



Matías Rey i Carrizo

Doctor en química
terapèutica



Matías Rey i Carrizo

Grip A, alarmisme o perill real? Noves molècules actives contra soques resistents

1- CDC. Flu symptoms & severity
<http://www.cdc.gov/flu/about/disease/symptoms.htm> (accessed Feb 25, 2014).

2- a) BRANKSTON, G.; GITTERMAN, L.; HIRJI, Z.; LEMIEUX, C.; GARDAM, M. *Lancet Infect. Dis.* 2007, 7, 257. b) WEBER, T. P.; STILIANAKIS, N. I. *J. Infect.* 2008, 57, 361.

3- LOWEN, A. C.; MUBAREKA, S.; STEEL, J.; PALESE, P. *Plos Pathog.* 2007, 3, 1470.

Per entendre què és la grip A hem de començar pel principi, és a dir, per la grip. La grip és una malaltia viral causada pel virus *influenza* i de la qual la simptomatologia és: tos i mal de coll, nas tapat o mocós, esternuts i ulls plorosos. Aquests símptomes es confonen sovint amb els d'un refredat comú, però, a diferència d'aquest darrer, un malalt de grip pateix de fatiga i/o dolor muscular i de febre.¹ Recordem que la grip es pot transmetre de quatre maneres diferents: i) per contacte físic directe entre la persona infectada i el nou hoste, ii) per contacte indirecte passiu a través d'un objecte intermediari (p. ex.: mans contaminades), iii) per les gotes generades des del tracte respiratori de la persona infectada quan tus, esternuda o parla, iv) transmissió per via aèria a través de la disseminació de virus dintre de gotes que resten en suspensió durant llargs períodes de temps.² Aquesta última via de contagi és la més ràpida i difícil de contenir que existeix i és, per tant, la més perillosa.

Però abans d'entrar més en detall sobre el virus, hem d'esclarir la diferència entre *grip comuna* i *grip pandèmica*. Què és una pandèmia? Doncs és el contagi ràpid d'una malaltia infecciosa a un gran nombre de persones (és a dir, una epidèmia) en grans extensions de terreny com poden ser països, continents o fins i tot el món sencer. En què es distingeix llavors una grip comuna d'una de pandèmica? Primer de tot que el sistema immunitari de la població està acostumat als virus de la grip comuna però no als de la grip pandèmica, perquè aquests són nous. Això fa que aquests virus siguin més infecciosos i que es transmetin independentment de l'estació de l'any. Al contrari, la grip comuna coneix un pic d'incidència a l'hivern, quan les condicions de temperatura i d'humitat són idònies per a la seva propagació.³ Cal tenir en compte que la grip comuna es cura amb tractaments simptomàtics en una o dos setmanes, però la grip pandèmica pot causar complicacions, sovint en forma de pneumònies virals, que poden arribar a ser mortals.⁴ No ens confonguem, la grip comuna també causa morts, però sobretot en gent gran o en gent amb un sistema immunitari compromès, i és la causa d'una gran càrrega

econòmica que es materialitza en hospitalitzacions, absentisme i pèrdua de producció. Però la grip pandèmica pot afectar tant nens i joves com gent gran, tothom indiscriminadament amb possibles efectes mortals.⁴

De virus de la grip n' existeixen de tres tipus, el virus de la grip A, la B i la C. El virus de la grip C és el més infreqüent, i les seves aparicions en les persones són anecdòtiques. El virus de la grip B afecta els humans principalment, però també les foques i les fures, i tot i que el seu ritme de mutació és baix, és prou elevat perquè la immunitat adquirida no duri tota la vida. Però el virus més important, el que trobem més sovint en les gripes comunes i en les pandèmiques, és el virus de la grip A, que és capaç de mutar amb molta facilitat.⁵ És per això que és preferible parlar de grip comuna i de grip pandèmica que de grip A, ja que aquest subtipus es pot referir tant a les gripes comunes com a les pandèmiques.

