

# Diseño de Agentes Antivirales de Acción Directa inhibidores de la Proteasa de Serina NS3-4A y la Polimerasa NS5B RNA dependiente para el tratamiento de Hepatitis C mediante acoplamiento molecular

HIRAM O. DELGADILLO VERDEJA, SONIA GEORGINA DEL RAZO LONGORIA, BEATRIZ LETICIA LÓPEZ ESCAMILLA, GRECIA CORBALÁ MARTÍNEZ

**Resumen**—La Hepatitis (inflamación del hígado) es causada por varios tipos de virus y en ocasiones es causado por alcohol o medicamentos. El HCV codifica una única poliproteína (NH<sub>2</sub>-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH) que es de aproximadamente 3.010 aminoácidos. Este procesamiento proteolítico de la poliproteína durante y después de la traducción por el anfitrión y proteasas virales producen al menos 10 proteínas virales maduras. Los avances en biología molecular han permitido el diseño y desarrollo clínico de diferentes moléculas, cuyas dianas terapéuticas son proteínas virales específicas del ciclo del HCV (proteasa NS3/4A, NS5B polimerasa, NS5A). A estas moléculas se les llama colectivamente Agentes Antivirales de Acción Directa.

Con este trabajo se buscó mejorar las propiedades farmacodinámicas, más específicamente las inhibitorias, que permiten la reducción o detención de la replicación del virus de la Hepatitis C. Se logró mediante la modificación estructural de fármacos ya presentes en el mercado o en fase 3 que inhibieran la actividad de la proteasa NS3-4A y la polimerasa NS5B RNA dependiente.

Se diseñaron computacionalmente nuevas moléculas a partir de las investigadas previamente y se revisaron sus propiedades farmacodinámicas mediante programas en línea que proporcionan información de las moléculas según su estructura como lo son: Osiris, Molegro y Molinspiration; a partir de los cuales se obtuvieron los datos farmacodinámicos. Se eligieron las moléculas que cumplen con el objetivo del trabajo.

Sólo 3 moléculas demostraron ser mejores que las moléculas muestra y aún mejor, 2 de esas moléculas resultaron afines a proteasa y polimerasa siendo inhibidor de ambas enzimas con lo que se pueda pensar en un tratamiento mucho más efectivo, ya que se usaría un fármaco para las dos proteínas en lugar de dos.

## I. INTRODUCCIÓN

El genoma del HCV está compuesto por una única cadena lineal de RNA con sentido positivo. Ésta tiene una longitud cercana a los 9,7 Kbp. El RNA viral se comporta como RNA

mensajero y su traducción produce un precursor poliproteico de 3000 aminoácidos (NH<sub>2</sub>-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOH) aproximadamente, a partir del cual, se generan las distintas proteínas funcionales, estructurales y no estructurales, por modificación cotraduccional.<sup>2</sup>

Se han descrito 6 genotipos diferentes de HCV. Las zonas con más variación están ubicadas en la porción aminoterminal de la proteína E2. Zonas designadas como regiones hipervariables 1 y 2 (HVR1 y HVR2).<sup>2</sup>

En un paciente infectado, coexisten varias formas genómicas del HCV denominadas cuasiespecies. Se encuentran relacionadas entre sí pero son ligeramente diferentes en la secuencia de sus bases nitrogenadas. La aparición de cuasiespecies se debe a una característica de la RNA polimerasa viral y su incapacidad de corregir errores en la incorporación de nucleótidos durante el proceso de replicación lo que facilita la aparición de mutaciones puntuales.<sup>2</sup>

Se presentan dos regiones: una estructural y otra no estructural. La primera es capaz de codificar las proteínas de la cápsida (C) y las gp31 y gp70 (E1 y E2) de la envuelta.<sup>4</sup> A continuación, se encuentra la región HVR2. E1 y E2. Se relacionan físicamente entre sí para desempeñar un papel importante en la fijación del virus y su entrada en las células diana.<sup>4</sup>

