

OBJETIVOS PARA EL DISEÑO DE AGENTES ANTIVIRALES

Federico Gómez de las Heras
Instituto de Química Médica, CSIC
Juan de la Cierva, 3. 28006 Madrid

Las infecciones virales son responsables de enfermedades humanas tan frecuentes como el resfriado común, producido por rinovirus; la gripe, producida por virus influenza; las varias enfermedades producidas por virus herpes y virus hepatitis o tan temibles como las producidas por algunos retrovirus, tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), responsable de la enfermedad del SIDA o algunos virus oncogénicos.

1. EL PROCESO INFECTIVO VIRAL

El proceso infectivo mediante el cual tiene lugar la replicación del virus es complejo y varía según el tipo de virus. Sin embargo, un esquema general de dicho proceso infectivo consta de las siguientes etapas:

1. Adsorción del virus sobre la membrana celular. Se cree que requiere el acoplamiento de receptores complementarios por parte del virus y de la célula. En la Fig. 1, se ilustra el caso particular del proceso infectivo del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (1,2,3,4). En este caso los receptores parecen ser la glicoproteína gp120 por parte del virus y una glicoproteína, denominada T4 o CD4 de 62 Kd, por parte de los linfocitos T4, que son las células hospedadoras.

2. Penetración. No se conocen bien los mecanismos, pero se ha sugerido que en los virus con cubierta lipídica (Fig. 1) ésta se fundiría con la membrana celular y los que carecen de dicha cubierta fijarían iones calcio, que facilitarían la entrada del virión en la célula debido al gradiente de iones Ca^{++} .

3. Descapsidación. Consiste en la pérdida de la cubierta proteica o cápsida para dejar libre el genoma viral en el citoplasma celular. En el caso del HIV se cree que el virus libera dos subunidades idénticas de RNA genómico junto con la enzima transcriptasa inversa.

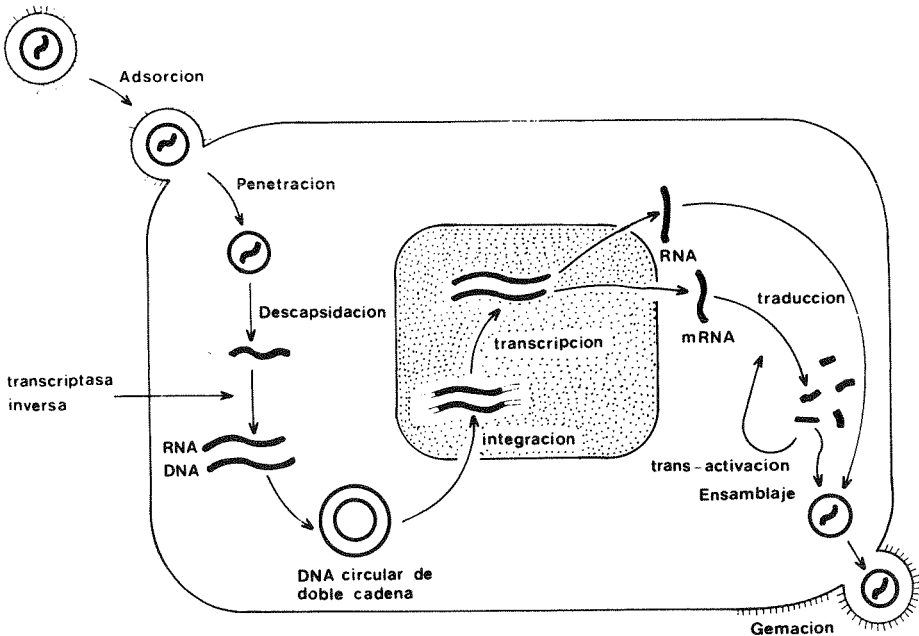


FIG. 1.-Ciclo replicativo del virus HIV

4. Expresión genética. Esta fase es muy diferente de unos virus a otros, debido a la variedad de genomas virales, pero sus fines fundamentales son: a) la replicación del genoma viral necesario para la morfogénesis de nuevos viriones, y b) la síntesis de las proteínas virales. En el caso concreto del virus HIV (Fig. 1), el RNA genómico se transcribe mediante la transcriptasa

inversa para dar una única cadena de DNA negativo, que forma un híbrido RNA-DNA. La misma transcriptasa inversa degrada la cadena de RNA de dicho híbrido y cataliza la producción de una cadena de DNA positivo, con lo que eventualmente se forma un DNA de doble cadena. Este DNA se circulariza y puede permanecer de forma no integrada o puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora. A partir de aquí los genes virales, integrados en el genoma celular, se expresan mediante la maquinaria enzimática celular para dar RNA genómico mRNA y proteínas virales. No obstante, la proteína sintetizada a partir del gen tat-III de HIV incrementa y facilita la expresión genética viral. Las proteínas virales sintetizadas se procesan mediante ruptura proteolítica y glicosilación.

5. Morfogénesis. Las proteínas y ácidos nucleicos sintetizados en la fase anterior se ensamblan quedando los segundos empaquetados en las primeras. La información necesaria para formar las cápsidas de la forma y el tamaño característico de cada virus se halla contenida en las mismas proteínas que forman la cápsida.

6. Salida del virus al exterior. La salida se produce mediante lisis celular o, como en el caso del virus HIV, por gemación. Normalmente la célula infectada, si no se produce la lisis de la misma, se degenera y muere. La enfermedad se manifiesta cuando muere un número suficiente de células.

Otros virus, y sus ciclos replicativos, son muy diferentes. Las principales diferencias están en la naturaleza de su genoma viral (DNA, RNA) y por tanto en el procedimiento que siguen para sintetizar su mRNA, en la presencia o ausencia de cubierta viral, en el tamaño y la simetría. Las características de los distintos virus están recogidos en una serie de libros (5-8).

Debido a la simplicidad estructural de los virus y a que utilizan la maquinaria enzimática celular para su replicación, resulta muy difícil producir una toxicidad selectiva, es decir,

producir la inhibición de un proceso viral sin inhibir el proceso celular análogo. Por ello, la búsqueda de agentes antivirales exige el conocimiento de las posibles diferencias entre los procesos virales o de células infectadas por virus y los procesos de células sin infectar. En la medida en la que sea posible interferir única o preferentemente dichos procesos virales o de células infectadas, con poco o ningún daño de la célula sin infectar, se estará cumpliendo el requerimiento fundamental de la quimioterapia antiviral: Selectividad.

A continuación, se enumeran algunos procesos que tienen lugar durante la replicación del virus, ya sea HIV o de otro tipo, que por presentar diferencias con respecto a los de la célula no infectada, ya sean de funcionamiento, debidas a la presencia de enzimas virales singulares o exclusivas o de algún otro aspecto característico, son susceptibles de una interferencia selectiva, y por tanto son objetivos para el diseño de agentes antivirales. Esta enumeración no pretende ser exhaustiva y se limita a algunos de los procesos que, por ser conocidos aunque no siempre con detalle, permiten la preparación de hipótesis de trabajo que están siendo aprovechadas o exploradas en la actualidad. Sobre este tema existe bibliografía (5-11).

2. INHIBICION DEL PROCESO DE PENETRACION VIRAL

Para que algunos virus con cubierta, tales como los mixovirus (p. ej. virus influenza) y los paramixovirus (virus parainfluenza, sarampión, paperas) puedan penetrar en una célula, concretamente para que pueda producirse la fusión de las membranas viral y celular, es necesario que una proteína viral sea activada mediante una proteasa celular (12).

La proteína F de los paramixovirus en forma de precursor inactivo (F_0) es una glicoproteína de peso molecular 65.000. La ruptura proteolítica que la activa da dos glicoproteínas menores $F_1 \sim (50.000)$ y $F_2 \sim (15.000)$ unidas por un puente disulfuro. El extremo C-terminal de F_0 , que lo es a su vez de F_1 , está embebido

en la membrana viral. El extremo N-terminal de Fo es el de F₂. La hidrólisis genera un nuevo extremo N-terminal de F₄ y C-terminal de F₂.

La nueva región N-terminal de F₄ es muy hidrofóbica, su estructura se mantiene en gran medida en diferentes paramixovirus y parece estar directamente implicada en la actividad de fusión de membranas de la proteína Fo, posiblemente mediante una interacción hidrofóbica con la bicapa lipídica de la membrana de la célula a infectar. Así, el extremo N-terminal de F₄ estaría insertado en la membrana celular y el extremo C-terminal en la membrana viral. Este anclaje facilita la aproximación y fusión de ambas membranas.

