción de 60 °C durante 12 horas de reacción, el producto

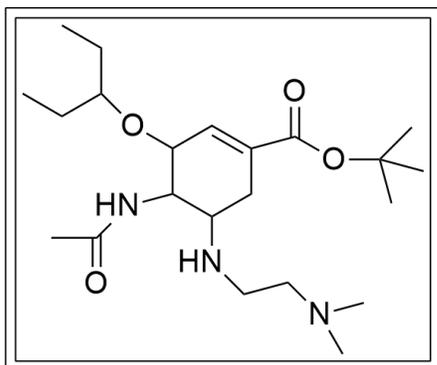
obtenido se le quito la solución etanol/agua a presión reducida y luego se purifico con una extracción usando acetato de etilo, el peso obtenido del producto fue de 0.09 g, lo que equivale a 70 % de rendimiento.



Obtención de tert-butil N-[2-(ciclohexilamino)etil]carbamato

En un matraz bola, se agregó 0.1 gramos de clorhidrato de 2 cloretilamina (0.001) y 0.1 ml de Boc (0.0004 moles) usando una solución de THF a 0°C con agitación

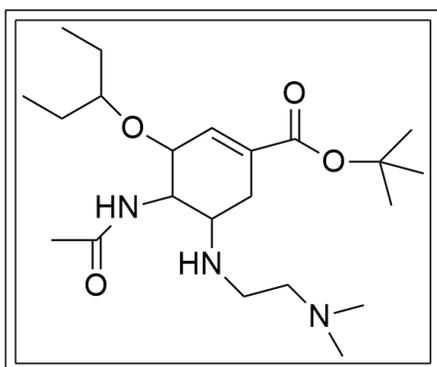
constante, Se le quito el disolvente a presión reducida y se obtuvo un peso de 0.11gramos (100% de rendimiento) y luego se hizo reaccionar este producto con ciclohexilamina en una solución de etanol agua en otro matraz diferente.



Obtención de etil-ester-5-((dimetilamino)etil)amino-4-acetilamino-3-(1-etilpropoxi)cyclohexene-1-ene carboxílico

En un matraz de dos bocas se puso a reaccionar 0.1 gramos de Oseltamivir (0.000321 moles) con 0.1 gramos de clorhidrato de 2-cloro-N,N-dimetiletilamina (0.001 moles) y 0.1 gramos (0.001 moles) de NaHCO₃. En una solución de etanol /agua al 70/30 con

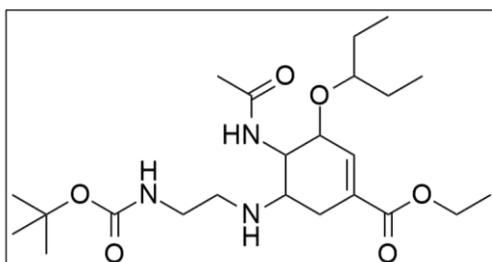
una temperatura de 60 °C por un tiempo de reacción de 28 horas de reacción, luego se le extrajo el disolvente a presión reducida y se purificó usando una mezcla de etanol/acetato de etilo. El producto obtenido pesó 0.030gramos (20 % de rendimiento)



Obtención de etil-ester-5-((diethylamino)etil)amino-4-acetilamino-3-(1-etilpropoxi)cyclohex-1-ene carboxílico

En un matraz de dos bocas se puso a reaccionar 0.1 gramos de Oseltamivir (0.000321 moles) con 0.1 gramos de clorhidrato de 2-cloro-N,N-dietiletilamina (0.001 moles) y 0.1 gramos (0.001 moles) de NaHCO₃. En una solución de etanol /agua al 70/30 con una temperatura de 60 °C por un tiempo de reacción de 28 horas de reacción, luego se le extrajo el disolvente a presión reducida y se purificó usando una mezcla de etanol/acetato de etilo. El producto obtenido pesó 0.030gramos (20 % de rendimiento).

Etil-4-acetamido-5-((tertbutoxycarbonil)amino)-3-(pentan-3 iloxy)ciclohex-1-encarboxilato)



En un matraz bola, se agregó 0.1 gramos de clorhidrato de 2-cloretilamina (0.001moles) y

0.1 ml de Boc (0.0004 moles) usando una solución de THF a 0°C con agitación constante. En un matraz bola, se agregó 0.1 gramos de clorhidrato de 2-cloretilamina (0.001 moles) y 0.1 ml de Boc (0.0004 moles) usando una solución de THF a 0°C con agitación constante

En un matraz bola, e agregó 0.1 gramos de clorhidrato de 2-cloretilamina (0.001) y 0.1 ml de Boc (0.0004 moles) usando una solución de THF a 0°C con agitación constante, se le quito el disolvente a presión reducida y se obtuvo un peso de 0.11gramos (100% de rendimiento) y luego se hizo reaccionar este producto con 0.1 gramos de Oseltamivir en una solución de etanol agua en otro matraz distinto durante 48 horas de reacción.

Material Usado

- clorhidrato de 2-cloro-N,N-dimetiletilamina de marca Aldrich
- clorhidrato de 2-cloro-N,N-dietiletilamina de marca Aldrich
- clorhidrato de 2-cloroetilamina marca Aldrich
- Bicarbonato de Sodio marca Baker
- Se utilizó etanol que previamente estaba destilado
- Se utilizó metanol previamente destilado
- Embudos de adición de 25 ml
- matraz de dos bocas de 25 ml
- Matraz bola de fondo plano de 50 ml
- Agitador
- Parrilla de calentamiento con agitación
- Espátula
- Nave para pesar
- Oseltamivir
- Ciclohexilamina
- DMF
- THF que estaba seco previamente

- Dioxano

Equipo

Los espectros de IR se determinaron con un espectrofotómetro de IR FTIR/FIR Perkin Elmer Spectrum 400, mediante las técnicas reflectancia ATR.

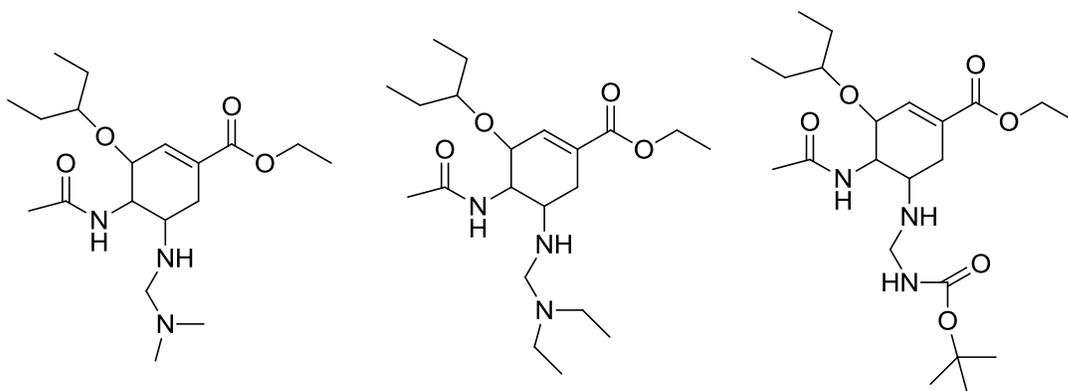
Los espectros de RMN-H se determinaron en un equipo Varian Unity Innova 300 MHz utilizando como disolvente cloroformo deuterado y como referencia interna, tetrametilsilano.

Discusión de Resultados

Las síntesis realizadas en realizadas en este trabajo se enfocaron a la obtención de derivados de Oseltamivir que pudieran ser efectivos en cepas resistentes del virus de la influenza.