La grip A ha estat la causant de diverses pandèmies al llarg dels segles XX i XXI i en la taula 1 en teniu els exemples més il·lustratius. Perquè us en feu una idea, la grip comuna causa entre 250.000 i 500.000 morts l'any arreu del món. Entre el 1918 i el 1920 la grip espanyola va matar 50 milions de persones, i la Primera Guerra Mundial, durant la qual s'esdevingué aquesta pandèmia, va causar 16 milions de morts. És per això que es considera un dels desastres naturals més mortífers de la història de la humanitat.⁶ El seu nom prové del fet que en temps de guerra els països afectats, com els Estats Units, França o Alemanya, no van voler cobrir la notícia per evitar que les tropes es desmoralitzessin. En canvi, Espanya, que era un país neutral, va publicar-la sense censura, fet que va estendre la idea errònia que la malaltia va afectar més aquest país que els altres. La grip aviària és més recent, i des del 2003 apareix esporàdicament arreu del món perquè el virus encara circula entre l'aviram; per darrer cop es va manifestar als Estats Units el gener del 2014. La grip porcina va causar gran rebombori a causa de la reaparició del mateix subtipus de virus que el de la grip espanyola, l'H1N1, i tot i que va afectar 48 països, per sort va poder ser controlada a temps.⁸

4- WHO. The international response to the influenza pandemic: WHO responds to the critics. http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/briefing_20100610/en/ (accessed Oct 27, 2014).

5. WHO. Influenza (seasonal). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/> (accessed Oct 27, 2014).

6- a) REID, A. H.; TAUBENBERGER, J. K.; FANNING, T. G. *Microbes Infect.* 2001, 3, 81. b) TAUBENBERGER, J. K.; MORENS, D. M. *Emerg. Infect. Dis.* 2006, 12, 15. c) OXFORD, J. S.; LAMBKIN, R.; ELLIOT, A.; DANIELS, R.; SEFTON, A.; GILL, D. *Vaccine* 2006, 24, 6742. d) KILBOURNE, E. D. *Emerg. Infect. Dis.* 2006, 12, 9.

8- a) COHEN, J.; ENSERINK, M. *Science* 2009, 324, 1496. b) NEUMANN, G.; NODA, T.; KAWAOKA, Y. *Nature* 2009, 459, 931. c) MICHAELIS, M.; DOERR, H. W.; CINATL, J. *Med. Microbiol. Immunol.* 2009, 198, 175. d) DAWOOD, F. S.; IULIANO, A. D.; REED, C.; MELTZER, M. I.; SHAY, D. K.; CHENG, P.-Y.; BANDARANAYAKE, D.; BREIMAN, R. F.; BROOKS, W. A.; BUCHY, P.; FEIKIN, D. R.; FOWLER, K. B.; GORDON, A.; HIEN, N. T.; HORBY, P.; HUANG, Q. S.; KATZ, M. A.; KRISHNAN, A.; LAL, R.; MONTGOMERY, J. M.; MÖLBAK, K.; PEBODY, R.; PRESANIS, A. M.; RAZURI, H.; STEENS, A.; TINOCO, Y. O.; WALLINGA, J.; YU, H.; VONG, S.; BRESEE, J.; WIDDOWSON, M.-A. *Lancet Infect. Dis.* 2012, 12, 687.

Nom de la grip	Subtipus	Mortalitat
Grip Espanyola (1918-1920)	H1N1	50 Milions Taxa de mortalitat 2.5%
Grip Asiàtica (1957-1958)	H2N2	2-3 Milions
Grip de Hong Kong (1968-1970)	H3N2	700 000 i milions d'aus
Grip Aviar (2003-actualitat)	H5N1	393 Taxa de mortalitat 60%
Grip Porcina (2009-2011)	H1N1	290 000 en 48 països