La segunda región, no estructural, codifica para toda una serie de enzimas con acción proteasa, helicasa, RNA-polimerasa dependiente de RNA, etc. Dentro de esa región, es importante reseñar el papel de NS3 y, sobre todo, NS5 por presentar el sitio de unión a la PKR (proteína-cinasa) y la zona ISDR (región determinante de la sensibilidad al interferón), ambas implicadas en los fenómenos de variabilidad y resistencia al tratamiento.<sup>4</sup>

Es importante la enorme variabilidad en la secuencia de aminoácidos de regiones de E2 o NS5A. Esta variabilidad puede generarse a través de mecanismos de selección específicos que operan en el virus y que están asociados con escape del sistema inmune. Por ejemplo, la región HVR en E2 puede ser blanco de anticuerpos neutralizantes y la

Hiram O. Verdeja, Georgina Del Razo Longoria, Beatriz López Escamilla, Grecia Corbalá Martínez pertenecen a la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo de la Facultad de Ciencias Químicas y realizaron el proyecto dentro del curso de Farmacología Molecular (hiramv16@gmail.com). El proyecto fue asesorado por el Dr. Marco Antonio Loza. Los autores agradecen a: El Dr. Marco A. Loza que nos brindó los conocimientos, apoyo y tiempo para llevar a cabo este proyecto dando el debido seguimiento a cada etapa.

persistencia entonces requiere variaciones continuas de la secuencia viral para evadir la respuesta de células B.4

### Ciclo vital del virus (Mecanismo de acción)

Las glicoproteínas de la envoltura (E1 y E2) son componentes estructurales del virus. Constituyen la capa externa de finas proyecciones en forma de espiga de la particular de HCV.15

Se requieren ambas glicoproteínas de la envoltura para la entrada a célula huésped a través de la unión al receptor.5

Las proteínas estructurales (núcleo, E1 y E2) y la proteína p7 se liberan de la poliproteína tras la escisión por acción de las peptidasas dada la señal del retículo endoplasmático (ER) del huésped.5

Las proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, y NS5B) son ecendidas por las proteasas virales NS2-3 y NS3-4A. Este procesamiento proteolítico de la poliproteína durante y después de la traducción por el anfitrión y proteasas virales producen al menos 10 proteínas virales maduras.5

Las secuencias 5'-y 3'-NTR's del genoma son altamente conservadas y contienen elementos de control para la traducción de la poliproteína viral y la replicación.5

El IRES se requiere para la traducción cap-independiente del RNA viral, que se lleva a cabo por el ribosoma celular del anfitrión. El dominio III d de la IRES constituye el sitio de anclaje clave para la subunidad 40S. Se informó que la proteína central del HCV interactúa con el 5'-NTR de cadena positiva.5

### Tratamiento actual

#### *Inyección de Interferón alfa-2a y alfa-2b*

Los interferones son glicoproteínas que son secretadas por células de vertebrados infectadas por virus. Después de unirse a receptores de superficie de otras células, los interferones se convierten en un estado antiviral, que impide la replicación de una amplia variedad de virus de ARNs y ADN. Existen tres familias de interferones: tipo  $\alpha$  o interferón de leucocitos (células blancas de la sangre), el tipo  $\beta$  o interferón del fibroblasto (que son las células del tejido conectivo), esta familia está muy relacionada con la  $\alpha$  y el tipo  $\gamma$  o interferon del linfocito (células del sistema inmune).6

Este medicamento se administra para impedir que las células tumorales o los virus se desarrollen dentro de su cuerpo. Este medicamento no funciona para todos los pacientes, sin embargo algunos pacientes responderán al medicamento mejor que otros.9

Además cerca del 50% de los pacientes no son aptos para el tratamiento con interferón, y de los aptos, menos de dos tercios de los que presentan el genotipo 1, consiguen llegar a la curación (RVS). Además, los efectos adversos graves derivados del uso de interferón, tales como insuficiencia cardíaca, sepsis, leucopenia, depresión, pérdida de visión, etc, hacen que el cumplimiento terapéutico sea bajo, con lo cual muchos pacientes no alcanzan la curación por falta de adherencia al tener tantos efectos secundarios.7, 8