Se pretendió sustituir el grupo amino del Oseltamivir para obtener aminas con cadena más larga, para que este grupo hiciera contacto con la cavidad 150 de la proteína Neduraminidasa, pues el grupo de Souza[23] encontró que el grupo amino funcionalizado con aminoácidos como glicina o prolina dio derivados con actividad frente a la proteína.

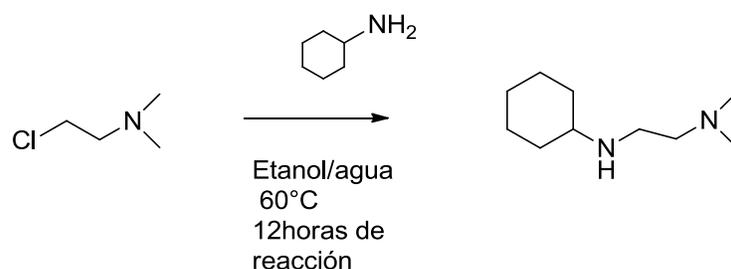
Las estructuras de los compuestos son:



Lo que se pretendía era sustituir el grupo amino del Oseltamivir por un grupo diamino más largo para que hiciera contacto con la cavidad 150.

Esta conversión implica la reacción de una amina primaria con la 2-cloroetilamina generando una amina primaria separada dos átomos de carbono de la original. Para hacerlo existen muchos métodos, pero al considerar los grupos funcionales presentes en el Oseltamivir, las posibilidades se reducen. El método que se ve exploró fue el hacer reaccionar al grupo amino con haluros de alquilo en reacciones que se conocen como N-alquilación solo que estos tienen el defecto de generar varios subproductos. Han reportado que usando disolventes como Dioxano, DMF y Etanol se obtienen reacciones N-selectivas que forman un solo producto [45]. Sin embargo este método no ha sido probado usando haluros de aminas. Por lo que se probó este método usando como modelo la ciclohexilamina, con 2-cloro-N,N-dimetiletamina, 2-cloro-N,N-dietiletamina y 2-cloroetilamina. Al poner a reaccionar 1 mmol de ciclohexilamina con 1 mmol de 2-cloro-N,N-dimetiletamina en DMF durante 13 horas a 60 °C no hubo reacción. Se probaron modificar otras variables como la cantidad de ciclohexilamina en vista de encontrar

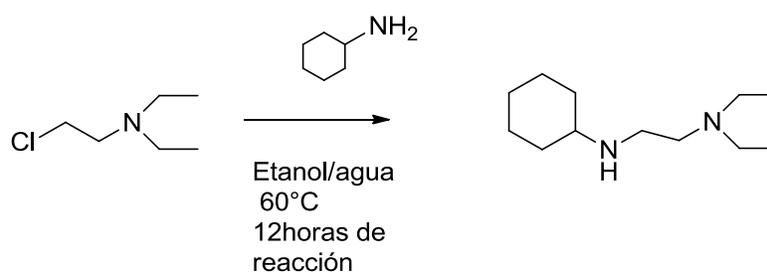
que hubiera reacción pero no hubo en ningún momento. En vista de que la DMF no reaccionó se intentó probar con dioxano como disolvente pero tampoco hubo reacción con dioxano. Cuando se puso 1 mmol de ciclohexilamina a reaccionar con 1 mmol de 2-cloro-N,N-dimetiletamina en metanol comenzó a reaccionar produciendo bajos rendimientos. Después se usó una mezcla de etanol/agua para la reacción usando 1 mmol de ciclohexilamina y 1 mmol de 2-cloro-N,N-dimetilamina mejorando el rendimiento a un 70 %. La reacción se hizo a un tiempo de 8 horas inicialmente y luego se probó una segunda reacción usando un tiempo de reacción de 12 horas observándose un rendimiento similar (70%). Este método además probó ser eficiente ya que produjo un solo producto, la.



RMN:En el espectro se pueden ubicar las señales que están acopladas en la región de 0.99 ppm a 1.4 ppm que corresponden a los metilenos que están en posición γ con respecto al CH- unido a la amina del anillo, luego en la zona de 1.5 ppm a 2.0 ppm se ubican las señales de los metilenos en posición α al grupo CH de la amina, finalmente en 2.4 ppm se ubica el CH que está enlazado al grupo

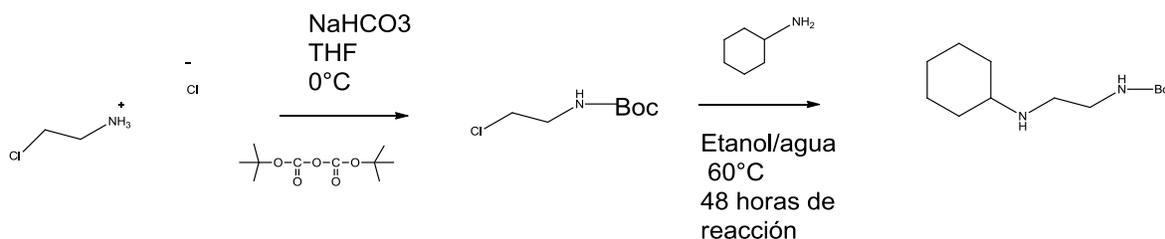
amino en forma de quintuplete no muy definido, finalmente a 2.4 y 2.6 ppm se ubican los metilenos de la cadena alifática diamina.

Cuando se probó el mismo método usando la ciclohexilamina con la 2-cloro-N,N-dietilamina usando la misma mezcla de etanol/agua con bicarbonato de sodio en un tiempo de reacción de 12 horas se obtuvo 70 % de rendimiento.



RMN: En el espectro podemos ubicar mediante unas señales que están acopladas en la región de 0.99 ppm a 1.4 ppm los metilenos que están en posición 4 con respecto al CH- unido a la amina del anillo, también encima de estas señales se ubican los metilos de la amina terminal, luego en la zona de 1.5 ppm a 2.0 ppm se ubican las señales de los metilenos en posición 2 y 6 al grupo CH de la amina, finalmente en 2.4 ppm se ubica el CH que esta enlazado al grupo amino en forma de quintuplete no muy definido, finalmente a 2.4 y 2.6 ppm se ubican los metilenos de la cadena alifática diamina inmediatamente después se ubican el cuadruplete de los metilenos que están en la parte terminal de la cadena alifática de la diamina.

Cuando se probó el método con la 2.cloroetilamina pero no funciono de forma directa ya que se observaron polimerizaciones. Por lo que se tuvo que proteger el grupo amina de la 2 cloretilamina con tertbutoxycarbonilo y después hacer reaccionar esta amina-Boc con ciclohexilamina y bicarbonato en una solución etanol/agua al (70/30 v/v). Se hizo reaccionar la amina con bicarbonato de tertbutoxycarbonilo con la amina. Se probaron a 12 horas y 24 horas pero el rendimiento fue bajo. Luego se probó a 18 horas y se obtuvo un mejor rendimiento 20 %.