Taula 1. Pandèmies ocorregudes durant els segles XX i XXI

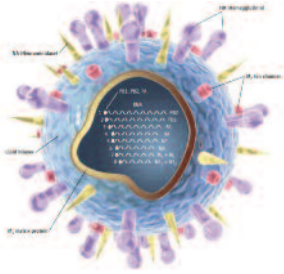


Figura 1. Virus de la grip A anomenat influenza A¹⁰

Però per entendre d'on vénen aquestes pandèmies hem de mirar primer com és el virus de la grip A. S'anomena *influenza A* (figura 1) i tot i que és bastant simple només m'entendré en l'explicació de les 3 proteïnes de superfície que posseeix. Les boles violetes són l'hemaglutinina, de la qual n'hi ha 17 subtipus, i les punxes grogues són la neuraminidasa, de la qual n'hi ha 10 subtipus. Utilitzem l'H i l'N per referir-nos-hi i classificar els virus. Així, el virus de la grip A H5N1 vol dir hemaglutinina tipus 5 i neuraminidasa tipus 1.⁹ Són les proteïnes externes més grans del virus i són les que reconeixen els anticossos del nostre sistema immunitari. Però com que el virus muta molt ràpid, aquestes proteïnes canvien de forma i ja no són reconegudes pels anticossos. A més a més, el virus té la capacitat de recombinar-se, és a dir que dos virus diferents poden entrar dins de la mateixa cèl·lula i recombinar els seus gens per formar un tercer virus diferent que tampoc no és reconegut pels anticossos. Així és com sorgeixen les pandèmies.¹¹ L'última proteïna de la superfície del virus també és la més petita, el canal M2, del qual us parlaré més endavant. Si ara tornem a mirar les pandèmies (taula 1), estem en condicions de contestar la pregunta inicial: grip A, alarmisme o perill real? Bé, doncs des del punt de vista de la química mèdica hi ha un perill real. L'any 2009 l'Organització Mundial de la Salut (OMS) va declarar que la grip porcina era una pandèmia. Els escèptics van pensar que es tractava d'una aliança amb les grans multinacionals farmacèutiques per obligar els governs a comprar els medicaments, ja que és poc probable que amb el sistema sanitari actual es torni a produir l'escenari de la grip espanyola. La prova que avançaven és que la grip porcina només va causar 290.000 morts en 3 anys, que és menys que la grip comuna. El que ells no van tenir en compte és que al mateix temps que circulava la grip porcina també actuava la grip aviària. No veig on és el perill, em direu, amb només 393 morts. Doncs en la taxa de mortalitat, que és del 60%; comparada amb la de la grip espanyola, que ja es considera alta, és una bogeria.^{8b,12} Per sort, però, la grip aviària no es transmet entre els humans, només de l'aviar a la persona, però si aquest virus s'arriba a recombinar, com us explicava abans, amb un virus molt virulent per als humans, com el de la grip porcina, podríem haver arribat a una situació terrible. I això

9- VANDERLINDEN, E.; NAESENS, L. *Med. Res. Rev.* 2014, 34, 301.

10- KAISER, J. *Science* 2006, 312, 380.

11- a) NIH. Antigenic drift <http://www.niaid.nih.gov/topics/flu/research/basic/pages/antigenicdriftillustration.aspx> (accessed Feb 25, 2014). b) NIH. Antigenic shift <http://www.niaid.nih.gov/topics/flu/research/basic/pages/antigenicshiftillustration.aspx> (accessed Feb 25, 2014).

12- ABDEL-GHAFAR, A.; CHOTIPITAYASUNONDI, T.; ZHANCHENG, G.; HAYDEN, F.; HIEN, N.; DE JONG, M.; NAGHDALIYEV, A.; PEIRIS, J.; SHINDO, N.; SOEROSO, S.; UYEKI, T. *N Engl J Med* 2008, 358, 261.

13- SUN, Y.; QIN, K.; WANG, J.; PU, J.; TANG, Q.; HU, Y.; BI, Y.; ZHAO, X.; YANG, H.; SHU, Y.; LIU, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011, 108, 4164.

14- a) KRUG, R. M.; ARAMINI, J. M. *Trends Pharmacol. Sci.* 2009, 30, 269. b) DAS, K.; ARAMINI, J. M.; MA, L.-C.; KRUG, R. M.; ARNOLD, E. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010, 17, 530. c) LEE, S. M.-Y.; YEN, H.-L. *Antiviral Res.* 2012, 96, 391.

15- VON ITZSTEIN, M. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007, 6, 967.

encara pot passar perquè la grip aviària circula entre l'aviram actualment.¹³

Què podem fer llavors? Hi ha diversos tractaments a hores d'ara. El primer, i el més eficaç, és la vacunació. Però tot i la seva eficàcia té dos inconvenients. Primer, la vacuna es prepara amb virus atenuats de les soques que es creu que circularan la temporada vinent, però són una predicció, és a dir que pot ser que no coincideixin amb les soques que realment circulin. Segon, es triga més de 6 mesos a preparar la vacuna, cosa que fa que en cas d'una pandèmia, estariem desprotegits en la seva fase inicial.¹⁴ Per això són necessaris, també, els medicaments. Els que han donat millor resultat són els inhibidors de la neuraminidasa, entre els quals es troba el famós Tamiflu®, que els governs es van apressar a comprar durant la grip porcina. Però també tenen dos desavantatges. El primer és que la seva producció és molt costosa, cosa que dificulta fer-ne un estoc, i el segon és que han començat a aparèixer soques resistents.^{9,14,15} Un altre enfocament és bloquejar el canal M2, que és el que fan els fàrmacs amantadina i rimantadina (figura 2).