### Nuevos tratamientos

En la actualidad, existen moléculas en desarrollo conocidas en inglés como “specificity targeted antiviral therapies for

HCV” (STAT-C) o como “direct-acting antivirals” (DAA), o sea, antivirales que actúan directamente.1

A) Inhibidores del sitio de entrada del virus en la célula huésped.1

B) Inhibidores de los sitios de entrada ribosomales internos (internal ribosomal entry site – IRES).1

C) Agentes de replicación del RNA que incluyen los siguientes.1

1) *Inhibidores de las proteasas*: Bloquean la serín proteasa, en particular la porción NS3/4 A, y bloquean el proceso de la poliproteína dependiente de la proteasa impidiendo la replicación viral. El más prometedor en estos momentos es el telaprevir o VX-950. 1

2) *Inhibidores de la polimerasa*: Actúan sobre la RNA polimerasa dependiente en la región NS5B y se dividen en dos grupos.1

a) *Nucleósidos*: inhiben directamente el sitio de actividad con lo que ocasionan la terminación de la cadena.1

b) *No-nucleósidos*: Llevan a cabo una inhibición alostérica en la superficie de la enzima cerca de su sitio activo, lo cual ocasiona un cambio conformacional de la proteína y su función.1

3) *Inhibidores de la función de la proteína NS5A*: Se trata de una proteína no estructural multifuncional que carece de actividad enzimática y actúa sobre la replicación del RNA y el ensamblaje viral.1

### Dianas Biológicas

Las proteínas del virus de la hepatitis C están asociadas a membranas del retículo endoplasmático, donde tienen lugar varios procesos de alteración/interacción necesarios para garantizar el ciclo replicativo del virus. De ahí que dichas proteínas posean regiones implicadas en dichos procesos, cuyas secuencias son conservadas en la mayoría de las especies.4

Las diferentes regiones membranotópicas estudiadas son segmentos necesarios y esenciales para que las proteínas nativas interactúen directamente con la membrana y de esa manera el ciclo replicativo del virus funcione eficazmente. Como contrapartida, si estas regiones no interactúan con la membrana, el proceso de replicación del virus podría alterarse o incluso anularse y por ello el virus perdería su capacidad de replicación dentro de la célula hospedadora.4

### Proteasa de serina NS3-4A

La proteína NS3 del HCV es una enzima multifuncional ya que presenta, en el primer tercio (N-terminal) de su estructura, actividad de proteasa de serina y en el resto, función de RNA helicasa que revierte el enrollamiento de cadenas dobles de RNA. El extremo N-terminal de NS3 presenta un plegamiento típico de la familia de las quimioproteasas.3

La proteína adopta un pliegue-quimioproteasa con la tríada catalítica formada por residuos His57, Asp81 y Ser139. En este complejo, el dominio de proteasa tiene la misma

conformación que en un complejo de NS3 de longitud complete con el péptido NS4A.3

El péptido se intercala en el dominio N-terminal y forma una cadena de la  $\beta$ -barril N-terminal con la cadena  $\beta$  NS3 N-terminal A0 y  $\alpha$ 0 hélice empaquetada contra ella. Por lo tanto, el dominio N-terminal debe someterse a reordenamiento sustancial, así como los cambios adicionales en el sitio activo que optimizan la ubicación de los residuos His57 y Asp81 relativos a Ser139 3

### Polimerasa NS5B RNA dependiente

El virus accede al interior del hepatocito por unión a receptores de su superficie, dos presuntos receptores del HCV son el CD81 y el SR-BI. Una vez que se ha infectado la célula y se ha desencapsidado, la region IRES, se promueve la traducción de la región codificante para dar lugar a la poliproteína, que es procesada para generar las proteínas maduras. De ellas, la proteína NS5B, al presentar actividad RNA-polimerasa dependiente de RNA (RdRp), es la pieza central de la maquinaria replicativa que usa el genoma viral como molde para la transcripción de una molécula de RNA complementaria de cadena negativa.9

La cadena negativa sirve como molde para la síntesis de nuevas moléculas de RNA de polaridad positiva, que pueden ser empleadas para traducirse, replicarse o bien empaquetarse en los virus progenie.