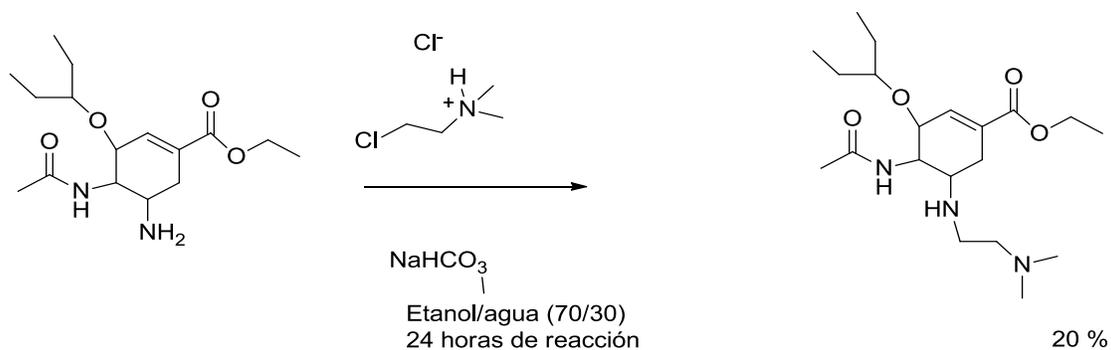


RMN: En el espectro podemos ubicar mediante unas señales que están acopladas en la región de 0.99 ppm a 1.4 ppm los metilenos que están en posición 4 con respecto al CH- unido a la amina del anillo, luego se observa un singulete grande de los metilos del grupo terbutóxido, luego en la zona de 1.5 ppm a 2.0 ppm se ubican las señales de los metilenos en posición 1 y 6 al grupo CH de la amina, finalmente en 2.4 ppm se ubica el CH que esta enlazado al grupo amino en forma

de quintuplete no muy definido, finalmente a 2.4 y 2.6 ppm se ubican los metilenos de la cadena alifática diamina.

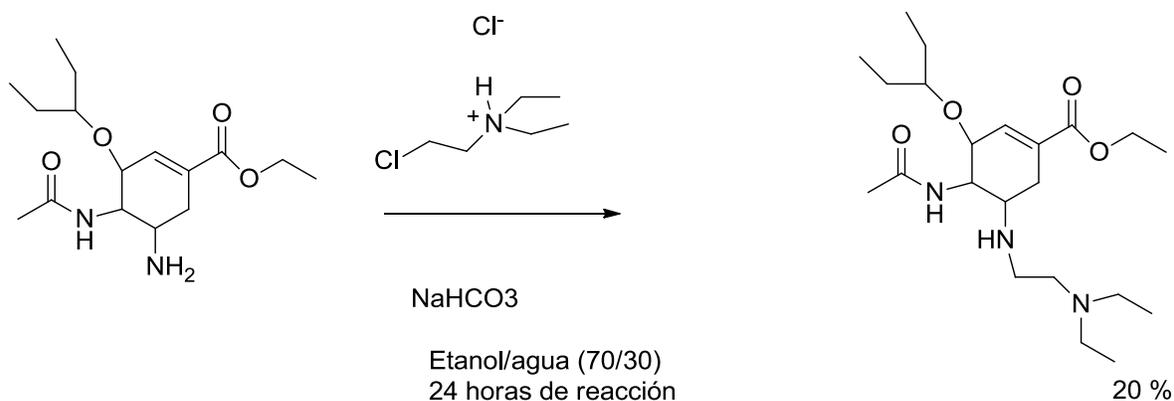
Los métodos que se usaron en la N-aminación usando ciclohexilamina, se probaron después en el Oseltamivir. Para la primera síntesis se usó 1 mmol de Oseltamivir con 1 mmol de clorhidrato de la 2-cloro N,N-dimetilamina. En NaHCO_3 , el bicarbonato se usa para la liberación del cloruro de 2-cloro N,N-dimetilamina usando etanol como disolvente. En los otros disolventes no se funciona bien porque el cloruro de 2-cloro-N,N-dimetilamina no se libera. El esquema de reacción es:

Al parecer el hecho de que haya grupos funcionales grandes hace que el rendimiento de la reacción se disminuya puesto que podemos observar una disminución de 50% rendimiento cuando lo comparemos con el rendimiento de la ciclohexilamina.



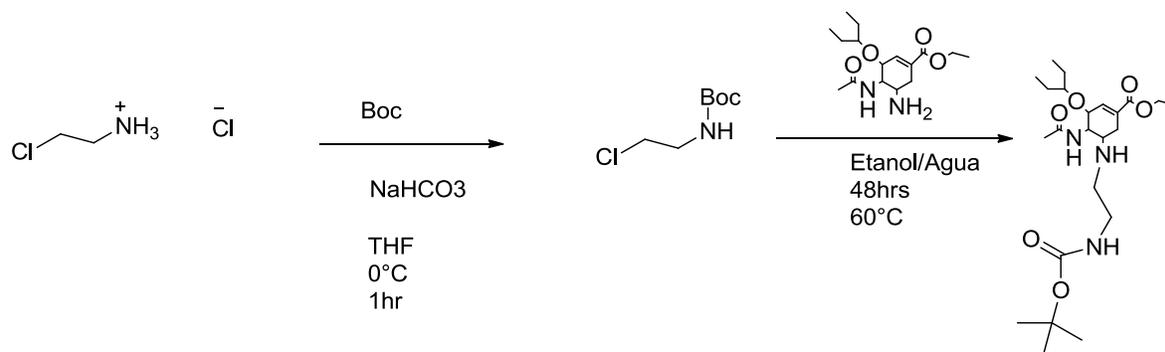
En el espectro de RMN (δ , ppm) se puede ver las señales de los dos metilos del grupo 1-etilpropoxi en 0.99 ppm que están en forma de tripletes sobrepuestos, luego a 1.2 ppm podemos ver las señales del metilo del éster en forma de triplete. en 1.5 ppm podemos ver las señales de metilenos del grupo 1-etilpropoxi en forma de un quintuples sobrepuestos uno sobre el otro, a 2.0 ppm podemos ver la señal del metilo de la amida, seguido de 2.1 ppm la señal de los metilo de la amina terminal, 2.2 ppm encontramos el metileno que está en cadena de la diamina más cercano a la amina terminal, seguido del metileno que está en cercano del doble enlace del ciclo a 2.6 ppm, a 2.8 ppm se encuentra el último metileno de la cadena alifática de la diamina que está pegado a la amina del anillo. A 3.1 ppm se ubica el CH que esta enlazado con la amina del anillo. A 3.4 ppm se ubica el CH que está formando un enlace con la amida del anillo. A 3.8 ppm se ubica el CH que está pegado al grupo éter del anillo, a 4.0 ppm se ubica el metileno del éster y a 6 ppm se ubica el metino del anillo.

Para obtener el siguiente compuesto, se procedió de la misma forma, se agregó 1 mmol de Oseltamivir con 1 mmol clorhidrato de 2-cloro-N,N-dietiletilamina con NaHCO_3 en una solución de etanol/agua al 70/30 v/v, durante 24 horas de reacción nuevamente no se observó que hubiera formación de productos secundarios haciendo la reacción selectiva a las mono alquilaciones.



En el espectro de RMN (δ , ppm) se pueden ver las señales de los dos metilos del grupo 1-etilpropoxi en 0.99 ppm que están en forma de tripletes sobrepuestos, en 1.0 ppm están los metilos del 2-cloro-N,N-dietiletilamina en forma de tripletes sobrepuestos, luego a 1.2 ppm podemos ver las señales del metilo del éster en forma de triplete. en 1.5 ppm podemos ver las señales de metilenos del grupo 1-etilpropoxi en forma de un quíntuples sobrepuestos uno sobre el otro, a 2.0 ppm podemos ver la señal del metilo de la amida, seguido de 2.1 ppm la señal de los metilo de la amina terminal, 2.2 ppm se encuentra el metileno que está en cadena de la diamina más cercano a la amina terminal, seguido del metileno que está en cercano del doble enlace del ciclo a 2.6 ppm, a 2.8 ppm se encuentra el ultimo metileno de la cadena alifática de la diamina que está pegado a la amina del anillo. A 3.1 ppm se ubica el CH que está enlazado con la amina del anillo. A 3.4 ppm se ubica el CH que está formando un enlace con la amida del anillo. A 3.8 ppm se ubica el CH que está pegado al grupo éter del anillo, a 4.0 ppm se ubica el metileno del éster y a 6 ppm se ubica el metino del anillo.