TABLA 1.-ACTIVIDAD ANTIVIRAL FRENTE A VIRUS DEL SARAMPION Y VIRUS INFLUENZA DE ALGUNOS OLIGOPEPTIDOS SINTETICOS

Peptido	Cocentracion efectiva 50%, μ M (a)
L-Phe-L-Phe-Gly-D-Ala-D-Val-D-Ile-Gly-Thr-Ile-Ala (b)	
Z-D-Phe-L-Phe-Gly-D-Ala-D-Val-D-Ile-Gly.....	0,02 (c)
Z-D-Phe-L-Phe-Gly.....	0,20 (c)
Z-D-Phe-D-Phe-Gly.....	10 (c)
Z-L-Phe-L-Phe-Gly.....	23 (c)
Z-D-Phe-L-Phe.....	28 (c)
t-Boc-D-Phe-L-Phe-Gly.....	2,0 (c)
D-Phe-L-Phe-Gly.....	180 (c)
Z-D-Phe-L-Phe-Gly (ester metilico).....	20 (c)
Gly-L-Leu-L-Phe-Gly-Ala-Ile-Ala-Gly-Phe-Ile (d)	
Gly-D-Phe-L-Phe-Gly-Ala-Ile-Ala-Gly-Phe-Leu (d)	
Z-Gly-L-Leu-L-Phe-Gly.....	20 (e)
Z-Gly-L Phe-L-Phe-Gly.....	53 (e)
Z-Gly-D-Phe-L-Phe-Gly.....	23 (e)

(a) Concentracion de oligopeptido que produce una inhibicion del 50% en la produccion de nuevos viriones formadores de placa.

(b) Secuencia de los 10 aminoacidos del extremo N-terminal del polipeptido F₄ del virus Sendai.

(c) Evaluado frente a virus del sarampion.

(d) Secuencias de los 10 aminoacidos del extremo N-terminal del polipeptido HA 2 de los virus Influenza A e Influenza B, respectivamente.

(e) Evaluado frente a virus Influenza A.

En caso de que dicho extremo N-terminal del oligopéptido F_1 necesitase un receptor específico sobre la superficie celular, como pudiera ser el caso, dada la conservación de la secuencia de aminoácidos de dicho extremo en gran número de mixovirus, podría ser posible inhibir competitivamente la penetración, mediante péptidos análogos al extremo N-terminal de F_1 , que interaccionasen con los mismos receptores celulares. Con el fin de verificar esta hipótesis se han sintetizado una serie de péptidos cuya estructura es análoga a la del extremo N-terminal del polipéptido F_1 del virus Sendai. Los estudios de relaciones estructura-actividad en estas series de polipéptidos (Tabla 1) se han realizado sobre el virus del sarampión. Algunas conclusiones son las siguientes:

1. Los oligopéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos correcta son inhibidores altamente específicos. Cuanto más larga es dicha secuencia correcta mayor es la actividad inhibitoria.
2. La presencia de ciertos grupos protectores del grupo amino terminal, tales como benciloxicarbonilo o t-butiloxicarbonilo aumentan la actividad.
3. La configuración absoluta de los dos primeros aminoácidos es importante, siendo la más activa Z-D-Phe-L-Phe-Gly.
4. La esterificación del aminoácido C-terminal con un grupo metilo disminuye la actividad antiviral.

La presencia de grupos protectores lipófilos añade hidrofobicidad al extremo N-terminal y la esterificación del grupo ácido disminuye la polaridad del extremo C-terminal del péptido. Estas modificaciones afectan a la correcta orientación del péptido en su sitio de acción en la membrana celular.

En los mixovirus, p. ej. influenza, la glicoproteína Hemaglutinina (HA) desempeña un papel análogo al de la proteína F de los paramixovirus. La proteína HA es escindida por una proteasa celular para dar dos subunidades HA_1 y HA_2 unidas por un puente

disulfuro. El extremo N-terminal del polipeptido HA₂ es muy hidrófobo, su estructura es muy parecida en varios mixovirus y también participa en la penetración. Se han sintetizado varios péptidos cuya estructura imita a la del extremo N-terminal de HA₂ que inhiben virus Influenza A (Tabla 1).

El hecho de que cada uno de los dos grupos de péptidos sintéticos sólo sea activo frente al virus que ha servido de modelo a su secuencia y no frente a otros tipos de virus, unido al hecho de que las configuraciones absolutas de los dos primeros aminoácidos sea importante, indica que existe una especificidad en el reconocimiento de los sitios de acción (receptores) de la membrana celular por parte de los diferentes virus. Los péptidos anteriores no presentan efectos tóxicos significativos para las células.

3. INHIBICION DEL PROCESO DE EXPRESION GENETICA

3.1. Interferencia con las funciones de las enzimas Timidina Kinasa y DNA polimerasa de virus herpes

La enzima timidina Kinasa (TK) codificada por el genoma de varios de los virus herpes tales como Herpes simplex tipos 1 (HSV-1) y 2 (HSV-2) y varicela zoster difiere de la timidina Kinasa (TK) celular en peso molecular, movilidad electroforética, punto isoléctrico, propiedades inmunológicas y lo que es más importante en especificidad frente al sustrato. Este último hecho hace que la TK sea de enorme importancia para la activación de un buen numero de agentes antiherpéticos selectivos, y se haya convertido en un objetivo fundamental para el diseño de agentes antivirales contra HSV-1, HSV-2 y virus varicela zoster (13).

La TK de HSV-1 cataliza la fosforilación, no sólo de su sustrato natural timidina, sino también la de timidina-5'-fosfato. Esta enzima fosforila muchos análogos de timidina, tales como 5-etil-2'-desoxiuridina, 5-bromovinil-2'-desoxiuridina y de arabinofuranosilnucleósidos tales como arabinofuranosilti-

mina, 2'-fluoro-5-iodo-arabinofuranosilcitosina. La escasa selectividad de esta enzima hace que también fosforile 5'-amino-5'-desoxinucleósidos, tales como 5'-amino-5'-desoxi-timidina y 5'-amino-5'-desoxi-5-iodouridina, nucleósidos acíclicos tales como aciclovir e incluso derivados de 2-desoxicitidina, tales como las 5-F, 5-I, 5-Br, 5-NO₂ y 5-etil-2-desoxicitidina. Las dos funciones de esta Kinasa, como 5'-fosforilante de derivados de timina y de 2'-desoxicitidina, están asociadas dentro de la misma molécula en los virus HSV-1 y HSV-2. Sin embargo, otros virus tales como pseudorabies y vacuna inducen una TK que sólo fosforila timidina.

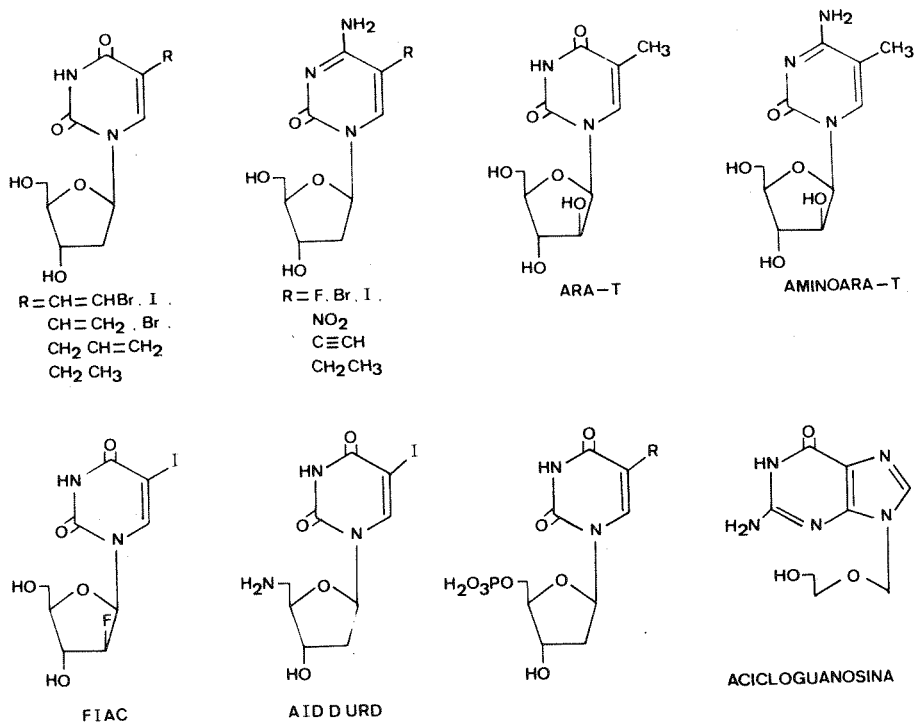


FIG. 2-Sustratos de Timidina Kinasa inducida por virus Herpes

La actividad antiherpética de los derivados anteriores se debe, por tanto, a su activación (fosforilación) selectiva por la TK viral. De hecho, mutantes de HSV que carecen de la capacidad de inducir TK en las células infectadas no son inhibidas por ninguno de los compuestos anteriores.

