

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

**INHIBIDORES DE LA MULTIPLICACION DEL
VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA**

**Memoria presentada por
María Dolores García
Villalón para optar al
grado de Dr. en Farmacia.**

El trabajo que se describe en esta Memoria ha sido realizado bajo la dirección de la Dra. Carmen Gil Fernández, Investigador Científico del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que de diversas formas han aportado su generosa ayuda, para que yo haya podido llevar a buen término esta empresa.

En primer lugar, mi especial gratitud a la directora de la tesis, Dra. Carmen Gil Fernández, que ha confiado en mí durante largo tiempo y ha dedicado sus inestimables enseñanzas y su infatigable colaboración para la realización de este trabajo.

Agradezco al Dr. Eduardo Páez Abril sus orientaciones y consejos que han facilitado la consecución de esta tesis.

Mis compañeros de laboratorio, Francisco García Tabares, por su colaboración desinteresada y acertadas sugerencias, y M^a Antonia Ortiz Casado por su constante apoyo, merecen mi sincero agradecimiento.

Mi gratitud al Profesor César Nombela Cano, Director del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la U.C.M., que ha facilitado la presentación de esta tesis y a la Profesora Carmen de la Rosa Jorge que ha aceptado amablemente la ponencia de la misma.

Finalmente, la constante comprensión y ayuda de mis padres y hermano, han servido para elevar mi ánimo cuando algunas veces decaía ante los problemas que se han presentado.

Debo indicar que el presente trabajo ha sido realizado en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), gracias a una beca adscrita a un proyecto de investigación subvencionado por el Ministerio de Industria y Energía (FAR 88-0160/2).

ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|---|
| AZT | Azidotimidina |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| CC ₅₀ | Concentración citotóxica 50% |
| CE ₅₀ | Concentración efectiva 50% |
| Ci | Curio |
| cpm | Cuentas por minuto |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Acido desoxirribonucleico |
| DNasa | Desoxirribonucleasa |
| ECP | Efecto citopático |
| EDTA | Acido etilendiaminotetraacético |
| HIV | Virus de la inmunodeficiencia adquirida |
| HSV-1 | Virus herpes simple tipo 1 |
| HSV-2 | Virus herpes simple tipo 2 |
| IS | Índice selectivo |
| PI | Proteínas víricas inducidas durante la infección |
| MDI | Multiplicidad de infección |
| RNA _m | RNA mensajero |
| nm | Nanómetro |
| PBS | Solución salina tamponada |
| μCi/ml | Microcurios por mililitro |
| μg | Microgramo |
| μM | Micromolar |
| RNA | Acido ribonucleico |
| SAH | (S)-adenosilhomocisteína |
| SDS | Dodecil sulfato sódico |
| SDS-PAGE | Electroforesis en geles poliácridamida en presencia de SDS |
| TEMED | N,N,N',N'-tetraetilendiamina |
| UFP | Unidad formadora de placa |
| vPPA | Virus de la peste porcina africana |

INDICE

| | Página |
|--|---------------|
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| 1.1. <i>CONSIDERACIONES GENERALES</i> | 2 |
| 1.2. <i>ORIENTACION ACTUAL DE LA INVESTIGACION EN ANTIVIRICOS</i> | 6 |
| 1.3. <i>VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA</i> | 10 |
| 1.3.1. <i>Características</i> | 10 |
| 1.3.2. <i>Antivíricos que actuan inhibiendo la multiplicación del virus de la peste porcina africana</i> | 13 |
| 1.4. <i>OBJETIVOS DEL TRABAJO</i> | 15 |
| | |
| 2. MATERIALES Y METODOS | 19 |
| 2.1. <i>MATERIALES</i> | 20 |
| 2.1.1. <i>Cepas de virus</i> | 20 |
| 2.1.2. <i>Líneas celulares</i> | 20 |
| 2.1.3. <i>Medios de cultivo celular</i> | 20 |
| 2.1.3.1. <i>Multiplicación</i> | 20 |
| 2.1.3.2. <i>Mantenimiento</i> | 20 |
| 2.1.3.3. <i>Congelación</i> | 21 |
| 2.1.4. <i>Productos y reactivos</i> | 21 |
| 2.1.5. <i>Compuestos ensayados como posibles antivíricos</i> | 22 |
| 2.2. <i>METODOS</i> | 23 |
| 2.2.1. <i>Cultivo de células</i> | 23 |
| 2.2.2. <i>Multiplicación del virus</i> | 24 |
| 2.2.3. <i>Método de titulación del virus</i> | 25 |
| 2.2.4. <i>Purificación del virus de la peste porcina africana</i> | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2.5. Marcado radiactivo de virus purificado..... | 26 |
| 2.2.6. Síntesis de proteínas..... | 27 |
| 2.2.6.1 Marcado radiactivo de las proteínas..... | 27 |
| 2.2.6.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS | 27 |
| 2.2.7. Adsorción del virus marcado con (³⁵ S)-metionina a las células..... | 28 |
| 2.2.8. Determinación de las concentraciones citotóxicas de los compuestos ensayados..... | 28 |
| 2.2.8.1. Evaluación por el método colorimétrico..... | 28 |
| 2.2.8.2. Evaluación por la inhibición de la síntesis de proteínas mediante incorporación de (³⁵ S)-metionina..... | 29 |
| 2.2.8.3. Evaluación por observación directa al microscopio óptico..... | 29 |
| 2.2.9. Método de selección de los compuestos con capacidad inhibidora de la multiplicación del virus..... | 30 |
| 2.2.10. Determinación de las concentraciones inhibitoras de la multiplicación del virus de los compuestos ensayados..... | 30 |
| 2.2.11. Índice selectivo..... | 31 |
| 3. RESULTADOS..... | 32 |
| 3.1. D-PENICILAMINAS SINTÉTICAS..... | 33 |
| 3.2. ANALOGOS DE AMANTADINA..... | 38 |
| 3.3. POLISACARIDOS SULFATADOS | 44 |
| 3.4. ANALOGOS DE NUCLEOSIDOS..... | 61 |
| 3.4.1. Fosfonil metoxialquil purinas y fosfonilmetoxialquil pirimidinas..... | 61 |
| 3.4.2. Derivados de adenosina..... | 73 |