Para obtener el siguiente derivado se puso a reaccionar 1 mmol de Boc con 1 mmol de clorhidrato de 2-cloroetilamina para proteger el grupo amina del 2-cloroetilamina que este último se va a liberar mediante la adición de bicarbonato de sodio NaHCO_3 . Una vez que se obtuvo la protección del grupo amino se hizo reaccionar con el Oseltamivir agregándole un mmol, la reacción se tuvo que hacer hasta en 48 hrs. debido a que en las primeras 24 horas no había reacción, después de 36 horas comenzó a verse reacción, por lo que se decidió dejarlo a 48 horas obteniéndose 20 % de producto.



En el espectro de RMN (δ , ppm) se pueden ver las señales de los dos metilos del grupo 1-etilpropoxi en 0.99 ppm que están en forma de tripletes, luego a 1.2 ppm podemos ver las señales del metilo del éster en forma de triplete. en 1.5 ppm podemos ver las señales de metilenos del grupo 1-etilpropoxi en forma de un quintuplete sobrepuestos uno sobre el otro, a 2.0 ppm podemos ver la señal del metilo de la amida, seguido de 2.1 ppm la señal de los metilos de la amina terminal, 2.2 ppm encontramos el metileno que está en cadena de la diamina más cercano a la amina terminal, seguido del metileno que está cercano del doble

enlace del ciclo a 2.6 ppm, a 2.8 ppm se encuentra el último metileno de la cadena alifática de la diamina que está pegado a la amina del anillo. A 3.1 ppm se ubica el CH que está enlazado con la amina del anillo. A 3.4 ppm se ubica el CH que está enlazado con el grupo amina, a 3.8 ppm se ubica el CH enlazado al éter, a 4.0 el metileno pegado al grupo éster y a 6.0 ppm se ubica el metileno.

En el espectro de RMN (δ , ppm) podemos ver las señales de los dos metilos del grupo 1-etilpropoxi en 0.99 ppm que están en forma de tripletes sobrepuestos, seguidos de las señales de los metilos del grupo Boc, luego a 1.2 ppm podemos ver las señales del metilo del éster en forma de triplete. en 1.5 ppm podemos ver las señales de metilenos del grupo 1-etilpropoxi en forma de un quíntupletes sobrepuestos uno sobre el otro, a 2.0 ppm podemos ver la señal del metilo de la amida, 2.2 ppm encontramos el metileno que está en cadena de la diamina más cercano a la amina terminal, seguido del metileno que está cercano del doble enlace del ciclo a 2.6 ppm, a 2.8 ppm se encuentra el último metileno de la cadena alifática de la diamina que está pegado a la amina del anillo. A 3.1 ppm se ubica el CH que está enlazado con la amina del anillo. A 3.4 ppm se ubica el CH que está en la base de la amida.

Mediante la aplicación de estos métodos en aminas primarias halogenadas se ve que conforme el agente n-alquilante en este caso el Oseltamivir y ciclohexilamina, si estos tienen muchos grupos funcionales que le confieran impedimento estérico a la amina se disminuye el rendimiento de la reacción, también se vio que como comúnmente estos compuestos se venden en forma de sal, se necesitan usar disolventes que los puedan disolver completamente ya que una disolución parcial

hará que se disuelva poco y al parecer esto no es suficiente para que reaccione con Oseltamivir. Poniendo NaHCO_3 a la reacción ayuda a la disolución total en el disolvente orgánico en este caso el alcohol. Algunas de las variantes que se pueden probar sería aumentar la cantidad de Oseltamivir cosa que no se quería inicialmente porque el Oseltamivir es un producto caro, y es necesario que solo se agreguen relaciones de 1:1 para reducir los costos. De esta forma se ha encontrado un método que es compatible con el medio ambiente y selectivo a la mono alquilación usando aminas primarias halogenadas que no han sido reportadas en aplicación a desarrollar los derivados de Oseltamivir.

RESULTADOS OBTENIDOS DE AUTODOCK VINA

En la figura de abajo se muestra la conformación del Oseltamivir dentro del sitio activo.

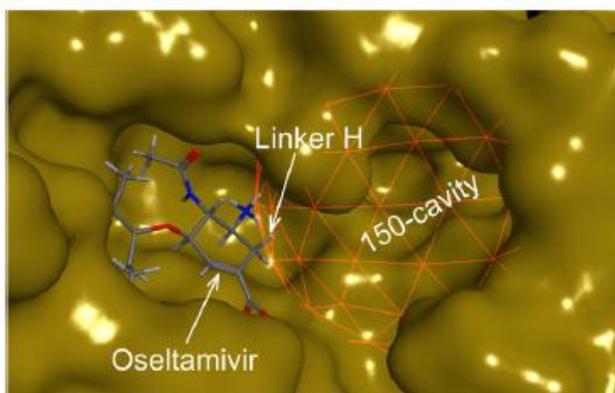


FIGURA 15 UBICACIÓN DEL SITIO ACTIVO DE LA NEURAMINIDASA Y LA CAVIDAD 150

Como se puede apreciar, en la figura 15, existe una región en donde el Oseltamivir no alcanza a llegar. Esa parte donde no hace contacto es la cavidad 150 que

puede usarse para incrementar las interacciones y mejorar la actividad del ligando. Por tanto se hace necesario diseñar antivirales que hagan contacto con esta región. En los trabajos que propuso Shu-Qui Wang en conjunto con su equipo vio que la posición 2 es la que apunta hacia la cavidad 150, pero no hace contacto, por lo que decidió introducir el grupo que se muestra en la figura de 19 en la posición 2 para que hiciera contacto con la cavidad 150.

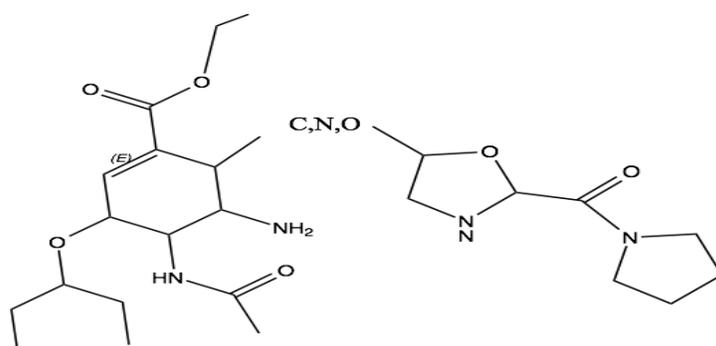


FIGURA 16 DERIVADOS DE OSELTAMIVIR DISEÑADOS POR SHU-QUI WANG. EL DERIVADO QUE TIENE COMO PUENTES EL NITRÓGENO ES EL QUE MOSTRO TENER UN BUEN EFECTO INHIBITORIO EN EL VIRUS DE LA INFLUENZA.

Con el propósito de que este derivado al tener un grupo más grande en esa posición pudiera hacer contacto con esa cavidad 150 y además provocara el cierre del sitio activo. Los átomos de N, O, C los diseñó con el propósito de que estos

átomos puedan funcionar de puentes teniendo formación de puentes de hidrógeno con esta región. Los resultados de estudiar las interacciones de estas moléculas con la Neuraminidasa mostraron que tenían interacciones con esta cavidad 150, y una energía de interacción superior a las del Oseltamivir que es de -6.92 Kcal/mol. A continuación se muestran las conformaciones de los derivados dentro del sitio activo.