Finalmente, la progenie viral es encapsidada en asociación con membranas intracelulares y alcanza el medio extracelular a través del aparato secretor de la célula.9

Un hecho que diferencia la actividad de las maquinarias replicativas de los virus RNA respecto a las maquinarias celulares, es la fidelidad de copia de cada una de ellas. Así, las DNA polimerasas celulares son consideradas maquinarias muy fieles, mientras que las RNA polimerasas virales presentan tasas de error mucho mayores. La polimerasa del HCV (NS5B) no presenta actividad correctora de errores.9

Los medicamentos que actúan sobre esta enzima, causan que la polimerasa los reconozca como parte de la estructura del RNA, debido a su alta tasa de error y las intercale en el proceso y al hacer esto la replicación del virus ya no se puede llevar a cabo.9

Estos factores son los que motivan a hacer investigaciones más profundas para diseñar nuevos fármacos con mayor eficacia y que mejoren este tipo de problemas.

## II. METODOLOGÍA

Se realizó una investigación bibliográfica acerca de la Hepatitis C, sus dianas biológicas, así como los tratamientos vigentes. A partir de la diana biológica, se seleccionaron las proteínas a estudiar; gracias a las herramientas bioinformáticas como: Chemscketch, Osiris Property Explorer, Molinspiration, Molegro Molecular Viewer y Molegro Virtual Docker se realizaron las modificaciones estructurales de las moléculas seleccionadas para probar su acoplamiento molecular como ligando con las distintas proteínas virales. Ofreciendo así propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas más atractivas.

El programa Molegro Molecular Viewer proporciona resultados de acoplamiento que consta de posiciones de alta puntuación. El proceso realizado por este último programa se le conoce como acoplamiento molecular. Entre más negativo sea el resultado de afinidad mayor será el acoplamiento.

El acoplamiento entre proteína y ligando se llevó a cabo en las estructuras cristalinas de 2 de las enzimas más importantes en el ciclo de replicación del virus: proteasa de serina NS3-4<sup>a</sup> y polimerasa NS5B RNA dependiente. Los cálculos de acoplamiento molecular para todos los compuestos con cada enzima se llevaron a cabo en Molegro Virtual Docker v. 6.0.1, con una esfera (15 Å de radio). Se usaron estados de protonación estándar de las proteínas basadas en pH neutral para el estudio. Cada proteína se usó con modelo de estructura rígida. No se implementó relajamiento de la proteína. Se usaron modelos flexibles de ligando en el acoplamiento y en el esquema de optimización subsecuente.

Distintas orientaciones de los ligandos se buscaron y clasificaron basados en sus marcadores de energía. El algoritmo del acoplamiento se estableció en 5000 como máximo de interacciones y un mínimo de 25 corridas por ligando.

Las modificaciones estructurales fueron hechas en base a formar más puentes de hidrógeno y/o interacciones pi-pi y sigma-pi.

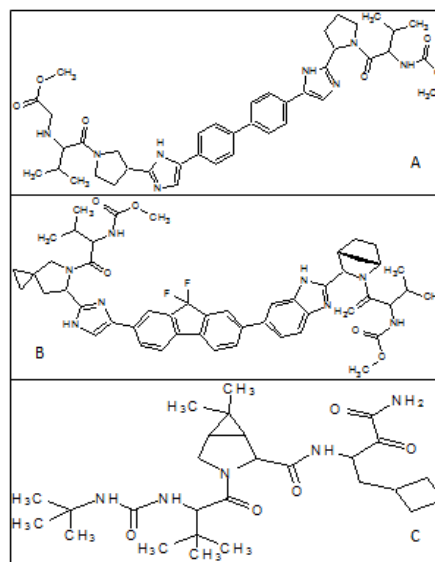


Fig. 1 moléculas originales para: Polimerasa NS5B RNA dependiente 1 (A), Polimerasa NS5B RNA dependiente 2 (B), Proteasa de serina NS3-4A (C).