Una vez que el derivado de timidina o desoxicitidina ha sido fosforilado a su 5'-monofosfato por la TK inducida por el virus, el derivado de ácido timidílico puede interferir diferentes pasos del metabolismo de timidina, ya sean catalizados por enzimas celulares o virales. Algunas de dichas enzimas pueden ser TK, TMP sintetasa (timidilato sintetasa), dTMP Kinasa o DNA polimerasa. Incluso puede incorporarse a DNA y perturbar de esta forma la replicación de DNA y su transcripción. Cualquiera que sea el modo de acción de un determinado agente, el efecto tóxico se ejercerá únicamente sobre la célula infectada por el virus, ya que solamente en ella se habrá producido la activación (fosforilación) del derivado nucleosídico por acción de la TK inducida por herpes.

En respuesta a esta hipótesis de trabajo y sobre todo a las buenas actividades mostradas por los compuestos cabeza de serie, se han sintetizado un gran número de compuestos, sobre todo en dos campos, los aciclonucleósidos y los 2'-desoxinucleósidos de pirimidinas. El éxito más notable de la quimioterapia antiviral de los últimos tiempos, el Aciclovir, pertenece al primer grupo, el de los aciclonucleósidos.

Aciclovir (ACV) (14) está autorizado para su uso en humanos como agente terapéutico por vía tópica e intravenosa frente a herpes genital primario, y frente a herpes mucocutáneo. Su mecanismo de acción antiviral selectiva supone la fosforilación preferente mediante la timidina (citidina) Kinasa inducida por el virus y la transformación posterior mediante enzimas celulares al trifosfato (ACV-TP). Un análisis más detallado revela que la fosforilación inicial es realizada por la parte de la proteína con actividad de desoxicitidina Kinasa y no por la que tiene actividad de timidina Kinasa. Una vez formado el 5'-monofosfato de ACV se transforma en el difosfato mediante la GMP kinasa celular. Aparentemente, la actividad timidilato kinasa de la enzima TK viral no es capaz de transformar el 5'-monofosfato en el difosfato. Este es un caso poco común de especificidad de sustrato, un nucleósido de purina es fosforilado por una pirimidina kinasa viral, pero el monofosfato resultante es

sustrato de una nucleótido kinasa celular y no de la viral. La transformación del difosfato en el metabolito activo, el ACV-TP, la realizan varias kinasas celulares.

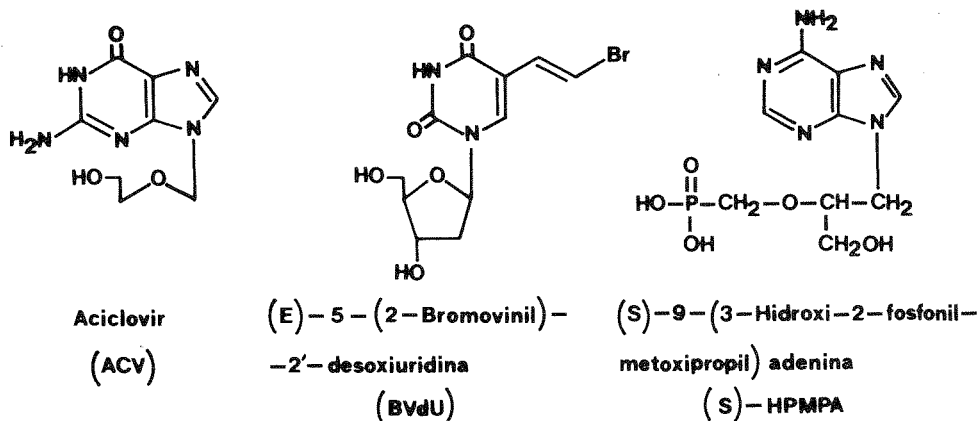


FIG. 3.-Estructuras de Aciclovir, BVdU y (S)-HPMPA

El ACV-TP puede inhibir la DNA polimerasa de Herpes Simplex por la que tiene una afinidad de 10 a 60 veces mayor que por la DNA polimerasa de mamíferos, lo que da lugar a la inhibición selectiva de la síntesis de DNA. Además ACV-TP es mejor sustrato de las DNA polimerasas de herpes que de las DNA polimerasas celulares, por lo que la incorporación preferente de ACV al DNA viral produce una terminación de la cadena de este último.

El compuesto más importante del segundo grupo es la (E)-5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina (BVdU) (15), que junto con el Aciclovir sigue siendo el más potente y selectivo de los antiherpéticos. Su mecanismo de acción antiviral selectiva se basa, como en el caso de Aciclovir en las diferencias existentes entre las enzimas TK kinasa y DNA polimerasa viral y celular.

3.2. Inhibición de DNA polimerasa viral

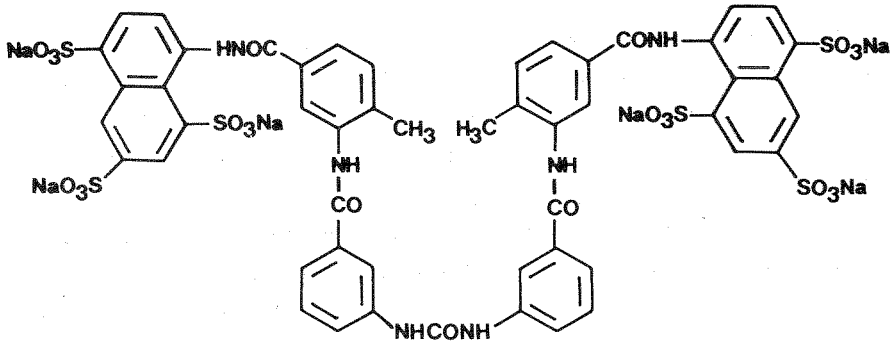
La actividad de los compuestos del apartado anterior, aunque resulta de la interacción con la DNA polimerasa viral,

sólo se ejerce en aquellos virus que poseen una enzima timidina kinasa específica, diferente de la celular. Este es el caso de los virus de la familia Herpes, tales como HSV-1, HSV-2, virus varicela-Zoster, etc. Los compuestos del apartado anterior no son activos frente a virus que no tienen dicha enzima ni frente a mutantes de virus herpes que carecen de la actividad timidina kinasa (Tk). No obstante, las DNA polimerasas virales son generalmente diferentes de las DNA polimerasas celulares, y esta diferencia puede aprovecharse con fines terapéuticos. Algunos de los compuestos que aprovechan esta diferencia son fosfonatos de nucleósidos acíclicos tales como (S)-9-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)adenina[(S)-HPMPA] (16).

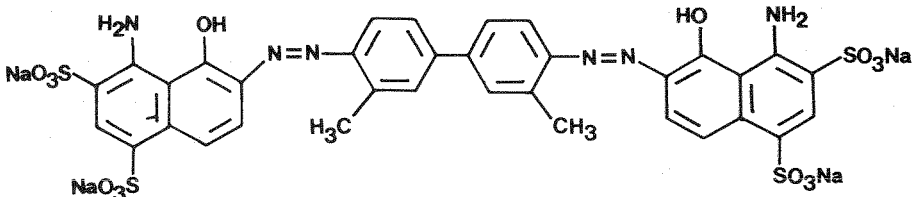
Este compuesto, a pesar de su polaridad, es incorporado por las células como tal, las kinasas celulares le fosforilan hasta llegar al trifosfato, que en realidad es un difosfato añadido al fosfonato ya presente en la molécula. En forma de trifosfato interacciona con la DNA polimerasa viral por la que tiene mucha mayor afinidad que por la DNA polimerasa celular. Este tipo de compuestos es activado (fosforilado) por las kinasas celulares, por lo que no depende de kinasas virales específicas. Debido a ello su espectro de acción es mucho mas amplio que los del apartado anterior. Concretamente (S)-HPMPA es activo frente a virus herpes normales y frente a mutantes que carecen de la actividad timidina kinasa (TK) incluso frente a citomegalovirus, un virus de la familia herpes que no induce su propia TK. También es activo frente a Adenovirus, Poxvirus (vacuna), Papovavirus (virus papiloma) e Iridovirus (virus de la peste porcina africana).

3.3. Inhibidores de la transcriptasa inversa del virus HIV

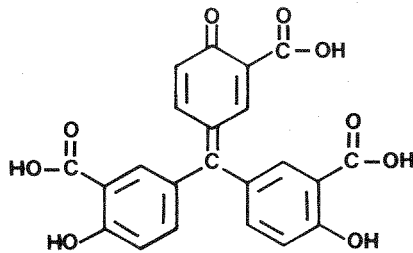
Como se ha mencionado antes, la transcriptasa inversa (TI) cataliza la síntesis de DNA a partir del RNA genómico. Este tipo de proceso es único de los retrovirus, por ello es un objetivo muy atractivo para el diseño de agentes anti-retrovirus. No obstante, la TI es una DNA polimerasa, por lo que no es de



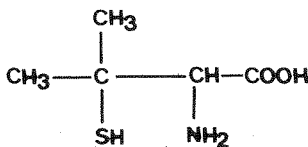
SURAMINA (SAL SODICA)



AZUL DE EVANS



ACIDO AURINTRICARBOXILICO



D - PENICILAMINA



FOSFONOFORMATO SODICO

FIG. 4.-Algunos inhibidores de Transcriptasa Inversa de HIV.

esperar que sea muy diferente de las DNA polimerasas celulares. La TI de HIV se ha aislado y purificado y parece ser una proteína p51 y una p66 (17). La enzima requiere Mg^{++} o Mn^{++} , aunque como otras TI lleva Zn^{++} .