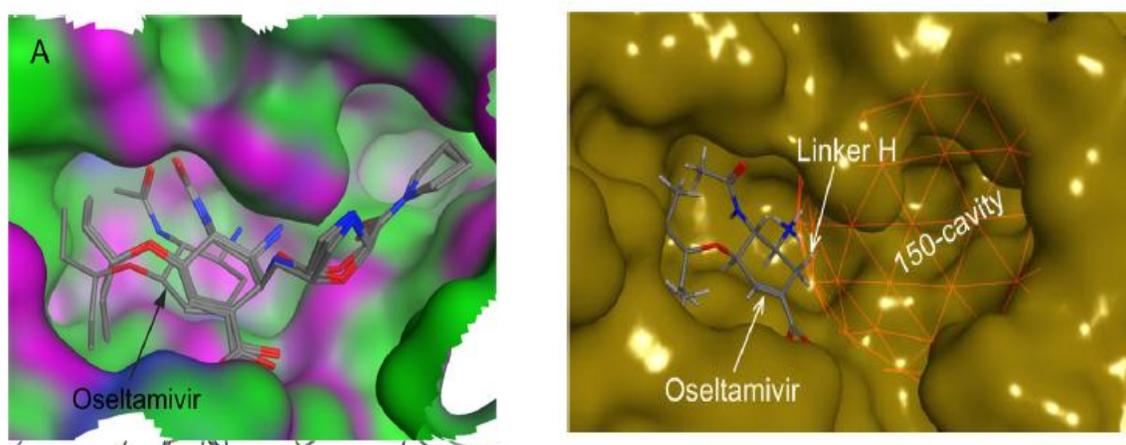


FIGURA 17 FIGURA DE LA IZQUIERDA, DOCKING DE LOS DERIVADOS DEL OSELTAMIVIR DE SHU-QUI WANG, EN ELLA SE APRECIA COMO OCUPAN LA CAVIDAD 150 A DIFERENCIA DEL OSELTAMIVIR, DERECHA QUE NO CUBRE ESTA REGIÓN.

Como se puede apreciar el grupo que se le insertó hace contacto con la región de la cavidad 150 en el lado izquierdo de la figura mientras que el del lado derecho es el del Oseltamivir que no hace contacto. Ese contacto hace que se tenga una mayor afinidad por el sitio activo y por tanto aumente la energía de unión. Los tres derivados presentaron energías de -9.12,-9.63 y -9.31 kcal/mol [8].

Los trabajos de ZHiwei Yan mostraron que introduciendo diferentes grupos funcionales en regiones distintas de Oseltamivir podía afectar la conformación del

derivado en el sitio activo [39]. Por esta razón se decidió en este trabajo modificar el grupo amino del Oseltamivir, cambiándolo a un grupo diamina que estuviera extendido para que pudiera hacer contacto con la cavidad 150. La forma en que se modificó el oseltamivir se muestra en la figura 18

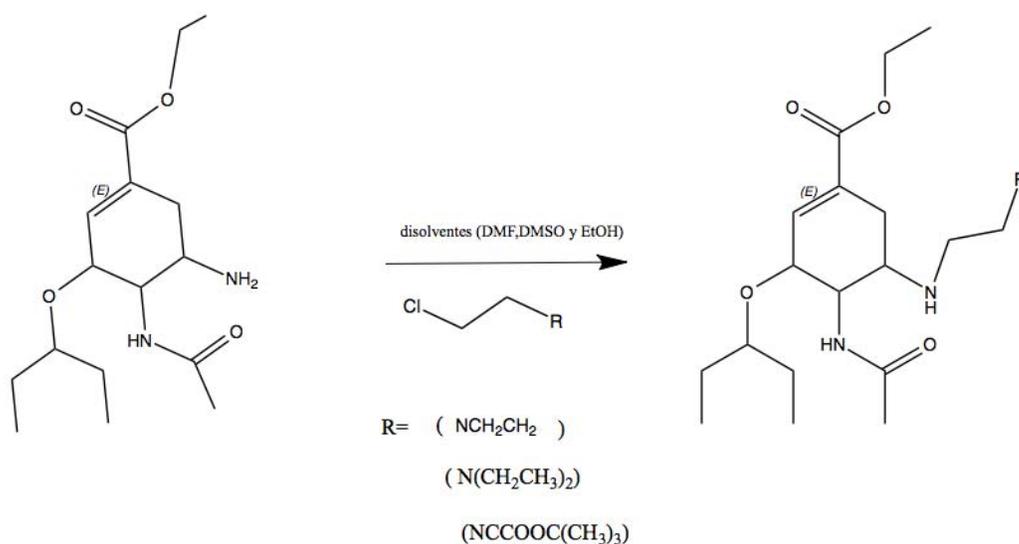


FIGURA 18 DERIVADOS DE OSELTAMIVIR QUE SE SINTETIZARON

Los resultados arrojados por el Docking mostraron la misma conformación que la que reportó Zhu-Qhi. Además encontramos que el derivado del Oseltamivir que hicimos con el grupo Boc hacía contacto con esta cavidad y tercero, porque además se cerró el sitio activo no sólo con el derivado del Oseltamivir en el que se

utilizó el clorhidrato de cloro-etilamina usando el grupo Boc para proteger esta parte de la amina, sino también los demás tuvieron un cierre del sitio activo significativo. A continuación se describen los resultados encontrados.

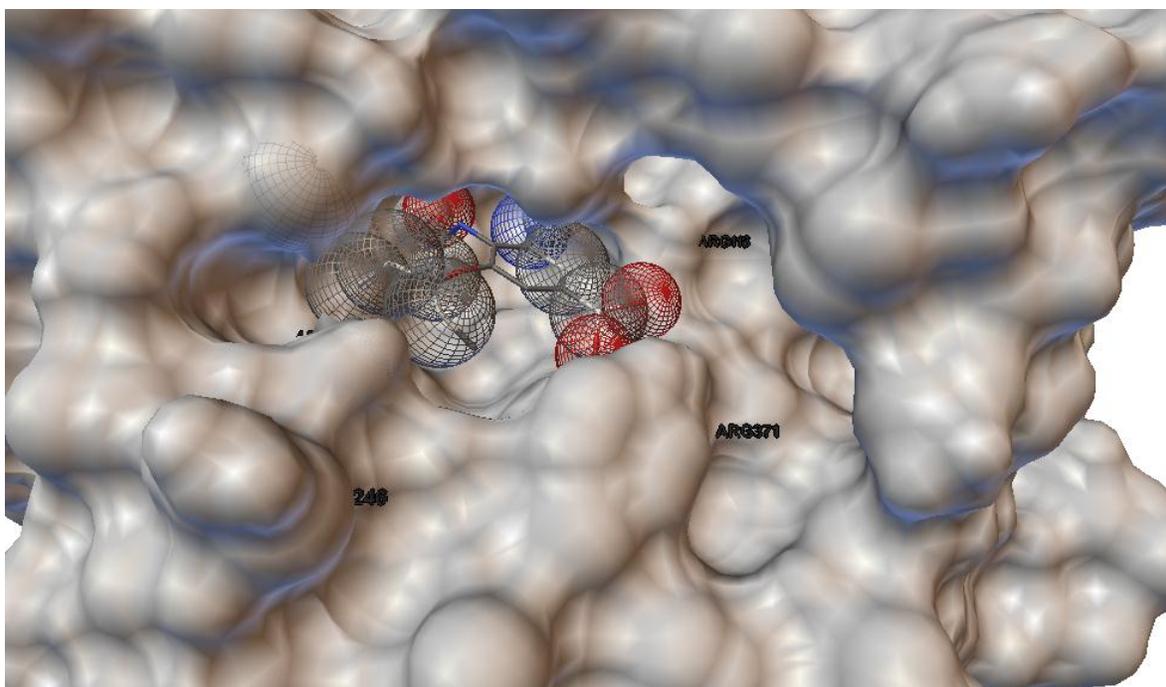
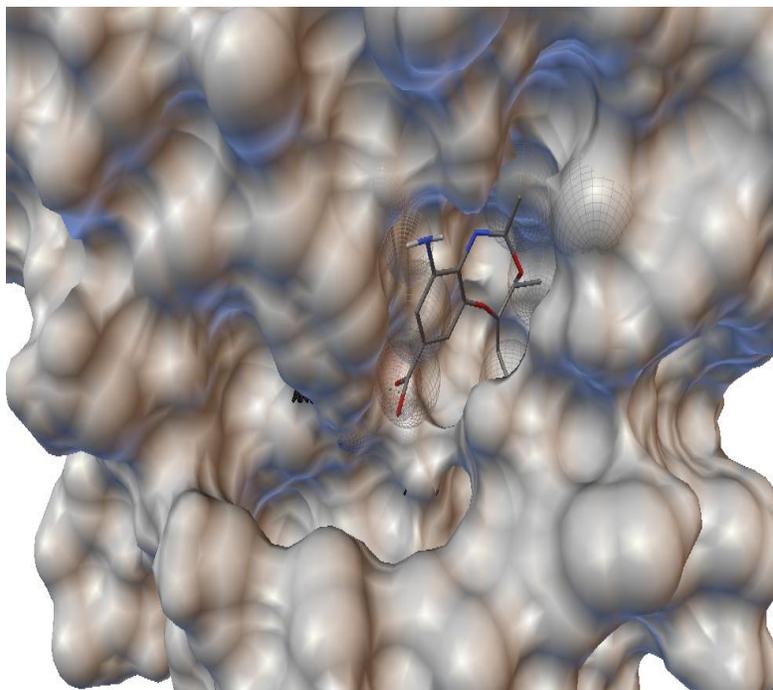