## III. RESULTADOS

Se implementaron varios cambios a las moléculas muestra que ocupamos, y después de realizar todas las pruebas computacionales pertinentes (Osiris, Molegro Molecular Viewer y Molinspiration) se observaron los datos farmacocinéticos de estas moléculas.

Para realizar la molécula modificada PP1-2 se tomó como base el fármaco que inhibe la polimerasa, se acopló con las dos proteínas, sin embargo en los resultados de Molegro (ver tabla 1) observamos que no es tan afin a la polimerasa como la

original, pero si muestra mayor afinidad que el fármaco utilizado para la proteasa. Siguiendo el mismo criterio para la evaluación de estas moléculas observamos que PP1-3 tiene mayor afinidad que las moléculas originales con los dos receptores.

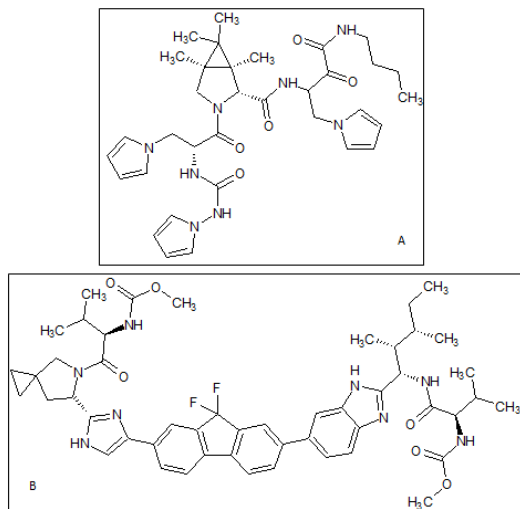


Fig. 2 Polimerasa modificada (POL) (B), Proteasa modificada (PRO) (C).

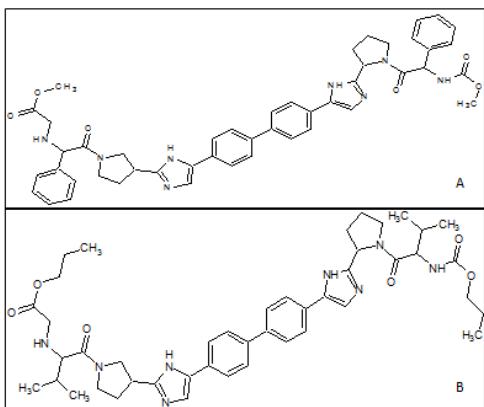


Fig. 3 Polimerasa proteasa 1-2 (PP1-2) (A), Polimerasa proteasa 1-3 (PP1-3) (B).

Molécula	Drug-score OSIRIS	Tipo de receptor potencial		Afinidad por el receptor		Riesgos de toxicidad OSIRIS	Log P	PM
		MOLI		MOLEGRO				
		Protease inhibitor	Enzyme inhibitor	Rerank PRO	Rerank POL			
PRO ORIGINAL	0.11	1.41	0.31	-99.5724		tumorigénico e irritante	1.8	150.7
POL ORIGINAL	0.13	-0.64	-1.66		-114.732		7.98	736.87
PP 1-2	0.11	-0.69	-2.9	-134.985	-111.717		5.33	804.91
PP1-3	0.08	-1.24	-2.47	-135.827	-138.296		9.16	792.98
PRO MODIFICADA	0.13	0.35	-0.38	-126.786		tumorigénico e irritante	1.42	645.8
POL MODIFICADA	0.02	-2.68	-3.66		-156.334	irritante y efecto reproductivo	8.82	913.04

Tabla 1. Resultados de las moléculas modificadas.

El log P es un factor que afecta a la absorción de fármaco, es un balance hidrofilia/lipofilia. Para que un fármaco pueda ser absorbido

correctamente por el organismo debe estar en un rango de 1-3. Menor a 1 quiere decir que es muy hidrofílico, mayor a 3 quiere decir que es muy lipofílico. El fármaco debe estar en su forma neutra para que atraviese las membranas lipofílicas que son poco polares y además debe solubilizarse en ambiente acuoso para poder ser metabolizado.