| | |
|--------------------------------|------------|
| 3.5. COMPUESTOS ANIONICOS..... | 105 |
| 4. DISCUSION..... | 123 |
| 5. RESUMEN..... | 136 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 140 |
| 7. BIBLIOGRAFIA..... | 144 |

1. INTRODUCCION

1.1. *CONSIDERACIONES GENERALES*

La quimioterapia específica antivírica es una parte importante de la lucha contra las enfermedades producidas por virus. Otros procedimientos son la prevención de la difusión de la infección mediante el control de los vectores, la estimulación de los mecanismos naturales de defensa por vacunación, la inmunización pasiva, la utilización de sustancias inmunomoduladoras tales como el interferón, y finalmente el tratamiento sintomático.

Actualmente es necesario buscar drogas antivíricas para la prevención y tratamiento de una serie de enfermedades causadas por virus que aún no tienen adecuado tratamiento. Entre éstas podemos citar gripe, enfermedades humanas del tracto respiratorio (rinovirus), hepatitis, gastroenteritis, mononucleosis infecciosa, rabia, fiebres hemorrágicas, verrugas, SIDA, enfermedades de animales tales como peste porcina africana, etc. También pueden ser necesarios nuevos antivíricos para el tratamiento de tumores asociados a virus, como linfoma de Burkitt, sarcoma de Kaposi, carcinomas de cérvix, algunas leucemias, hepatoma, carcinomas nasofaríngeos, y finalmente en la lucha contra las infecciones víricas en pacientes inmunodeprimidos (transplantados, tratados con antimitóticos, etc.) debidas a virus del grupo herpes, principalmente citomegalovirus.

El progreso de la quimioterapia antivírica ha sido lento con respecto al alcanzado por el desarrollo de los agentes antibacterianos. Ello es debido a la estrecha dependencia de la célula por parte del virus, el cual necesita de la maquinaria metabólica de aquella para su multiplicación.

Se han identificado el número de fases específicas de la replicación vírica, que son susceptibles de ser atacados por los agentes antivíricos. En líneas

generales son la adsorción, penetración, desnudamiento del virus, síntesis de los ácidos nucleicos, síntesis de las proteínas, ensamblaje de los componentes del virus y liberación del virus al exterior de la célula. (Figura 1). Es destacable que en la replicación de muchos virus se vean implicadas enzimas codificadas por los mismos tales como RNA polimerasa, DNA polimerasa, transcriptasa inversa, nucleasas, quinasas, ribonucleótido reductasa, metilasas, guaniltransferasas y proteasas. Las enzimas mencionadas pueden considerarse como un blanco adecuado y deben tenerse en cuenta en el diseño de antivíricos que actúen de un modo específico frente a los virus sin dañar a la célula huésped.

Uno de los problemas básicos para el desarrollo de agentes antivíricos es la dependencia del proceso replicativo del virus del sistema metabólico de la célula huésped. El agente antivírico ideal es una droga que interacciona con el proceso vital del virus sin afectar las funciones celulares. Sin embargo, en contraste con los agentes activos contra las infecciones bacterianas, el descubrimiento de drogas antivíricas selectivas, pareció imposible durante largo tiempo. La primera droga activa descubierta contra la infección con herpesvirus fue la iododesoxiuridina (Herrman, 1961). Fue sintetizada por primera vez por Prusoff (1959), como parte de un programa contra el cáncer. Esta droga presenta una selectividad limitada pues debido a que inhibe como droga intercalante en el DNA celular normal, está desaconsejada en tratamientos que no sean de uso tópico (Prusoff, 1967; Prusoff y Ward, 1976). Este bajo grado de selectividad fue una característica típica de la primera generación de drogas, descubiertas como resultado de programas contra el cáncer o por azar.

El descubrimiento de que los virus inducen enzimas codificadas por ellos, ha abierto un nuevo camino en la búsqueda de agentes antivíricos selectivos.