Cuando se descubrió que el agente causante del SIDA era un retrovirus se comenzaron a ensayar frente a HIV muchos de los compuestos que durante la década de los 70 habían demostrado actividad inhibidora de la enzima TI de diversos retrovirus. Algunos de estos compuestos también son inhibidores de la TI de HIV. Varios de ellos son polianiones tales como la suramina, Azul de Evans y el Acido Aurintricarboxílico. Su mecanismo de acción no se conoce. No obstante, su índice terapéutico es muy bajo ≤ 5 . Otros compuestos como la D-penicilamina pueden actuar como quelantes del catión divalente de la enzima. Otro de los inhibidores de la TI de HIV es el fosfonoformato, que se cree que interacciona con las DNA polimerasas en el sitio en el que el pirofosfato se escinde durante el proceso de polimerización.

El grupo de inhibidores más potentes y más selectivos de la replicación del virus HIV son los 2'3'-didesoxinucleósidos, tales como 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT), 2'3'-didesoxicitidina (ddCyd) y 2',3'-didesoxitimidina (ddThd). Estos compuestos conocidos desde hace bastantes años, tienen que ser fosforilados en

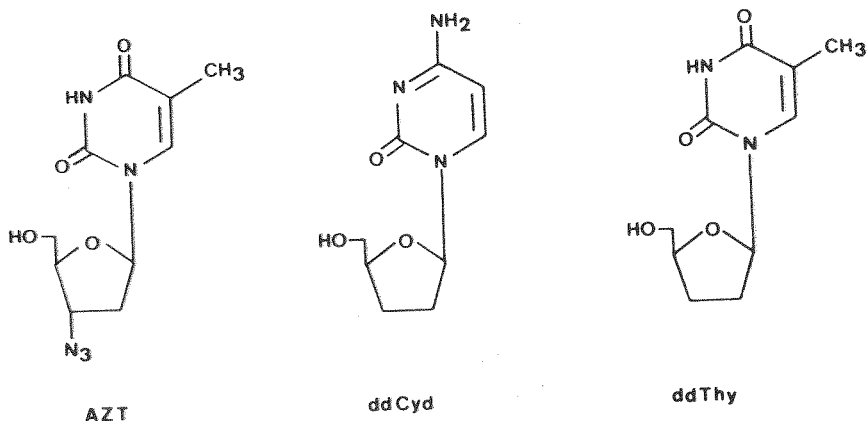


FIG. 5.-Estructura de 2'3'-didesoxinucleosidos activos frente al virus del SIDA

el citoplasma de la célula infectada para dar 2',3'-didesoxinucleósido-5'-trifosfatos. Estos pueden competir con los nucleótidos naturales por las DNA polimerasas, entre ellas la TI, o pueden ser reconocidos como sustratos y ser incorporados al DNA viral e incluso al celular. Como los 2',3'-didesoxinucleósidos carecen de grupo 3'-OH la unión fosfodiéster 5' → 3' que prolongaría la cadena de DNA no puede llevarse a cabo. Por ello, estos compuestos actúan como terminadores de la cadena de DNA (1,2,4).

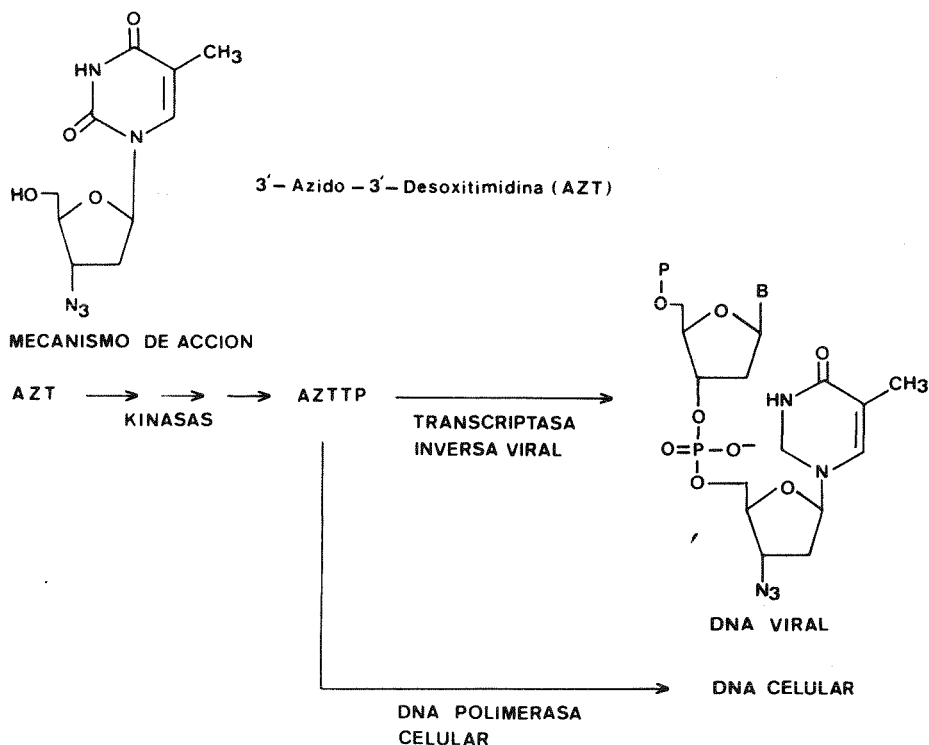


FIG. 6.-Mecanismo de acción de AZT

La capacidad de las kinasas de las células infectadas y no infectadas no debe ser diferente, por lo que la selectividad observada con estos compuestos tiene que deberse a una mayor afinidad por la TI de HIV que por las DNA polimerasas celulares, hecho que ya ha sido demostrado, o a una mayor accesibilidad a la TI de HIV, que está situada en el citoplasma, que a las DNA

polimerasas celulares, que están en el núcleo y en las mitocondrias. En cualquier caso, estos compuestos, concretamente AZT, también inhibe la síntesis de DNA celular.

El estudio de la actividad anti-HIV de varios 2',3'-didesoxinucleósidos indica que todos ellos independientemente de cual sea la base, inhiben, aunque de forma variable y a distintas concentraciones, la aparición del efecto citopático producido por el virus HIV en células ATH (células leucémicas). De todos ellos el más potente es la 2',3'-didesoxicitidina. Las mejores selectividades se obtienen con 2',3'-didesoxicitidina y AZT. Estos dos compuestos, AZT y ddCyd, están en fase de estudios clínicos.

TABLA 2.-COMPARACION DE LA POTENCIA Y LA SELECTIVIDAD IN VITRO DE VARIOS AGENTES ANTI-SIDA (SEGUN REF. 4)

Compuesto	ED ₅₀ (μM)*	CD ₅₀ (μM) ⁺	Indice de selectividad ◆
Suramina	20	180	9
Azul de Evans	10	100	10
Acido Aurintricarboxilico	30	120	4
Ribavirina	400	100	0,25
Fosfonoformato sidico	100	400	4
HPA-23	15	0,5	0,03
Glicirricina	100	2400	24
3'-Azido-3'-desoxitimidina (AzddThd, AZT)	0,006	3,5	583
2',3'-Didesoxicitidina (ddCyd)	0,06	37	616
	0,046	9,1	198
2',3'-Didesoxi-2',3'-didehidrocitidina (ddeCyd)	0,13	7,9	61
	0,2	50	250
2',3'-Didesoxitimidina (ddThd)	0,2	125	625
2',3'-Didesoxi-2',3'-didehidrotimidina (ddeThd)	0,01	1,2	120
2',3'-Didesoxiadenosina (ddAdo)	6,4	890	139
2',3'-Didesoxi-2,6-diaminopurinaribosido (ddDAPR)	3,6	404	112
2',3'-Didesoxiguanosina (ddGuo)	7,6	486	64
3'-Azido-2',3'-didesoxiguanosina (AzddGuo)	1,4	190	136

* Dosis necesaria para conseguir una proteccion del 50% en celulas ATH8 o MT-4 frente al efecto citopatico inducido por HIV.

+ Dosis necesaria par reducir la viabilidad de celulas ATH8 o MT-4 no infectadas al 50%.

◆ Cociente CD₅₀/ED₅₀.