En la tabla 1 se aprecia que la POL original tiene un log P de 7.98; la PP1-2 de 5.33; la PP1-3 de 9.16 y los demás se encuentran en el rango aceptable.

Esto podría verse como un problema, sin embargo existen los profármacos que son una estrategia que se usa cuando el fármaco tiene problemas de solubilidad o absorción, la cual consiste en agregarle un modificador que mejora las propiedades de absorción. La nueva estructura carece de actividad biológica, es por eso que debe biotransformarse en el organismo en la molécula original.

#### IV. CONCLUSIONES

Se observaron interacciones importantes con los aminoácidos Asp 527, Thr 40, Thr 433 y Gln 526. Esta última presentaba también varias interacciones sigma-pi. Esto se mostró en nuestras moléculas de polimerasa y proteasa creando así la posibilidad de que estas interacciones tengan que ver con el efecto y afinidad de estas moléculas.

Se diseñaron computacionalmente nuevas moléculas a partir de las investigadas previamente y se revisaron sus propiedades farmacodinámicas mediante programas en línea que proporcionan información de las moléculas según su estructura como el Osiris, Molegro y Molinspiration; a partir de los datos farmacodinámicos obtenidos, se eligieron las moléculas que cumplen con el objetivo del trabajo.

El diseño de fármacos por computadora resulta de gran importancia en el campo de la farmacología, ya que es una herramienta accesible que da pie a la mejora e innovación de moléculas. También se ahorra tiempo y esfuerzo debido a que sólo se eligen a las que posiblemente vayan a tener gran impacto en el tratamiento de enfermedades, en este caso del virus de la hepatitis C.

Después del diseño computacional se pueden idear rutas sintéticas para fabricarlos y posiblemente en un futuro, incluir los nuevos fármacos al mercado.

El diseño y síntesis de nuevos fármacos tienen gran importancia clínica ya que la eliminación de interferón inyectable de los tratamientos de la hepatitis C es una prioridad por su prolongada duración del tratamiento, los efectos adversos que presenta y la incomodidad que supone para el paciente tener que inyectarse.

#### REFERENCIAS

- [1] Cisneros, L. (2011). Nuevos avances en el manejo de la Hepatitis C. Salud Pública de México, 52-60.
- [2] Porto, L. et. Al. (2006). Mecanismos de evasión inmunitaria del Virus de Hepatitis C. Revisión. . Scielo. 6
- [3] Bermudez, A. (2008). Función de la proteasa ns3 del virus de la hepatitis C. Redalyc. 79-84. México.
- [4] Palomares, M. Caracterización biofísica de las regiones membranotrópicas de las proteínas no estructurales NS5A y NS4B del virus de la hepatitis C. Instituto de Biología Molecular y Celular Universidad Miguel Hernández de Elche. España.
- [5] Micheloud, D. El virus de la hepatitis C. Recuperado el 6 de marzo 2015 de <http://epidemiologiamolecular.com/virus-hepatitis-vhc/>

- [6] Vázquez-Contreras, E. Interferón. [en línea] Recuperado de: <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/interferon.html>
- [7] Braslavsky, G. Tratamientos sin interferón en Argentina. [en línea] Recuperado el 6 de marzo 2015 de <http://higado.net/>
- [8] Inyección de Interferón alfa-2a y alfa-2b. [en línea] Recuperado el 6 de marzo 2015 de [http://www.theoncologyinstitute.com/pdfs/chemotherapy\\_drugs/spanish/Roferon-A%20-%20interferon%20alfa-2a%20SPANISH.pdf](http://www.theoncologyinstitute.com/pdfs/chemotherapy_drugs/spanish/Roferon-A%20-%20interferon%20alfa-2a%20SPANISH.pdf)
- [9] Virus de RNA +: Virus C (HCV) [en línea] Recuperado el 7 de marzo 2015 de <http://www.somosmedicina.com/2008/09/virus-de-rna-virus-c-hev.html>