FIGURA 19 DOCKING DEL OSELTAMIVIR EN EL SITIO ACTIVO. EL DOCKING SE REALIZÓ CON AUTODOCK VINA Y COINCIDE CON EL DOCKING DEL OSELTAMIVIR QUE HIZO SHU-QUI WANG.

En la Figura 19 mostramos como con precisión se ubica el sitio activo y la cavidad 150 de la enzima Neuraminidasa. La figura puede ser comparada con los trabajos de Shu-QuiWang y puede verse la similaridad que hay en los dockings realizados. Una vez que se ubicó donde quedaba el sitio activo y la cavidad 150 procedimos

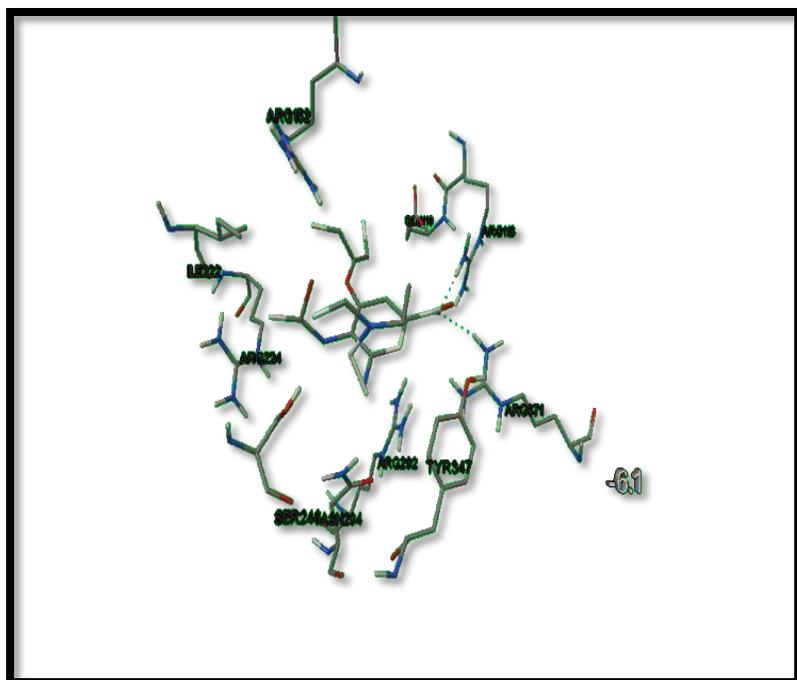
a estudiar como quedaban dispuestos los tres derivados de Oseltamivir que sintetizamos y además ver si estos derivados hacían contacto con la cavidad 150.

FIGURA 20 DOCKING DEL DERIVADO DE OSELTAMIVIR QUE CONTIENE EL GRUPO ETILENDIETILAMINA.



En la Figura 20 se ve como queda la conformación del derivado de Oseltamivir que contiene el grupo etil-N,N-dietililamina. Como se muestra no alcanza a tener una interacción con la cavidad 150.

Analizando sus interacciones más meticulosamente se puede observar de acuerdo a la figura 21.



a la figura 21.

Que las interacciones conservativas que presenta el Oseltamivir no se modifican. Lo

que si se alcanza a ver es que se forman dos puentes de hidrogeno en la Figura 20. Las interacciones por puente de hidrógeno las forma con Arg 118 y Arg 371. Las demás interacciones son de tipo Van der waals y las forma con los residuos de ILE22, ARG152, SER 248, ARG292, Arg 224 y tirosina 347. La energía es baja en comparación con el Oseltamivir ´por lo que la molécula no puede remplazar al Oseltamivir.

Figura 21. El derivado al que se le agregó el grupo n,n.dimetiletilamina presenta interacciones con ARG 371, ARG 292, TYR 347,ARG224, SER 248, ARG271, ILE 222,ARG 152 y puentes de hidrógeno con ARG 118Y ARG 371.

El siguiente derivado que se estudió fue el derivado de Oseltamivir con un grupo Etil-dimetil-amina. Su docking se muestra en la Figura 22 .

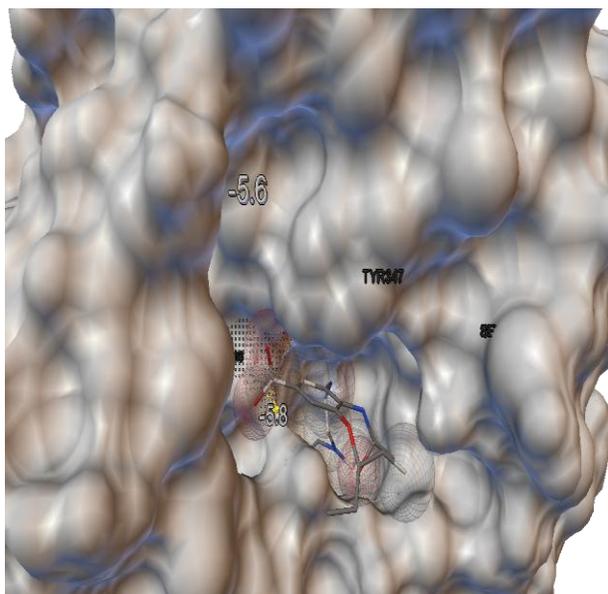


FIGURA 22 DOCKING DEL DERIVADO DEL OSELTAMIVIR CON EL GRUPO ETILDIMETILAMINA. SI SE ALCANZA A APRECIAR NO CUBRE LA REGIÓN DE LA CAVIDAD 150.

Nuevamente no alcanza a llegar a la zona de la cavidad 150, por lo que no muestra ser una buena opción al ser utilizado como antiviral aunque las interacciones conservativas con el

Oseltamivir se siguen presentando.