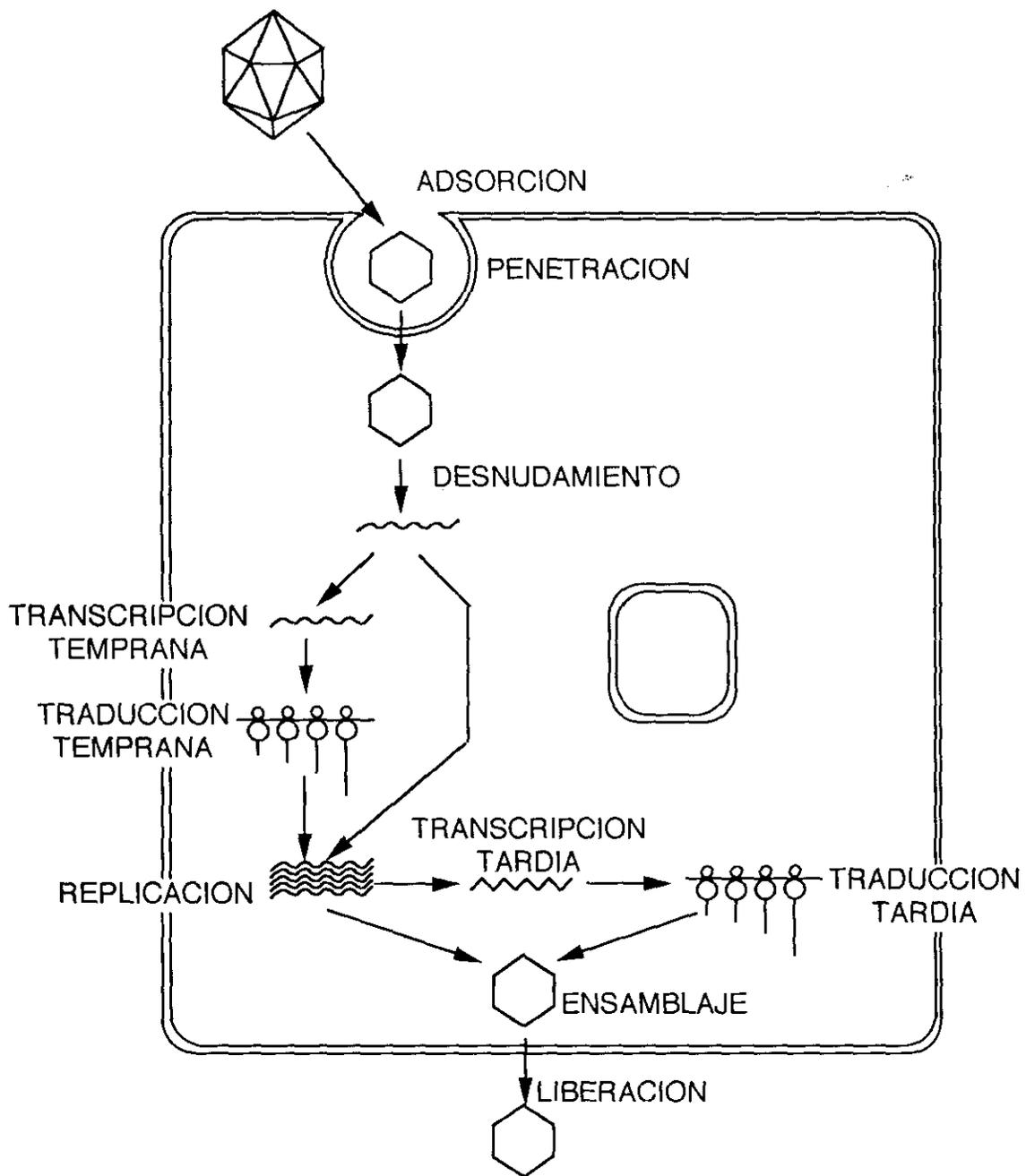


Figura 1. Esquema del proceso de multiplicación del vPPA

El conocimiento de dichas enzimas, unido al desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos, junto con métodos perfeccionados de síntesis química, ha llevado a conseguir métodos más racionales para desarrollar antivíricos con alta actividad y sin toxicidad. Así se ha llegado a la segunda generación de antivíricos basándose en la interferencia específica con los procesos víricos, sin afectar los procesos celulares.

Se han obtenido sustancias antivíricas por medio de síntesis química, a partir de extractos de vegetales y de animales inferiores marinos.

Desafortunadamente, muchas sustancias tanto naturales como sintéticas, que al ser ensayadas en cultivos celulares muestran propiedades antivíricas, son considerablemente menos efectivas cuando se ensayan en el modelo animal infectado experimentalmente por el virus. Esto puede ser debido a dificultades de transporte de la droga hasta el tejido infectado y a través de él, especialmente cuando los tejidos resultan inflamados como resultado de la infección vírica. Tampoco puede descartarse el fenómeno, aunque menos frecuente, de que drogas no activas en cultivos celulares, sí lo son en el modelo animal.

Hay que tener en cuenta sin embargo, que muchos antivíricos son demasiado tóxicos para aplicaciones terapéuticas, pero algunos son útiles para obtener más información sobre las diferentes fases de la multiplicación vírica.

Una característica importante de la investigación en antivíricos consiste en la necesidad de equipos multidisciplinarios que desarrollen las distintas partes que comprende su estudio y que reseñamos a continuación: a) la obtención de nuevos compuestos que en la mayor parte de los casos son desconocidos hasta el momento y proceden de aislamientos de productos naturales o bien de síntesis química lo cual exige especialistas, fundamentalmente químicos

orgánicos, b) con las drogas obtenidas han de abordarse los estudios de su posible capacidad antivírica, mecanismos de acción, actividad en modelos animales que necesita especialistas virólogos y c) el ensayo en humanos de los compuestos encontrados activos *in vitro* que lo realizan equipos clínicos.