Com efectuen aquest bloqueig? Doncs primer hem de mirar què és el canal M2. És un canal de protons essencial per a la replicació, la multiplicació, del virus. El que fa és obrir-se i tancar-se en funció de la necessitat del virus per deixar passar protons i acidificar així l'interior del virus. Això provoca l'alliberació del material genètic viral dintre de la cèl·lula hoste perquè el virus pirategi la maquinària cel·lular i es multipliqui.⁹ El que fa l'amantadina (representada en verd dintre del canal M2 salvatge a la figura 3), d'una manera simplificada, és endinsar-se dintre del canal i crear interaccions per bloquejar físicament el pas de protons i impedir així aquesta acidificació, necessària per a la replicació del virus.¹⁶ El problema és que el virus muta molt ràpid i ha estat capaç de produir canals M2 mutants que són resistents a l'amantadina. Els més rellevants en clínica són els mutants V27A i l'S31N.¹⁷ En el mutant V27A l'entrada del canal s'eixampla i l'amantadina entra però no arriba a crear les interaccions necessàries per establir-se dintre del canal i és expulsada (figura 3c).¹⁸ En el mutant S31N l'entrada s'estreny

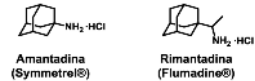


Figura 2. Fàrmacs amantadina i rimantadina

- 16- STOFFER, A. L.; ACHARYA, R.; SALOM, D.; LEVINE, A. S.; DI COSTANZO, L.; SOTO, C. S.; TERESHKO, V.; NANDA, V.; STAYROOK, S.; DEGRADO, W. F. *Nature* 2008, 451, 596.
 17- WANG, J.; MA, C.; FIORIN, G.; CARNEVALE, V.; WANG, T.; HU, F.; LAMB, R. A.; PINTO, L. H.; HONG, M.; KLEIN, M. L.; DEGRADO, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 12834.
 18- a) GU, R.-X.; LIU, L. A.; WANG, Y.-H.; XU, Q.; WEI, D.-Q. *J. Phys. Chem. B* 2013, 117, 6042. b) GU, R.-X.; LIU, L. A.; WEI, D.-Q. *Trends Pharmacol. Sci.* 2013, 34, 571.

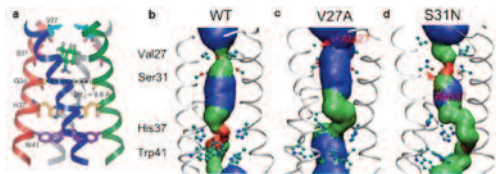


Figura 3. a) Vista lateral de l'amantadina (verd) en el seu lloc d'unió en el porus del canal M2 salvatge,¹⁹ b) canal M2 salvatge, c) canal M2 mutant V27A i d) canal M2 mutant S31N. L'esquelet de la proteïna es mostra en blanc. El porus del canal es representa en un codi de colors segons el seu radi: vermell si és < 1.4 Å, verd si el radi està entre 1.4 Å i 2.8 Å i blau si és > 2.8 Å^{18a}

19- CADY, S. D.; SCHMIDT-ROHR, K.; WANG, J.; SOTO, C. S.; DEGRADO, W. F.; HONG, M. *Nature* 2010, 463, 689.
 20- WHO. Laboratory methodologies for testing the antiviral susceptibility of influenza viruses: M2 ion channel inhibitor. http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/antiviral_susceptibility/m2i_nhibitor/en/ (accessed on 15th October 2014).

i l'amantadina no pot arribar fins al seu lloc d'unió dintre del canal (figura 3d).¹⁸

A causa de l'aparició d'aquests mutants resistents i els efectes secundaris que causava l'amantadina, l'OMS en desaconsella l'ús.²⁰ Per això, i si tenim en compte tot el que us he explicat sobre els tractaments actuals, és fàcil deduir que calen noves alternatives per lluitar contra el virus de la grip. És el que fem en el nostre grup d'investigació, busquem molècules capaces de bloquejar el canal mutant V27A i, idealment, que siguin bloquejadors duals, és a dir, que bloquegin el canal M2 salvatge i el mutant V27A per evitar així al màxim les resistències.