Lógicamente, la presencia de dos compuestos prometedores hace que el trabajo en este campo de los 2',3'-didesoxinucleósidos continúe, ya que siguen siendo necesarios compuestos más potentes y sobre todo más selectivos. También es necesario que puedan penetrar la barrera sangre-cerebro.

Algunas de las líneas de trabajo que se siguen en la actualidad son derivados de 2',3'-didesoxinucleósidos, 3'-ázido-2',3'-didesoxinucleósidos y 2',3'-didesoxi-2',3'-didehidronucleósidos. De los datos publicados se deducen algunas relaciones estructura actividad. En primer lugar existe una marcada selectividad en cuanto a la base. Los nucleósidos de citosina y timina son siempre los compuestos más activos. Los nucleósidos de otras bases tales como adenina, guanina, uracilo y bases modificadas, o son por lo general menos activas, o carecen totalmente de actividad. Por otra parte, el resto de azúcar puede tener

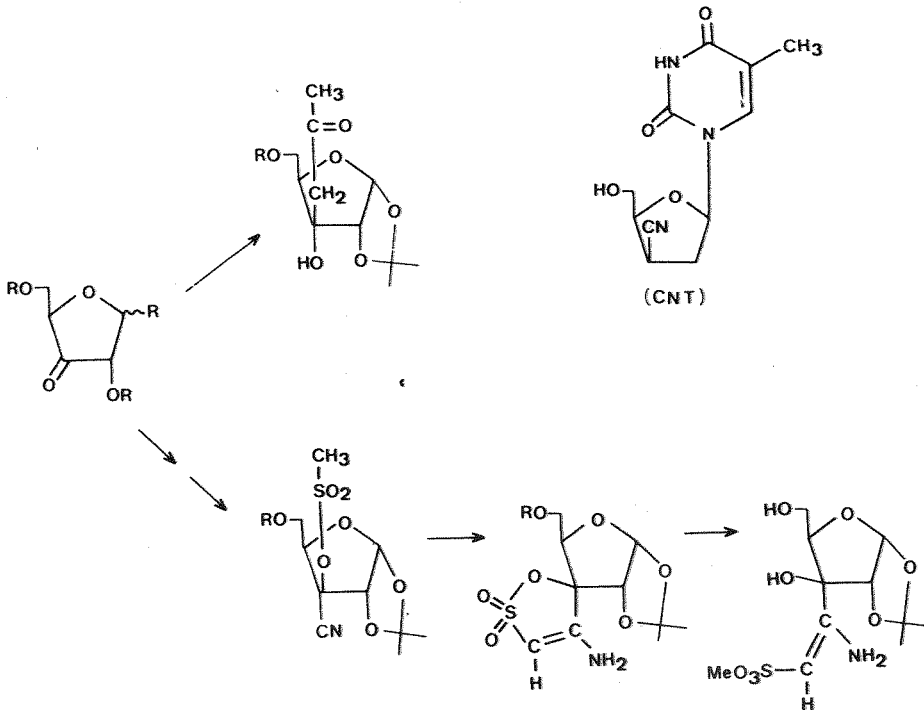


FIG. 7

solamente tres estructuras 2',3'-didesoxiribosa, 2',3'-didesoxiribosa-2',3'-insaturada y 2',3'-didesoxiribosa sustituida en 3' por un grupo azido o fluoro. Los 3'-amino-2',3'-didesoxinucleósidos no presentan actividad significativa. Esto parece excluir que los 3'-azidoderivados se metabolicen a los correspondientes 3'-aminonucleósidos y que éstos fuesen los auténticos productos activos. En tercer lugar, los compuestos deben tener un grupo 5'-OH con el fin de que puedan ser fosforilados en el interior de la célula, ya que los nucleótidos no atraviesan la membrana celular.

En nuestro grupo estamos siguiendo esta línea. Concretamente, estamos trabajando en la preparación de 2',3'-didesoxinucleósidos 3'-C-ramificados. Así hemos preparado 3'-ciano-3'-desoxitimidina CNT (Fig. 7), que no ha mostrado actividad anti-HIV, y también estamos trabajando en el desarrollo de algunos métodos para la creación de enlaces carbono-carbono en la posición C-3 de ribosas y nucleósidos.

3.4. Otros objetivos de diseño de agentes anti HIV

Además del objetivo de la inhibición de la transcriptasa inversa también existen otros objetivos para la inhibición de la replicación de HIV, algunos de los cuales también afectan a otros virus. Estos objetivos están, en general, en fases muy preliminares de estudio o son hipótesis con algún apoyo experimental. Hay otros objetivos potenciales, que al no tener de momento ningún apoyo experimental no han sido incluidos aquí.

Se sabe que uno de los pasos decisivos de la penetración es la interacción entre la glicoproteína gp120 de HIV, que junto con gp41 son las dos glicoproteínas de la cubierta, y su receptor, la glicoproteína T4 de la membrana celular. Una vez se conozca la secuencia del o los segmentos de gp120 que interactúan con T4 puede ser posible sintetizar oligopéptidos análogos que bloqueen dichos receptores T4. La proteína gp 120 varía de unas cepas a otras, pero los fragmentos esenciales deben mante-

nerse, ya que debe unirse a T4, cuya estructura es relativamente constante. Es posible producir anticuerpos dirigidos contra el sitio activo de gp120 que se unan al mismo y le neutralicen. En la actualidad ya se ha producido un anticuerpo monoclonal humano que es complemento y que se fija a la principal glicoproteína de la cubierta de HTLV-1 (el primer retrovirus T-linfotrópico humano conocido). Por ello, es posible hacer un trabajo análogo para HIV, también denominado HTLV-III.

TABLA 3.-OBJETIVOS POTENCIALES PARA EL DISEÑO DE AGENTES ANTI-HIV. (a)

Objetivo	Agentes potenciales
<u>Adsorción y penetración</u>	
Adsorción del virus	Sustancias polianiónicas. Suramina -Peptido T(Ala-Ser-Thr-Thr-Thr-Asn-Tyr-Thr)
Proteína gp120/Receptor T4	-Peptidos competidores de gp120 -Anticuerpos monoclonales contra los antígenos de T4
<u>Expresión Genética</u>	
Transcriptasa Inversa	2',3'-didesoxinucleosidos
Proteínas TAT y TRS	Compuestos aniónicos
Expresión del genoma viral	Secuencias de DNA complementario
Traducción del genoma	Secuencias de mRNA complementarias
Ruptura de proteínas virales	Inhibidores de proteasas
Glicosilación de proteínas	Inhibidores de Glicosilación

(a) Véase Refs. 1,2,4.

El gen tat-III de HIV codifica una proteína denominada proteína tat-III que favorece y estimula la expresión de otros genes virales, así como la replicación viral. Parece que aumenta la formación de productos virales a nivel de transcripción y también favorece la expresión viral, aumentando la estabilidad del mRNA y/o la eficiencia de la traducción. En cualquier caso

parece que la proteína tat-III favorece la producción de nuevos viriones. La proteína es pequeña (86 aminoácidos) y tiene una cavidad formada por aminoácidos cargados positivamente.

Mediante el mismo mRNA que codifica la proteína tat-III, pero empleando una secuencia de nucleótidos diferentes, el gen art o trs de HIV produce otra proteína pequeña (116 aminoácidos) cargada positivamente que se cree que funciona como un segundo factor de trans-activación en la replicación viral.

También se puede inhibir la expresión y la traducción del genoma viral mediante oligodesoxinucleósidos y oligonucleótidos cuyas bases son complementarias ("anti-sense") a las de un segmento importante del genoma viral. Dicho segmento vital puede ser el de los genes tat-III o art/trs. Las proteínas sintetizadas a partir de estos genes ejercen funciones reguladoras que incrementan la expresión de otros genes virales y la replicación viral. Esta aproximación ya ha sido ensayada in vitro.

Una vez traducido el genoma viral es necesario que algunas cadenas largas de proteínas se rompan mediante proteasas virales o celulares. También es necesaria la glicosilación de las proteínas virales, particularmente la gp120. De momento no se conocen inhibidores de proteasas que actúen selectivamente contra HIV. Sin embargo, algunos inhibidores de glicosilación tales como 2-desoxi-D-glucosa y β -hidoxinorvalina disminuyen la infectividad de HIV, aunque a concentraciones elevadas (5-10 y 0,5-5 mM, respectivamente).

4. INHIBICION DE LA GLICOSILACION DE PROTEINAS VIRALES

Como se ha visto anteriormente para HIV, muchos virus poseen una cubierta formada por una bicapa lipídica y glicoproteínas.