Actualmente existen diversas industrias farmacéuticas que dedican gran esfuerzo sobre este tema, como así mismo lo hacen laboratorios de investigación universitarios y otros centros. Existen revistas internacionales dedicadas con exclusividad o parcialmente a la publicación de trabajos sobre antivíricos.

Todo ello apoya y justifica una dedicación a este tema de investigación que puede tener en los casos más destacados un reflejo claro y directo en la curación de enfermedades a veces de gran importancia para la sanidad humana y de interés económico en la lucha de enfermedades víricas en animales domésticos.

1.2 ORIENTACION ACTUAL DE LA INVESTIGACION EN ANTIVIRICOS

Una serie de consideraciones deben ser tenidas en cuenta para el estudio de los medios de lucha contra los virus patógenos. En la actualidad son básicas las que a continuación se exponen.

a) Vías de actuación

1. Control de los vectores del virus.
2. Mecanismos de defensa natural por vacunación.
3. Inmunización pasiva.
4. Compuestos inmunomoduladores.
5. Quimioterapia preventiva.

6. Quimioterapia post-infección.

Sin embargo existen virus que no pueden ser combatidos con ninguna de las tres primeras vías. Este es el caso del virus de la peste porcina africana (vPPA) debido a que durante la infección del virus en el cerdo no se inducen anticuerpos neutralizantes, y por lo tanto no es posible la elaboración de una vacuna por los métodos convencionales. La utilización de compuestos inmunomoduladores como los interferones o las interleuquinas, aunque parece una vía alternativa posible, necesita de más investigación para determinar su utilidad potencial. La solución alternativa es encontrar drogas que inhiban el desarrollo y multiplicación vírica en la célula huésped (quimioterapia).

Una droga antivírica puede definirse como un producto que es capaz, *in vitro* e *in vivo*, de reducir la presencia del virus infectivo directa o indirectamente en la célula huésped.

Una droga para ser efectiva debe ponerse en contacto con el virus y bloquear la adsorción a los receptores celulares o bien penetrar en las células para alcanzar la concentración intracelular necesaria y actuando como tal o por modificaciones dentro de la célula convertirse en un producto activo frente al virus, mientras que los sistemas específicos celulares queden intactos.

b) Cualidades ideales de una droga antivírica.

1. Poseer selectividad.
2. No inducir resistencia del virus frente a la droga.
3. No inducir persistencia o latencia en el virus.

La selectividad de una droga antivírica siempre es un problema en la terapéutica. La selectividad disminuye: a) si existe un homólogo celular de la diana vírica y b) cuanto mayor sea el grado de similitud entre las dianas vírica y celular. Además, existen virus que utilizan el arsenal enzimático celular para su multiplicación y por ello las drogas que alteran la multiplicación vírica también

alteran la celular. Sin embargo los virus que poseen su propia maquinaria enzimática poseen dianas más específicas para posibles sustancias antivíricas.

La resistencia del virus a la droga resulta de la selección y multiplicación de una población mutante. Este mecanismo puede ser debido a la alteración en la diana de la droga o bien por disminución de la capacidad enzimática para convertir la droga en un metabolito activo.

La persistencia o latencia del virus son quizá los problemas más difícil de solucionar y hasta el momento no existen soluciones alternativas.

Los mejores candidatos como drogas antivíricas útiles en clínica serían sustancias que actuaran específicamente en los diferentes pasos de la multiplicación vírica. Estos compuestos actuarían a bajas concentraciones y no interferirían en los procesos celulares. También existen muchas sustancias que poseen una actividad frente al virus extracelular, como son: agentes desnaturalizantes, detergentes, solventes lipídicos, alcoholes, fenoles, etc. Estos compuestos presentan una acción viricida, pues destruyen el virus extracelular y por lo general son necesarias altas concentraciones de estos productos para que sean efectivos. Por su toxicidad para las células no pueden utilizarse como antivíricos.

c) Posibles estrategias.

La obtención de nuevos antivíricos efectivos contra los diferentes virus puede ser orientada a inhibir cualquiera de los diferentes pasos de la multiplicación vírica. A continuación indicamos compuestos o grupos de compuestos que se sabe actúan sobre las diferentes fases de la infección vírica. (Montgomery, 1989).

1. Adsorción: Oligopéptidos, Polisacáridos sulfatados.
2. Penetración: Amantadina, Oligopéptidos.
3. Desnudamiento: Amantadina.

4. Transcripción temprana: Ribavirina, Cc₃-Ado, AZT.
5. Traducción temprana: Interferón (inductor).
6. Replicación: Análogos de pirimidinas y purinas, Tiosemicarbazonas.
7. Transcripción tardía: Interferón.
8. Traducción tardía: Interferón.
9. Ensamblaje: Inhibidores de la glicosilación.
10. Liberación: Interferón.

d) Selección del sistema célula huésped.