El meu treball de tesi ha consistit en la síntesi orgànica d'amines policíclics, anàlogues de l'amantadina, que han estat provades com a antivirals. En total he fet 5 rutes sintètiques diferents. La primera va ser curta i ràpida, però el problema sempre és obtenir els compostos amb prou quantitat i puresa perquè pugin ser avaluats farmacològicament. La segona va consistir a realitzar derivats d'un policicle inicial en forma de compostos saturats, insaturats, guanidines i piperidines. La tercera va ser la més llarga duta a terme durant aquest treball, i constava de 10 etapes per arribar a dos amines finals amb un rendiment mitjà del 2% i d'11 etapes per arribar a les guanidines. La quarta va consistir en la construcció d'un nou policicle i va incloure dos reaccions molt boniques, molt visuals. Una descloració en una solució d'electrons lliures en amoníac líquid a baixa temperatura, que té un color blau elèctric característic, i una

descarbonilació amb una ciclació intramolecular, tot en una sola etapa en un reactor a pressió. La cinquena i última ruta sintètica també contenia una reacció diferent a les altres, una reacció fotoquímica, és a dir

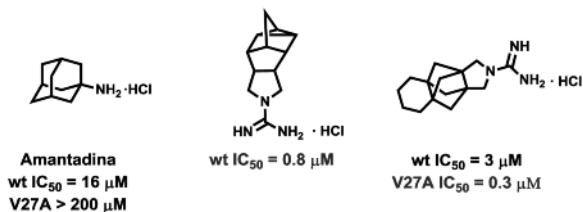


Figura 4. L'amantadina i les seves activitats contra el canal M2 salvatge (wt) i el mutant V27A; com més baixa és la IC₅₀ més potent és el compost. Es mostren també les dos molècules més actives sintetitzades durant la tesi contra el canal M2 salvatge i el canal M2 mutant V27A. Aquesta última molècula és, actualment, el compost més actiu que mai s'havia sintetitzat contra aquesta soca mutant.

catalitzada per l'energia de la llum, en aquest cas ultraviolada, per tancar un tricicle en forma de pentacle.

En col·laboració amb els químics teòrics de la nostra facultat vam realitzar models matemàtics per mostrar com una d'aquestes últimes molècules bloquejaria el canal M2 salvatge i el canal M2 mutant V27A. També en col·laboració, aquest cop amb farmacòlegs de Bèlgica i dels Estats Units, vam provar els nostres compostos contra el virus de la grip A. Els resultats van ser que molts compostos van resultar més actius que l'amantadina contra la soca salvatge i, cosa més important, uns quants d'entre ells van resultar ser inhibidors duals del canal M2 salvatge i mutant V27A (figura 4).²¹

Però el recorregut per arribar fins a un medicament és molt llarg i costós, i nosaltres només estem a l'etapa inicial. Per això ens cal continuar investigant, especialment en aquesta malaltia que, pel fet de ser causada per un virus amb una ràtio de mutació tan alta i per tenir diverses espècies animals com a hoste, serà difícilment eradicada a diferència d'altres malalties virals.

21- a) REY-CARRIZO, M.; TORRES, E.; MA, C.; BARNIOL-XICOTA, M.; WANG, J.; WU, Y.; NAESENS, L.; DEGRADO, W. F.; LAMB, R. A.; PINTO, L. H.; VÁZQUEZ, S. *J. Med. Chem.* 2013, 56, 9265. b) REY-CARRIZO, M.; BARNIOL-XICOTA, M.; MA, C.; FRIGOLÉ-VIVAS, M.; TORRES, E.; NAESENS, L.; LLABRÉS, S.; JUÁREZ-JIMÉNEZ, J.; LUQUE, F. J.; DEGRADO, W. F.; LAMB, R. A.; PINTO, L. H.; VÁZQUEZ, S. *J. Med. Chem.* 2014, 57, 5738. c) TORRES, E.; LEIVA, R.; GAZZARRINI, S.; REY-CARRIZO, M.; FRIGOLÉ-VIVAS, M.; MORONI, A.; NAESENS, L.; VÁZQUEZ, S. *ACS Med. Chem. Lett.* 2014, 5, 831. d) REY-CARRIZO, M.; GAZZARRINI, S.; FRIGOLÉ-VIVAS, M.; NAESENS, L.; LLABRÉS, S.; JUÁREZ-JIMÉNEZ, J.; MORONI, A.; LUQUE, F. J.; VÁZQUEZ, S. *Writing in progress.*