La síntesis de las glicoproteínas transcurre en dos etapas (18,19). La primera es la síntesis de un oligosacárido, mediante la ruta del dolicol, que es el único precursor de todos los oligosacáridos encontrados en las glicoproteínas maduras. A

continuación, el polipéptido se transfiere a la proteína y comienza la segunda etapa de maduración de la glicoproteína, que comprende el podado ("trimming") hidrolítico de varios restos de glucosa y manosa, mediante las glicosidasas correspondientes, seguido de la unión de nuevos restos glicosídicos al oligosacárido, mediante las glicosiltransferasas correspondientes, para dar el oligosacárido maduro. Esta segunda etapa, sobre todo la unión de nuevos restos glicosídicos es específica de cada proteína.

El hecho de que la maquinaria enzimática celular realice la biosíntesis de las glicoproteínas virales y celulares, no parece favorecer la búsqueda de agentes antivirales selectivos en este proceso. Sin embargo, otras características del proceso de glicosilación revelan aspectos diferenciales que pueden permitir una acción antiviral selectiva (19,20):

- Las proteínas y glicoproteínas virales y celulares son diferentes.
- La información estructural necesaria para la síntesis de la glicoproteína está contenida en el esqueleto peptídico de la proteína, tanto en lo que se refiere al número y posición de los oligosacáridos, como a las instrucciones para el podado de restos glicosídicos y posterior unión de nuevos azúcares hasta llegar al oligosacárido maduro.
- La estructura de los inhibidores del proceso de glicosilación está relacionada a la de los sustratos naturales de las glicosiltransferasas y glicosidasas correspondientes.
- Algunas glicosiltransferasas de distintas procedencias no son muy específicas en lo que se refiere a la estructura del donador de restos glicosilo. Esta falta de especificidad varía de unas enzimas a otras.

De acuerdo con esto, el proceso de glicosilación puede ser interferido. La interferencia en la primera etapa no debe ser selectiva, pero la inhibición de algunas glicosiltransferasas de la segunda etapa sí podría dar lugar a una inhibición selectiva del proceso de glicosilación de proteínas. Si esto sucede, la

ausencia de restos oligosacárido en las proteínas virales o la presencia de oligosacáridos incompletos puede dar lugar a la formación de viriones defectuosos no infectivos.

Muchos de los inhibidores de glicosiltransferasas son derivados de hexosas (18,19,20), tales como desoxihexosas (2-desoxi-glucosa), fluorohexosas (2-desoxi-fluoroglucosa, 2-desoxi-2-fluoromanosa), aminoazúcares (2-amino-2-desoxiglucosa, 2-amino-2-desoxigalactosa). La mayoría de estos compuestos no son activos por sí mismos, sino que necesitan ser activados metabólicamente al estado de nucleótido azúcares y estos metabolitos son los auténticos inhibidores, ya que son sustratos de las glucosiltransferasas y manosiltransferasas que incorporan glucosa y manosa a los restos de oligosacárido. Los oligosacáridos defectuosos obtenidos al incorporar restos de desoxiazúcares y fluoroazúcares no pueden seguir creciendo hasta llegar a su tamaño definitivo y no pueden ser transferidos al oligopéptido.

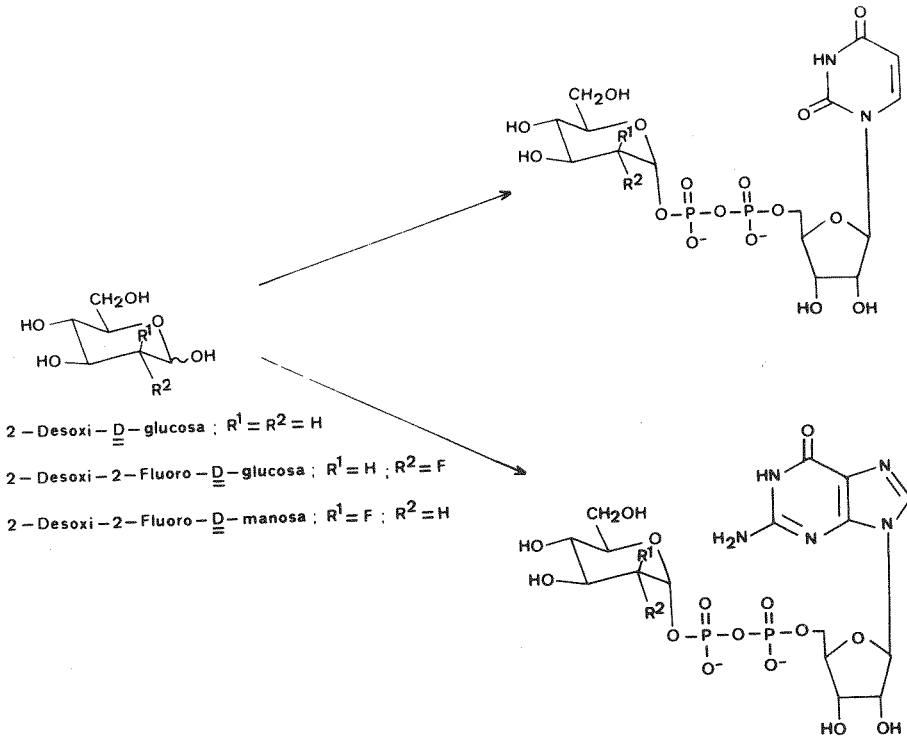


FIG. 8.-Algunas desaxihexosas inhibidoras del proceso de glicosilación

Además, existen una serie de derivados nucleosídicos y nucleotídicos, tales como la tunicamicina (21), el 5'-monofosfato de bromovinildesoxiuridina (BVdUMP) (22) y la citidinamonomofosfato (CMP) (23), que son inhibidores de glicosilación. Estos derivados son inhibidores competitivos de glicosiltransferasas cuyos sustratos naturales son nucleotidoazúcares.

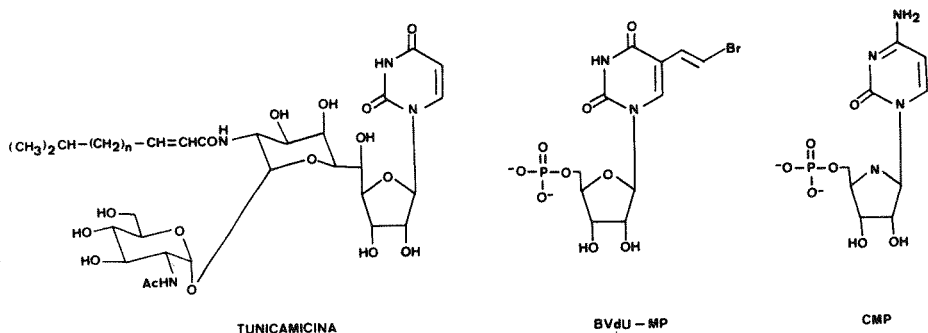


FIG. 9.-Derivados Nucleotídicos inhibidores del proceso de glicosilación

Segun esto, parece que el proceso de glicosilación puede inhibirse mediante análogos de nucleotidodifosfatohexosa y de nucleótidos. La inhibición de las glicosiltransferasas de la primera etapa debe conducir al bloqueo de la síntesis de glicoproteínas celulares y virales, pero la inhibición de las de la segunda etapa podría conducir a una inhibición selectiva de la síntesis de proteínas virales.

Para comenzar los intentos de inhibición de la glicosilación mediante análogos de nucleosidodifosfatohexosas y de nucleótidos parece razonable empezar con derivados de uridina, que es el nucleósido que transfiere restos de glucosa (primera y segunda etapas), galactosa (segunda etapa) y N-acetilglucosamino (primera y segunda etapas). Las estructuras que se diseñaron como inhibidores potenciales del proceso de glicosilación son bioisómeros de los sustratos naturales de las glicosiltransferasas, es decir, los nucleótido-azúcares de tipo A y los análogos de nucleótidos de tipo B.