Para evaluar un nuevo agente antivírico, la primera premisa necesaria es seleccionar el sistema célula huésped en el cual puede ser medida la replicación vírica. Los virus varían considerablemente en su capacidad para replicar en cultivos celulares. No todos los virus pueden infectar todo tipo de células. El origen de la especie animal de que procedan o del tejido que se deriven hace que unos cultivos celulares sean permisivos para determinados virus, que produzcan infecciones abortivas o que no puedan ser infectados. Muchos virus pueden causar efectos citopáticos (ECP) mientras que otros, además, pueden formar placas. Otros son capaces de ejercer una función especial, como por ejemplo hemaglutinación, hemadsorción o transformación celular. La replicación vírica en cultivos celulares pueden ser también monitorizada por detección de productos víricos como DNA vírico, RNA vírico o polipéptidos.

Sin embargo, los tests antivíricos más utilizados son: inhibición de los efectos citopáticos, reducción de la formación de placas, reducción del título del virus u otras funciones. Por lo tanto, sería crítica la búsqueda de un tipo de cultivo celular que permita la ejecución de estos *tests* antivíricos.

e) Factores que influyen en la evaluación de agentes antivíricos en cultivos

Como fundamentales enumeramos los siguientes:

1) Sistema célula huésped.

Se ha demostrado que existe diferente sensibilidad de las diferentes especies celulares frente a un mismo virus y por lo tanto también diferente toxicidad y actividad de los agentes antivíricos. Por esta razón, es conveniente probar un agente antivírico en varias líneas celulares para seleccionar la línea celular más adecuada.

2) Multiplicidad de infección del virus.

La multiplicidad de infección (mdi) (relación entre número de viriones que se inoculan y número de células que se infectan) puede influir sustancialmente la evaluación de un agente antivírico. Una mdi alta disminuye la sensibilidad del virus al agente antivírico.

1.3. VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA (VPPA).

1.3.1. Características.

Este virus recibe en inglés el nombre de "African swine fever virus" cuya traducción literal no coincide exactamente con el nombre español de peste porcina africana lo cual produce a veces errores.

Fué aislado por primera vez por Montgomery en 1921 en Africa del Este. De allí pasó a Portugal en 1957, transmitiéndose después a España en 1960. Más tarde aparecieron focos en Francia en 1964, 1968 y 1984; en Italia en 1967 y 1968; en Malta y Cerdeña en 1978; en Bélgica en 1985 y en Holanda en 1986, llegando a América donde comenzó en la isla de Cuba en 1971 y posteriormente pasó a la República Dominicana y Brasil en 1978 y a Haití en 1979.

El vPPA puede producir una infección aguda, que a su vez puede ser seguida por una enfermedad persistente en determinados casos. El virus puede aislarse de la sangre y diversos órganos de los animales infectados durante periodos de tiempo prolongados, incluso animales supervivientes son capaces de transmitirlo. Estos animales desarrollan anticuerpos que pueden detectarse mediante precipitación en agar-gel, inmunofluorescencia indirecta, inmunoelectroforesis, inmunodifusión radial, fijación del complemento, enzimoimmunoensayo y radioimmunoensayo (Hess, 1981).

El vPPA posee simetría icosaédrica con un diámetro de 175 a 215 nm (Breese y De Boer, 1966) con un promedio de 190 nm. Morfológicamente consiste en un nucleoide denso a los electrones denominado *core* formado por nucleoproteína cuyo diámetro es de 80 nm.

Rodeando al *core* presenta una membrana lipoproteica interna, rodeada a su vez de la cápsida formada por una serie de cápsomeros ordenados de forma hexagonal. A su vez la cápsida queda englobada dentro de otra capa lipoproteica externa denominada envuelta. El DNA es lineal de doble cadena (Haag y cols, 1965; Enjuanes y cols, 1976; Sánchez Botija y cols, 1977), con los extremos unidos covalentemente (Ortín y cols. 1979), el peso molecular es de 10^8 g/mol (Enjuanes y cols, 1976) y está constituido por alrededor de 170.000 pares de bases.

Se clasificó por su morfología, en la familia Iridoviridae (Mathews, 1982), pero en 1984 se ha separado de esta familia basado en diferentes características genéticas y moleculares y actualmente está pendiente de clasificación.

El vPPA se multiplica en el citoplasma celular aunque necesita también el núcleo celular para su replicación (Ortín y Viñuela, 1977; Tabarés y Sánchez Botija, 1979). La penetración del virus en la célula sucede mediante endocitosis (Breese y De Boer, 1966), formándose vesículas que pueden englobar varios

viriones que fusionan sus envueltas con la membrana del endosoma liberándose así al citoplasma celular. En los cultivos de células Vero se ha observado la existencia de un receptor que interviene en el proceso (Alcamí y cols. 1989a). Posteriormente y cerca del núcleo de la célula empieza a formarse una zona membranosa (Moura Nunes y cols, 1975; Breese y De Boer, 1966) que va aumentando y que luego da lugar a estructuras de tipo helicodal o de racimo con virus incompletos de forma poliédrica (Breese y De Boer, 1967) y la asociación de ribosomas con las envueltas del virus. El virus intracelular completo emigra hacia la membrana de la célula y se libera a través de ésta adquiriendo una nueva envuelta de origen celular modificada por inclusión de proteínas víricas (Breese y De Boer, 1967; Vigarío y cols. 1974).