Finalmente se estudió como era la conformación del derivado del Oseltamivir con el grupo BOC. Se puede ver en la figura 23 que el grupo Boc alcanzó hacer contacto con la mitad de esta región. Algo que es bastante interesante es que la inserción de grupos carboxilatos hace que el derivado se oriente de la forma adecuada para hacer contacto con la cavidad 150. Además no solo presenta esta característica sino que también su energía de unión es aún más grande haciendo que sea una opción a ser usando como ligando contra este tipo de virus resistentes.

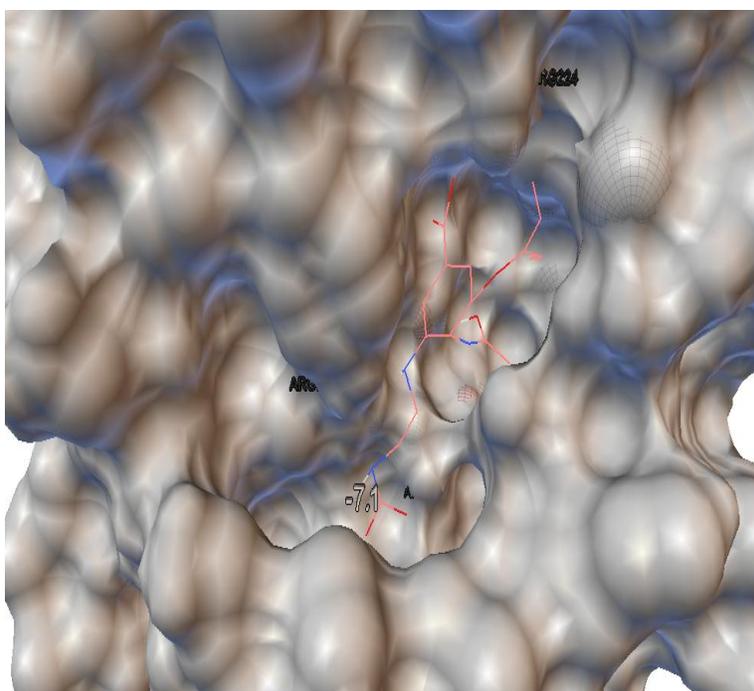


FIGURA 23 DOCKING DEL OSELTAMIVIR CON EL GRUPO CARBAMATO. EN ELLA SE ALCANZA A PRECIAR COMO CUBRE PARTE DE LA CAVIDAD 150 SIN DESCUIDAR LA PARTE DEL SITIO ACTIVO.

Así se ha encontrado un derivado de Oseltamivir que resulta eficiente

teóricamente para bloquear el sitio activo de la Neuraminidasa.

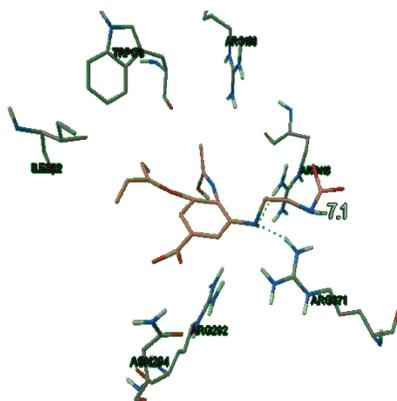


FIGURA 24 INTERACCIONES DEL DERIVADO DE OSELTAMIVIR CON EL GRUPO CARBAMATO EN ELLA SE VE LA FORMACIÓN DE PUENTES DE HIDRÓGENO CON LOS RESIDUOS DE ARG 371 Y ARG 118 E INTERACCIONES DE VANDER WAALS, LAS FORMA CON ARG 292, ASN 294, ILE 222, TRP 178 Y ARGININA 168.

Un examen más cuidadoso como se muestra en la figura nos enseña que debido al grupo carboxílico, se forman enlaces hidrógeno con Arg 118 y Arg 371. Además este grupo hace que ARG 118 y Arginina 371 se muevan de su sitio haciendo que el sitio activo se cierre. Este efecto indica que este derivado es un buen candidato a ser usando como ligando.

Conclusiones

Se sintetizaron 6 compuestos, tres de ellos derivados del Oseltamivir para estudiarlos como inhibidores de la Neuraminidasa.

Se logró establecer un método selectivo a la N-monoalquilación de aminas cloradas sin que se observaran reacciones de adición o eliminación clásicas de las reacciones de las N-monoalquilación.

Se estudió las interacciones que tienen los derivados de Oseltamivir con el sitio activo para encontrar aquellos que presentan interacciones más efectivas.

Bibliografía

- [1] Calore, E., Uip, E. and Perez ,N. 2010 Pathology of the swine –origin Influenza A (H1N1) flu. Pathology-Research and practice, V: 207, P.86-90
- [2] Shinh,H.,Tzong, H., Chang,C., Hsu, H., Wang., S., Liu, C., Ko , C., Wu, y., Chiu, Y., Sheu, B. and Chi., C. 2012 Impacts of Rapid Flu Clinic Services at emergency department during the pandemic flu season Vol.40 P. 165 a 169
- [3] Jones, C., J., Baranovich, T., Marathane, B.M, Danner, F. A., Seller.J.P. Franks, JGovorkova,E,A.,Kraus's. Webster, G. R.
- [4] Rachelle, S, Robert G. Webster 2009. The influenza virus enigma, Cell, v. 136, p 142-150.
- [5] Crusat, M., Jungfeg.,L., 2013, Changes in hemagglutinin of H5N1 viruses during Human Infection –Influence on receptor Binding ,Virology, 447, p 326 -327
- [6] Córdova Villalobos, Valdespino Gómez y Ponce de León, 2010, La epidemia de la Influenza A/H1N1 en México, Panamericana, p. xxx
- [7] Yamatsugu K., Yin Lian, Shin Kamijo, Kimura Y., Kana M, 2008, A synthesis of Tamiflu by using barium-Catalyzed Asymmetric Diels Alder Type Reaction
- [8] Wang S., Du Q., and et.al. 2009, Insights from Investigating the interaction of Oseltamivir with Neuraminidase of 2009 H1N1 Swine Flu Virus, Biochemical and Biophysical research communications V. 386 p 432-436.

- [9] Cheng, X., Shu-Qing Wang, Wei-li Dong, 2010 Three new powerful oseltamivir derivate for inhibiting the neuraminidase of influenza virus, *Biochemical and Biophysica Research Communications* v.401 p. 188-191.
- [10] Williams L., Tracie Pirkle, J., and Barr J., 2011, Simultaneous quantification of hemagglutinin and neuraminidase of influenza virus using isotope dilution mass spectroscopy, *Vaccine* 30 (2012) 2475 -2482.
- [11] Duwe, S., Schweirger B., 2008 A new and rapid genotypic Assay for the detection of Neuraminidase inhibitor resistant Influenza A virus of subtype H1N1, H3N2 and H5N1, *Journal of virological methods*,153 p 134 -141.
- [12] Ibrahim M., Eladl, A., Sultam, H., Arafa A., Razik A., Rahman S., El-Azm K., Saif Y., Lee, antigenic analysis of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses circulating in Egypt. (2006-2012).
- [13] Yongkiettrakul S., Nivitchangyong T., Pannengpetch Supitcha Wanitchang A., Jongkaewwattana A., Srimanote P., (2013) Neuraminidase amino acids 149 y 347 determine the infectivity and oseltamivir sensitivity of pandemic Influenza A /H1N1 (2009) and avian influenza A H5N1, *Virus Research* , V (175) p 128 -133
- [14] Ferraris O., Escuret V., Bouscambert Casalegno, j., Jacquot, Jea, S., Rauould Caro V., Valette M., Lina B., Ottman M., (2012), H1N1 Influeza A virus Neuraminidase modulate infectivity in mice, *Antiviral Research*, V. 93,p. 374-380
- [15] Nan,Co, Wang Z, Ye, C, Likai, T, Yei Z. Zhenpeng, C. ,Changwen K, Yugu li , Jie Wo, Wenbao Qi, Peirong Jiao, Guihung Zhang, (2013), *Avian Influenza A*

(H5N1), virus antibodies in pigs and residence of swine farms, southern china V . 58, p: 47-51

[16] Woo Young, Ji –Young–Shin, Hwan-Eui– Jeong, Mi-Jing-jeona, Su-Jin Kim, Joo-Yeon lee Chu Kang, (2013) Generation of and Characterization of recombinant Influenza A (H1N1) virus resistant to Oseltamivir. Oseng Public Health Res. Perfect, V:4 , p: 323-328.