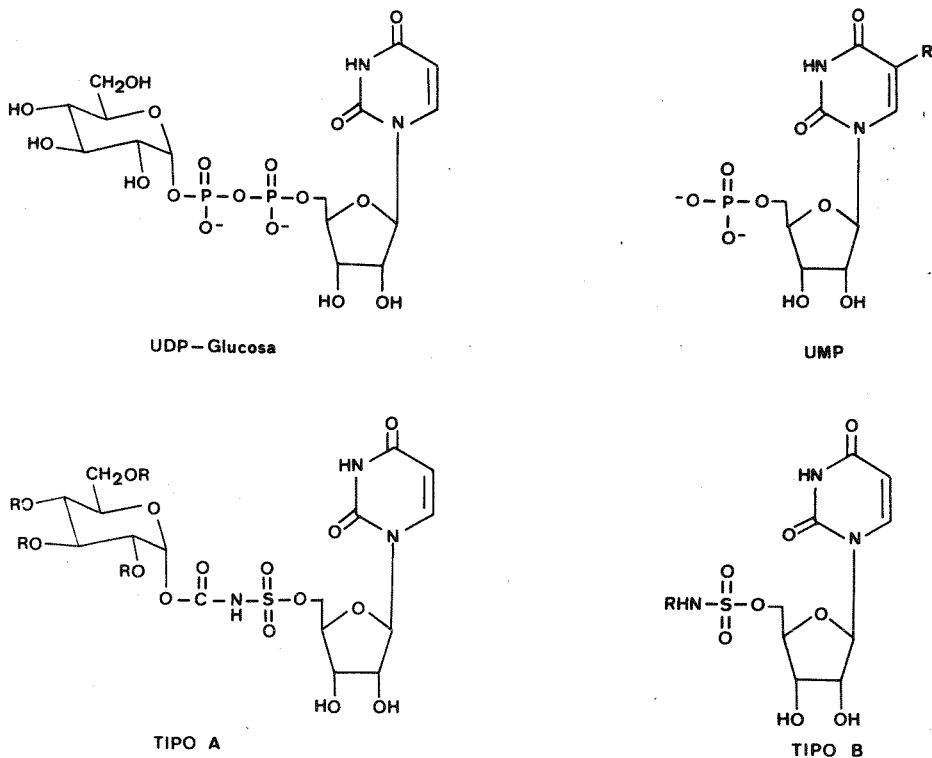


FIG. 10.-Inhibidores potenciales del proceso de glicosilacion

En los compuestos de tipo A se ha sustituido el resto difosfato por un grupo bioisotero oxicarbonilaminosulfonilo. Este agrupamiento tiene una longitud (7,18 A) próxima a la del difosfato (7,74 A) y no confiere a la molécula la elevada polaridad de este último grupo, lo que facilita su paso a través de membrana celular hasta el citoplasma.

En los compuestos de tipo B se ha sustituido el grupo fosfato por el grupo sulfamoiilo. Esta bioisosteria se encuentra en la naturaleza, ya que algunos nucleósidos antibióticos naturales tales como la Nucleocidina (24), Ascamicina (15) y Dealamiascamicina tienen estructura de 5'-sulfamoiilnucleósidos.

De los compuestos de tipo A hemos sintetizado bastantes derivados en los que manteniendo dos de las tres partes de la molécula se ha variado sistemáticamente el resto nucleosídico.

co (26), el puente análogo de difosfato (27) y el resto de hexopiranososa (28,29).

Todos los compuestos de tipo A sintetizados se han evaluado frente a virus herpes simplex tipos 1 (HSV-1) y 2 (HSV-2), virus (VV), virus sindbis (SV) y virus de la peste porcina africana (ASFV). Las relaciones estructura actividad son algo diferentes para cada virus, pero se observan una serie de aspectos que se cumplen en todos los casos (30).

1. Los grupos protectores de los hidroxilos de la hexosa deben desempeñar un papel importante en el transporte de la molécula a través de la membrana celular hasta el citoplasma, que es el sitio de acción. Los más favorables son los grupos bencilo y benzoilo, que confieren una lipofilia intermedia a la molécula a diferencia de los que la confieren excesiva lipofilia (grupos palmitoilo) o excesivamente poca (grupos acetilo o ausencia de grupos protectores).

2. La presencia de distintos restos de hexosa perbenzoilada tales como glucosa, N-acetilglucosamina, galactosa, manosa o 2-desoxiglucosa no afecta grandemente al comportamiento biológico de la molécula, ya que todas ellas presentan análogas actividades antiviral e inhibición de la glicosilación de proteínas.

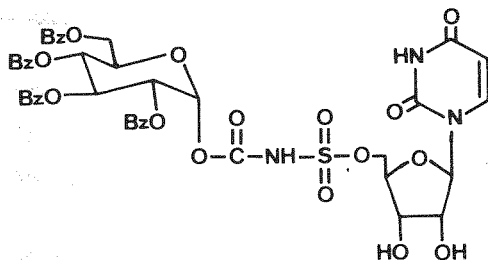
3. Las modificaciones en el resto de uridina conducen, en general, a compuestos con menores actividades antivirales.

4. El análogo de difosfato debe ser de una longitud próxima a la del grupo difosfato, y sobre todo tener un grupo sulfamoilo unido a la posición 5'- del nucleósido.

El papel biológico de estos compuestos ha sido estudiado con alguna profundidad en uno de sus representantes, el denominado P-536 (compuesto de tipo A en el que $R=C_6H_5CO$).

El espectro de actividad antiviral de P-536 se define en la Tabla 4. Se ve que presenta actividad frente a virus DNA y RNA con cubierta y sin ella. Los efectos tóxicos para las células a

TABLA 4.-ESPECTRO ANTIVIRAL DE P-536



Virus	Cubierta	Actividad antiviral	
		Celulas HeLa CPE ₅₀ (μ g/mL) ^a	Celulas Vero MIC ₅₀ (μ g/mL) ^b
HSV-1	SI	30	
HSV-2	SI		26
Vacuna	SI	70	25
Sindbis	SI		55
VSV	SI	100	
Influenza A	SI	100	
Sarampion	SI	100	
PPA	SI		18
Adenovirus 5	NO	20	
Polio I	NO	30	
EMC	NO	30	

^a CPE₅₀ es la concentracion de compuesto (μ M) que protege en un 50% la aparicion del efecto citopatico inducido por el virus.

^b MIC₅₀ es la concentracion necesaria para reducir la produccion de virus en un 50%.

estas concentraciones de compuestos no son apreciables. Esto indica que el compuesto, a diferencia de los inhibidores de glicosilación, tales como 2-desoxiglucosa o tunicamicina antes mencionados presenta selectividad en su actividad antiviral. Las magnitudes de la actividad antiviral de este compuesto se comparan también en la Tabla 5 con las de otros agentes antivirales conocidos que actúan por diferentes mecanismos.

Se ha demostrado que el compuesto P-536 anterior y otros análogos realmente inhiben la incorporación de glucosamina marcada a las proteínas virales cuando se añade 14 horas después de la infección. En este caso no se produce inhibición significativa de la síntesis de proteínas. Sin embargo, cuando se añade el compuesto desde el principio de la infección se inhibe la replicación de HSV-1 y no se produce la síntesis de las proteínas virales tardías. Esta inhibición se debe probablemente a la inhibición observada de la síntesis de DNA.

La doble vértiente del mecanismo de acción de estos compuestos que, por un lado, inhiben la glicosilación de proteínas, fin para el que habían sido diseñados, y por otro inhiben la síntesis de DNA, debido a su carácter nucleotídico, explica por qué son activos frente a virus con y sin cubierta glicoproteica.

TABLA 5.-ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE P-536
Y DE OTROS AGENTES ANTIVIRALES

Virus	Compuesto	CPE ₅₀ (+)	TOX ₅₀ (*)	MIC ₅₀ (+)	MIC ₅₀ (o)
HSV-1	P-536	30	>220		
	2-desoxiglucosa	5000	5000		
	Tunicamicina	1	1		
	Amantadina	200	200		
	Aciclovir (o)	60	10.000		
	BVdU (o)	1	400		
HSV-2	P-536			26	192
	Aciclovir (o)			0,1	300
VV	P-536			25	192
	IDU (o)			25	200
ASFV	P-536			18	192
	Ribavirina			25	200

(+) CPE₅₀ y MIC₅₀ se han definido en la Tabla 4.

(*) TOX₅₀ es la concentración de compuesto que induce un 50% de toxicidad celular.

(o) MIC₅₀ es la concentración necesaria par inhibir en un 50% la fijación y la multiplicación celular. Todas las concentraciones se expresan en $\mu\text{g/mL}$.

(o) BVdU es (E)-5-(2-Bromovinil)-2'-desoxiuridina. Aciclovir es 9-(2-hidroxietoxi)metil guanina. IDU es 5-Iodo-2'-desoxiuridina.

El compuesto P-536 también presenta actividad in vivo frente a keratitis herpética producida por herpes simplex tipo 1 en cornea de conejo y frente a infección vaginal en cobaya producida por herpes simplex tipo 2.

Muchos 5'-fosfatos de derivados nucleósidos son inhibidores de la síntesis de DNA. Además, tal como se ha comentado anteriormente varios nucleósidos tales como CMP y el 5'-monofosfato de bromovinildesoxiuridina inhiben la glicosilación de proteínas. Por ello, la estructura de tipo nucleotídico de los análogos de nucleosidodifosfatohexosa descritos anteriormente o la de alguno de sus metabolitos podría ser la responsable de las dos actividades biológicas observadas de inhibición de la síntesis de DNA y de inhibición de la glicosilación de proteínas.