El virus intracelular contiene al menos 28 polipéptidos (Carrascosa y cols, 1978; Tabarés y cols. 1980), y se han descrito tres glicoproteínas (Tabarés y cols. 1980). Con referencia a enzimas del vPPA hasta ahora se han contado 7 actividades enzimáticas diferentes: RNA-polimerasa DNA dependiente (Kuznar y cols. 1980; Salas y cols. 1983), proteína quinasa (Polatnik y cols. 1974; Martín y Tabarés, 1991), nucleósido trifosfato fosfohidrolasa (Kuznar y cols. 1981), topoisomerasa (Salas y cols. 1983), timidina quinasa (Polatnik and Hess. 1970), DNAsa específica de cadena sencilla (Barros y cols. 1986), enzimas para la metilación, *capping* y poliadenilación de los RNA mensajeros (Salas y cols. 1981).

El virus de la peste porcina africana ataca prácticamente de forma exclusiva a suidos. En Africa infecta a Phacochoerus aetiops, Potamochoerus porcus en su estado salvaje (De Tray 1963) y a cerdos domésticos a los que generalmente produce una enfermedad letal. Se transmite por las vías comerciales a partir de animales vivos infectados o productos cárnicos de aquellos. Se ha encontrado virus en algunas especies de Argásidos (Ornithodoros erraticus) en los que

puede persistir hasta varios años (Sánchez Botija 1982; Sánchez Botija 1963) transmitiéndose entre ellos de forma transovárica sexual y por contacto. Mediante picaduras transmiten el virus a los cerdos inyectándolo en sangre. Parece ser que existe transmisión aérea (Wardley y cols. 1983).

Se ha observado la persistencia del virus inducida experimentalmente en células Vero mediante la acción del $CINH_4$ (Salas y Viñuela, 1986) y por la acción de 5-iodo-2'-desoxiuridina (Gil Fernández y García Villalón. 1988). Se ha conseguido la curación de estos cultivos persistentemente infectados por medio de interferón así como también de infecciones líticas inducidas por el vPPA en células Vero (Páez y cols. 1990)

1.3.2. *Antivíricos que actúan inhibiendo la multiplicación del vPPA.*

Diversos compuestos se han ensayado anteriormente a este trabajo en diferentes laboratorios incluyendo el nuestro. Debemos destacar que de 25 compuestos que se registran, 21 lo han sido en nuestro laboratorio. El más activo ha sido el (S)-9-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)adenina con un índice selectivo de 15.000 (Gil Fernández y De Clercq, 1987b).

Algunos comentarios sobre la forma de actuar de ciertos compuestos entre los citados bien frente al vPPA o frente a otros virus pueden ser interesantes (véase tabla 1). La heparina, inhibe la interacción virus-célula en el caso de los virus herpes tipo 1 y 2, compitiendo con el virus en su unión a los receptores celulares (WuDunn y cols. 1989).

La cloroquina altera el pH de los lisosomas que están implicados en el desnudamiento de la partícula vírica (Geraldés y Valdeira, 1985; Alcamí y cols. 1989b) e interfiere con este fenómeno. Otras sustancias lisosomotrópicas son la dansilcadaverina, amantadina, cloruro amónico y metilamina.

La rifampicina inhibe específicamente la RNA polimerasa DNA dependiente, enzima que posee el vPPA (Kuznar y cols.1980). Este fenómeno tiene lugar en la transcripción temprana.

La síntesis del DNA vírico requiere una polimerasa inducida por el virus (Polatnick y Hess. 1972). El ácido fosfonoacético inhibe a bajas concentraciones la DNA polimerasa vírica específicamente (Moreno y cols, 1978; Gil Fernández y cols, 1979). La 5-iodo-2'-desoxiuridina es un análogo de nucleósido que se incorpora a la cadena de DNA que se está formando y detiene la replicación del DNA. Este compuesto se ha demostrado que inhibe la multiplicación del vPPA (Haag y cols, 1965; Gil Fernández y cols, 1979).

Para realizarse el ensamblaje del virus deben sintetizarse una serie de proteínas necesarias para las cubiertas víricas de las que algunas son proteínas glicosiladas. Análogos de uridina-5'-difosfato glucosa pueden interferir esta acción sobre diversos virus entre ellos el vPPA (Gil Fernández y cols. 1987a).

TABLA I. Antivíricos que actúan sobre la multiplicación del vPPA.

| <i>Compuesto</i> | <i>Referencia</i> |
|----------------------------|---------------------------|
| 5-iodo-2'-desoxiuridina | Haag y cols. 1965 |
| Gil Fernández y cols 1979 | |
| Rifampicina | Dardiri y cols. 1971 |
| Kuznar y cols. 1980 | |
| Ac. fosfonoacético | Moreno y cols. 1978 |
| Gil Fernández y cols. 1979 | |
| Villinger y cols. 1990 | |
| Rifamicina | Salas y cols. 1983 |
| Coumermicina A1 | " |
| Cloroquina | Geraldes y Valdeira. 1985 |
| Dansilcadaverina | Alcamí y cols. 1989a |