[17] Achenbach, J., and Bowen, R., 2013 , Effect of Oseltamivir Carboxylate Consumption of Emergence of Drug- Resistant H5N2 Avian Influenza virus in Mallard Ducks, Antimicrobial Agents and Chemoterapy, V 57, p- 2171 -2181

[18] Burnham, J., Baranovich, T., and Govorkova, E., (2013), Neuraminidase Inhibits for influenza B virus infection Efficacy and Resistance, V. 100, p . 520-534.

[19] Ginting,T., Shinya, K., Kyan, Y., ,Makino, A.,Matsumoto, Naomi, Kaneda, K., Kawaoka,Y 2012, Aminoacids changes in Hemagglutinin Contribute to the replication of Oseltamivir –Resistant H1N Influenza virus, Journal of virology, V.86, p 121.

[20] Varghese, J., Smith, W., Sollis, S., Blick, Tony, Sahasrabudhe, Anjali., Breschkin., and Colman Peter. 1998, Drug against a shifting target a structural basis for resistance to inhibitors in a variant of influenza virus neuraminidase, Structure,V.6, p 735-746.

[21] Rusell, R., Haire, Lesley, Stevens, David, Collins, Patrick, Lin, Yi, Blackburn, G., Hay, A., Gamblin, S., and Skehel. J., 2006, The structure of H5N1 avian

influenza neuraminidase suggest opportunities for drug design, *Nature*, V. 443. P 45-49.

[22] Collins, P.J, Lin, Y.P, Liu, R.J, Russell.R.J. P.A. Walker, Martin, S.R., Daniels. R.S, Gregory, V, Skehel, J.J , Gamblin, S.J. A.J. Hay (2009) *Vaccine*, V.27, p 6317-6323.

[23] D ´Souza, C, Kanyalkar, M., Joshi, M., Coutinho, E. and Strivastava, S. 2009, *Biochimica et Biophysica Acta*, V 1788, p 484-494.

[24] Yamatsugu, K., Yin, L., Kamijo, S., Kimura, Y., Kanai, M., and Shibasaki M., 2009, A Synthesis of tamiflu by Using a Barium Catalized Asymmetric Diels Alder Type Reaction, V 48, p 1070-1076.

[25] Talavera, A., (1999), Historia de una enfermedad, *Revista Biomedica*, V 10, p. 57-61.

[26] Jones, C., Baranovich, T., Marathe, B., Danner, A., Seiler, J., Franks, J., Govorkova, K., Webster., Robert.(2014), Risk Assessment of H2N2 Influenza Viruses from Aviar Reservoir *Journal of virolog* , V. 88, p 1175-1188.

[27] Kilbourne, E., (2006), Influenza Pandemics of the 20th Century, *Emerging Infectious Diseases*, V. 12, p. 6 al 14

[28]Department of Health and Human services (2009 Assessment of the 2009 Influenza A (H1N1) Pandemic on Selected Countries in the Southern Hemisphere: Argentina , Australia, Chile , New Zeeland and Uruguay p 1-30.

- [29] Cordova Villalobos, Valdespino Gómez y Ponce de León, 2010 Biología del virus de la Influenza, La epidemia de la Influenza A/H1N1 en México, Panamericana, p. 4-12.
- [30] Kapor, Sanjay, Dhama, Kuldeep, 2014, Insight into Influenza Viruses of Animal and Humans, Springer , p 7-12.
- [31] Racaniello, V., (2009) Influenza virus RNA Genome, Virology blog about viruses and viral disease, <http://www.virology.ws/2009/05/01/influenza-virus-rna-genome/> 21 de mayo del 2009
- [32] Matsuoka, Y., Matsumae, H., Katoh, A., Einfeld, A., Neuman, G., Hase, T., Ghosh, S., Shoemaker, J., Lopes, Tiago., Watanabe., T., Watanabe., S, Fakuyama. y Kawaoka Y.
- [33] Yoshioka, A., Fukusawa., K., Mochizuki, Y., Yamashita, K., Nakano , T., Okiyama, Y., Nobusawa., E., Nakajima, K., Nakajima, y Tanaka, S. (2011) Prediction of probable mutations in influenza virus hemagglutinin protein base don large scale ab initio fragment molecular orbital calculations. Journal of molecular graphics and Modelling . v 30, P 110 a 119.
- [34] Bouvier, M. and Palese Peter 2008, The biology of influenza viruses, Vaccine.
- [35] Webster, R. and Govorkova, Elena (2006), H5N1 Influenza – Continuing Evolution and Spread, New England Journal of Medicine, V. 355, p 2179-2186.

- [36] Hien T., Liem T., Dung T., San,T. and Horby, P. (2004) Avian Influenza (H5N1) in 10 patients in Vietnam. The new England Journal of Medicine, V.350, p1179-1188
- [37] Moscona A. 2005 Oseltamivir Resistance –Disabling Our Influenza Defenses, The New England Journal of Medicine, v353 p 2636. 2667.
- [38] Bohn,J and Schneider, G 2003 Prediction of non bonded interactions, Methods and principles in medicinal chemistry , Vol.19 p 1-15.
- [39] Yang, Z ., Nie, Y., Yang , G., Zu, Y, Fu, Y. and Zhou Lijun, 2010 Synergistics effects in the desings of neuraminidase ligands: Analysis from docking and molecular dynamics studies, Journal of theoretical Biology V. p267 363-374
- [40] Saladeem P., Gogoi, D., Bezbarauh, R., Bordoloi, M. and Barua and N., Virtual (2013) screenin on potential Neuraminidase inhibitors of influenza A virus H1N1 Drug Invention today, p241-245.
- [41] Park, J. and Jo, W. 2010 Computational design of novel, high-affinity neuraminidase inhibitor for H5N1 avian influenza virus V. 45, p 536-541
- [42] Liu Y., Jing, F ., Xu, Y., Xie Y., Shi, F., Fang H., Li , M. and Xu Wenfang, 2011 Desing, synthesis and bilogoical activitry of thiazolidine -4-carboxylic acid derivates as novel influenza neuraminidase inhibitors, Biorganic and medicine Chemenistry, V19 p 2342-2348

[43] Xue, S., Ma, L., Gao R., Li, Y and Li, Z Synthesis and antiviral activity of some novel indole -2-Carboxylate derivates 2014, Acta Paharmaceutica Sinica B.

[44] Yamatsugu K., Yin, L., Kamijo, S., Kimura, Y., Kanai, Mg/ml and Shibasaki Masakatsu (2009) A synthesis of tamiflu by using a Barium Catalyzed Asymmetric Diels -Alders Type Reaction v 48 p 1070 a 1076.

[45] Salvatorre ,R., Yoon, H. y Jung, K. Synthesis of secondary amines, Tethahedron, V. 57 paginas 7785-7811.