Teniendo en cuenta esta hipótesis y algunas de las conclusiones de las relaciones estructura actividad de los análogos de nucleosidodifosfatoexosas mencionadas anteriormente, concretamente la escasa importancia de la estructura del resto de hexopiranososa y la importancia de la presencia de un resto de 5'-O-sulfamoiluridina, análogo de nucleótido, parecía razonable preparar 5'-O-alquilsulfamoiluridinas. Estos compuestos de tipo B efectivamente presentan actividad antiviral frente a HSV-2 y otros virus y su índice terapéutico es del mismo orden de magnitud que el de los análogos anteriores, si bien de valor absoluto algo mayor. Estos compuestos, sin embargo, no son virucidas y de nuevo presentan una dependencia de la actividad en relación con su lipofilia. Experimentos preliminares para determinar su modo de acción demuestran que uno de estos compuestos, el JFR-86 (compuesto de tipo B en el que R=isopropilo), inhibe la glicosilación de proteínas, pero no afecta a la síntesis de las proteínas tempranas ni de las tardías. Este compuesto también presenta actividad in vivo frente a las dos sistemas empleados con P-536 y no es viricida.

En la discusión anterior se han omitido algunos procesos tan importantes como aquellos mediante los que actúan varios fármacos autorizados por la FDA para su uso clínico. Entre estos fármacos están la Amantadina (31), autorizada para la prevención

o el tratamiento precoz de las enfermedades respiratorias producidas por el virus Influenza, la Vidarabina (Ara-A) (32), autorizada para su uso tópico frente a Keratitis herpética y sistémico frente a encefalitis herpética y la Ribavirina (33), autorizada para el tratamiento tópico (aerosol) de infecciones producidas por virus respiratorio sincitial en niños. El proceso mediante el cual ejerce su acción antiviral la Amantadina no es conocido con certeza, y los mecanismos de acción de Ara-A y de

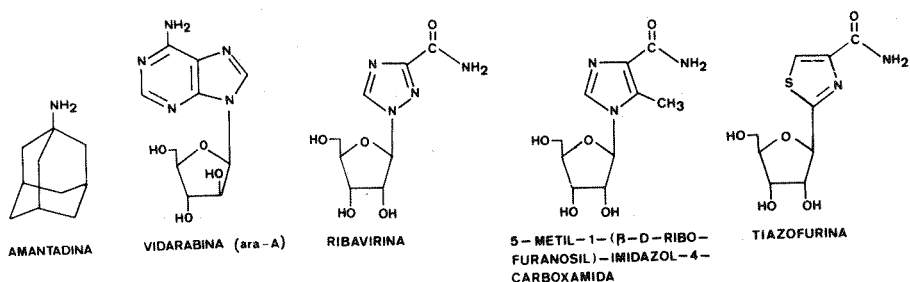


FIG. 11

Ribavirina son muy complejos, ya que debido a su parecido estructural con adenosina y guanosina, respectivamente, interfieren numerosos procesos enzimáticos en los que estos nucleósidos son los sustratos naturales. Por ello, el objetivo de diseño en estos tres casos es la estructura misma de estos agentes antivirales. Esta aproximación ha sido seguida en nuestro laboratorio para la preparación de dos análogos importantes de Ribavirina, como son 5-metil-1-(β-D-ribofuranosil)imidazol-4-carboxamida (34), que presenta actividad antiviral frente a varios virus y 2-(β-D-ribofuranosil)imidazol-4-carboxamida (Tiazofurina) (35), que presenta importante actividad anticancerosa.

AGRADECIMIENTOS

Quiero reconocer la participación directa en la realización de varias partes de este trabajo de los científicos cuyos nombres

se relacionan más abajo. Muchas de las ideas aquí expuestas son de ellos y otras han surgido de las discusiones que mantenemos sobre estos temas.

En la parte Química han intervenido los Doctores M.T. García-López, R. Herranz, M.J. Camarasa, P. Fernández-Resa, P.P. Méndez-Castrillón, J. Fiandor, A. Calvo-Mateo, A. San Félix, I. Andrés y A. Díaz-Ortiz, del Instituto de Química del C.S.I.C. en Madrid. Los estudios de determinación de la actividad antiviral in vitro, in vivo y de mecanismo de acción han sido realizados por los Doctores L. Carrasco, B. Alarcón y M.E. González, del Centro de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid, y por los Doctores A. García-Gancedo, C. Gil, P. Vilas, S. Pérez y C. Pérez, del Instituto de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C. en Madrid.

BIBLIOGRAFIA

1. E. De Clerq, J. Med. Chem., 29, 1561 (1986).
2. H. Mitsuya y S. Broder, Nature, 325, 773 (1987).
3. R.C. Gallo, Investigacion y Ciencia, 31 (1987).
4. E. De Clerq, TIPS, 8, 339 (1987).
5. P.E. Came y L.A. Caliguiri (Eds.), Chemotherapy of viral infections. Handbook of experimental pharmacology, Vol. 61, Springer-Verlag, Berlín, 1982.
6. D. Sugar (Ed.), "Viral chemotherapy", Pergamon Press, Oxford, 1984.
7. E. De Clerq y R.T. Walker (Eds.), "Targets for the design of antiviral agents", Plenum Press, New York, 1984.
8. R.A. Smith, R.W. Sidwell y R.K. Robins, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 20, 259 (1980).
9. D. Shugar en "Medicinal Chemistry Advances", F.G. De las Heras y S. Vega (Eds.), Pergamon Press, Oxford, 1981, p. 225.
10. E. De Clerq, Biochemical J., 205, 1 (1982).

11. E. De Clerq en "Trends in Medicinal Chemistry". E. Mutschler y E. Winterfeldt (Eds.), VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987, p. 487.
12. P.W. Choppin, C.D. Richardson y A. Scheid, en Ref. 6, p. 287.
13. W.H. Prusoff, T.S. Lin, W.R. Mancini, M.J. Otto, S.A. Siegel y J.J. Lee en Ref. 6, p. 18.
14. D.H. King y G. Galasso (Eds.), "Proceeding of a Symposium on Acyclovir", American J. Medicine, 73, n. 11, 1 (1982).
15. E. De Clerq y R.T. Walker, Pharmac. Ther., 26, 1 (1984).
16. E. De Clerq, A. Holy, I. Rosenberg, T. Sakuma, J. Balzarini y P.C. Maudgal, Nature, 323, 464 (1986).
17. F.M. Veronese, T.D. Copeland, A.L. De Vico, R. Rahman, S. Oroszlan, R.C. Gallo y M.G. Sarngadharan, Science, 231, 1289 (1986).
18. R.T. Schwarz y R. Datema, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 40, 287 (1982).
19. H.D. Klenk y R.T. Schwarz, Antiviral Res., 2, 177 (1982).
20. R. Datema, S. Olofsson y P. Romero, Pharmac. Ther., 33, 221 (1987).
21. G. Tamura. "Tunicamycin", Japan Scientific Societies Press, 1982, Japon.
22. S. Olofsson, M. Lindstrom y R. Datema, Virology, 147, 201 (1985).
23. R.J. Bernacki, Eur. J. Biochem., 58, 477 (1975).
24. G.O. Morton, J.E. Lancaster, G.E. Van Lear, W. Fulmor y W.E. Meyer, J. Am. Chem. Soc., 91, 1535 (1969).
25. J. Castro-Pichel, M.T. Garcia-Lopez y F.G. De las Heras, Tetrahedron, 43, 383 (1987).
26. M.J. Camarasa, P. Fernández-Resa, M.T. García-López, F.G. De las Heras y P.P. Méndez-Castrillón, Nucleosides Nucleotides, 5, 413 (1986).
27. P. Fernández-Resa, M.T. García-López, F.G. De las Heras, A. San Félix, B. Alarcón, L. Carrasco, Eur. J. Med. Chem., 21, 245 (1986).

28. M.J. Camarasa, P. Fernández-Resa, M.T. García-López, F.G. De las Heras, P.P. Méndez-Castrillón, B. Alarcón y L. Carrasco, J. Med. Chem., 28, 40 (1985).
29. J. Fiandor, M.T. García-López, F.G. De las Heras, P.P. Méndez-Castrillón, A. San Félix, B. Alarcón y L. Carrasco, Eur. J. Med. Chem., 22, 59 (1987).
30. C. Gil-Fernández, S. Pérez, P. Vilas, C. Pérez, F.G. De las Heras y A. García-Gancedo, Antiviral Res., 1988.
31. Ver ref. 5 pág. 137-146, ref. 6 pág. 179-253 y ref. 7 pág. 159-176.
32. Ver ref. 5 pág. 117-125, ref. 6 pág. 313-324 y ref. 7 pág. 234-240.
33. R.A. Smith y W. Kirkpatrick (Eds.), "Ribavirin. a broad spectrum antiviral agent". Academic Press, New York, 1980.
34. R. Alonso, J.I. Andrés, M.T. García-López, F.G. De las Heras, R. Herranz, B. Alarcón, L. Carrasco, J. Med. Chem., 28, 834 (1985).
35. M. Fuertes, M.T. García-López, G. García-Muñoz, M. Stud, J. Org. Chem., 41, 4074 (1976).