| | |
|--|----------------------------------|
| Amantadina | " |
| Cloruro amónico | " |
| Metilamina | " |
| Análogos de 5'uridina-difosfato glucosa | Gil Fernández y cols. 1987a |
| -[[[(2,3,4,6-tetra-O-benzoil- α -D-glucopiranosil)oxi]carbonil]amino]sulfonil]uridina | " |
| Monolein | Sola y cols. 1986a |
| Monolinolein | " |
| γ -linolenil alcohol | " |
| Carragenina iota | Sola y cols. 1986b |
| Atropina | " |
| Suramina | " |
| Megalomicina | " |
| (S)-HPMPA | Gil Fernández y De Clercq. 1987b |
| PMEA | " |
| (RS)-AHPA | " |
| (S)-DHPA | " |
| Cc ₃ -Ado | " |
| Azidoimidina (AZT) | " |
| Pirazofurina | " |
| Rivabirina | " |
| Ac. fosfonofórmico | Villinger y cols. 1990 |

1.4. OBJETIVOS DEL TRABAJO

La peste porcina africana es una enfermedad que ataca a los cerdos domésticos con importantes consecuencias de tipo económico, por lo cual recibe una especial atención de las autoridades de los países afectados, tomándose inmediatamente severas medidas de precaución zoonosanitarias, para evitar la difusión del virus y la extensión de los focos infecciosos aparecidos.

Se ha intentado combatir la enfermedad mediante la obtención de una vacuna adecuada, pero en este caso después de largo tiempo de investigación las perspectivas de conseguirla son muy desalentadoras, debido básicamente a la falta de anticuerpos neutralizantes en los animales infectados y a posiblemente también una cierta variabilidad genética del virus.

Por ello, la alternativa es la aplicación de la quimioterapia, que por medio de compuestos activos frente al virus, inhiban su multiplicación, consigan la curación de los animales infectados e impidan la difusión de la enfermedad por contagio.

El objetivo del presente trabajo, teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, es la búsqueda de compuestos inhibidores de la multiplicación del virus de la peste porcina africana en cultivos celulares, el estudio de la capacidad antivírica de dichos compuestos y la determinación de las fases de la multiplicación vírica que son inhibidas.

Por ello se han seleccionado varios grupos de compuestos buscando su posible actividad frente a fases concretas de la multiplicación del vPPA.

a) D-Penicilaminas sintéticas

Se ha demostrado que la D-penicilamina, que es un aminoácido análogo de la cisteína (dimetilcisteína), interacciona con proteínas y péptidos dando lugar a la inhibición de la síntesis de proteínas. El isómero L de dicho compuesto tiene las propiedades de incorporarse a las proteínas y la formación de puentes disulfuro, por lo cual es muy tóxica. Por ello se han seleccionado los derivados de D-penicilaminas que por otra parte han comenzado a ser ensayados como antivíricos, principalmente contra el virus del SIDA. (Chandra y Sarin. 1986).

b) Análogos de amantadina

Es conocida la acción de este compuesto frente al vPPA, cuya actividad va encaminada a una alteración del pH de los lisosomas implicados en el

desnudamiento de la partícula vírica (Alcamí y cols. 1989a). Por ello hemos seleccionado un grupo de análogos para su ensayo sobre este virus.

c) Polisacáridos

La adsorción del virus a la célula es un mecanismo por el cual el virus se adhiere a la superficie celular. Esta unión es una interacción entre un receptor específico celular y un ligando vírico y generalmente produce en la partícula vírica efectos irreversibles. Se conoce que ciertos polisacáridos inhiben esta unión virus-célula como se ha demostrado con otros virus tales como herpes simple tipos 1 y 2, etc. Por ello existe la posibilidad de que actúen sobre el vPPA.

d) Análogos de nucleósidos

Existen una serie de antivíricos de amplio espectro con actividad frente a diversos virus DNA y RNA, los cuales actúan interfiriendo en la biosíntesis del DNA y RNA por analogía con los nucleósidos naturales.

Recientemente se han evaluado una serie de análogos de nucleósidos de los cuales el (S)-HPMPA y el PMEPA se destacan como fuertes inhibidores de la multiplicación de virus (De Clercq y cols. 1986; Gil-Fernández y De Clercq. 1987b) y en particular de la replicación del DNA vírico (Arzuza y cols. 1988) y por ello hemos seleccionado un grupo de análogos del mismo para su ensayo.

Por otra parte, también dentro de los análogos de nucleósidos, existen compuestos cuya actividad tiene lugar durante la transcripción temprana en la cual se metilan los RNAs mensajeros del virus, en cuyo proceso está implicada la enzima (S)-adenosil homocisteína hidrolasa. Estos compuestos alteran el equilibrio enzimático e inhiben las reacciones de metilación y maduración de los RNAs mensajeros víricos. (Salas y cols. 1981). Siguiendo esta línea, hemos seleccionado una serie de compuestos derivados de adenosina.

e) Compuestos aniónicos

En estudios previos realizados con la suramina se ha observado que este compuesto aniónico es activo frente al vPPA. (Sola y cols. 1986b). El mecanismo de acción de este compuesto aniónico frente al HIV es en parte mediante la inhibición de la adsorción vírica (De Clercq, 1989a). Basados en este resultado hemos ampliado a otras sustancias aniónicas el estudio de su posible capacidad antivírica contra el vPPA.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. *Cepas de virus.*

El virus de la peste porcina (cepa Badajoz) adaptado a su cultivo en células Vero fue obtenido del Centro de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid (Cantoblanco), por amabilidad del Prof. E. Viñuela. El *stock* de virus empleado corresponde inicialmente al pase 14.

2.1.2. *Líneas celulares*

Células Vero, procedentes de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), con morfología fibroblástica. Fueron cedidas por el Dr. L. Enjuanes del Centro de Biología Molecular.

2.1.3. *Medios de cultivo celular.*

2.1.3.1. *Multiplicación.* Las líneas celulares utilizadas se cultivan para su multiplicación en medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco con 2 g/l de bicarbonato sódico, suplementado con 10% de suero de ternera (recién nacida) y un 1% (v/v) de una solución stock que contiene 10.000 unidades de penicilina por ml. y 10 mg/ml de sulfato de estreptomicina.

2.1.3.2. *Mantenimiento.* El medio de mantenimiento para el uso experimental de los cultivos de células contiene únicamente un 2% del suero citado y el mencionado medio de Dulbecco con la mezcla de antibióticos.

2.1.3.3. Congelación. El medio de congelación consiste en 10% DMSO (dimetilsulfóxido), 20% de suero fetal bovino, 70% medio de Dulbecco. Se utiliza para conservación de células a -70°C .

2.1.4. *Productos y reactivos.*

En este apartado presentamos un conjunto de elementos que han sido utilizados en las diversas técnicas empleadas en este trabajo reseñándose marca de fabricación y procedencia.

Cultivos celulares:

Medio de Dulbecco (Flow, Scotland. UK).

Suero fetal, suero de ternera recién nacida (Gibco, Scotland. UK)

Tripsina, agar noble (Difco, Detroit, Mi. USA)

Penicilina (Antibioticos S.A. Madrid. España)

Estreptomina (Cepa, S.A. Madrid. España)

Violeta cristal (Merck, Munich. Alemania)

DEAE-dextrano (Pharmacia. Upsala. Suecia)

Solución de Hank's y solución PBS (preparados en nuestro laboratorio).

Solución de Hank's: Contiene una solución A: ClNa (8 g/l); ClK (0,4 g/l); Cl_2Ca (0,14 g/l); SO_4Mg (0,2 g/l); agua destilada (450 ml). Solución B: PO_4HNa_2 (0,06 g/l); glucosa (1 g/l); agua destilada (450 ml). Solución C; Rojo fenol al 1% (4 ml). Se añade la solución B sobre la solución A. Se añade la solución C sobre la mezcla anterior. Se completa la cantidad hasta 1 litro.

Solución PBS: ClNa (8 g/l); ClK (0,2 g/l); PO_4HNa_2 (1,15 g/l); agua destilada (1 litro).

SDS-PAGE:

Acrilamida, glicerol, β -mercaptoetanol, azul de bromofenol (Merck, Munich. Alemania).

Bis-acrilamida , persulfato amónico (Bio-Rad. Richmond. Ca. USA).

Tris base, SDS, glicina, ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) (Sigma. St. Louis. Mi. USA).

TEMED (Serva. Heidelberg. Alemania).

Metanol, ácido acético glacial (Merck. Munich. Alemania).

Marcado de virus:

Glucosa (Merck. Munich. Alemania)

Tritón X-100 (Bio-Rad. Richmond. Ca. USA).

Marcado de proteínas:

(³⁵S)-metionina New England Nuclear. Boston. USA)

Medio sin metionina (Flow. Scotland. USA)

Acido tricloroacético (Merck. Munich. Alemania)

DMSO (Serva. Heidelberg. Alemania).

Líquido de centelleo (Beckman. USA)

Film de autorradiografía (X-Omat S) 18X24 cm (Kodak. Francia).

2.1.5. Compuestos ensayados como posibles antivíricos.

1. D-penicilaminas sintéticas (46 compuestos). Proceden del Instituto de Química Médica (CSIC). Dr. Federico Gómez de las Heras.

2. Análogos de amantadina (9 compuestos). Proceden del Departamento de Química Orgánica de la Universidad Complutense de Madrid. Prof. García Martínez.

3. Polisacáridos sulfatados (6 compuestos). Carragenina kappa, carragenina lambda, dextran sulfato, heparina, pentosan polisulfato y fucoidina. Proceden de SIGMA. St. Louis. Mi. USA.

4. Análogos de nucleósidos. Dentro de este grupo podemos diferenciar dos subgrupos:

4a. Fosfonilmetoxialquilpurinas y pirimidinas. Son 12 compuestos divididos en 7 derivados púricos y 5 pirimidínicos. Todos ellos nos han sido enviados por el Dr. E. De Clercq del Rega Institute de la Universidad de Lovaina. Bélgica.

4b. Derivados de adenosina (15 compuestos) que tienen procedencias diferentes. Adenosina 2'3'-dialdehido y adenosina N'-oxido proceden de SIGMA. St. Louis. Mi. USA; Neplanocin A procede de Toyo Jozo Ltd. Japón y el resto del Dr. E. De Clercq del Rega Institute. Universidad de Lovaina. Bélgica.

5. Compuestos aniónicos (5 compuestos). Todos ellos proceden de SIGMA. St. Louis. Mi. USA.

2.2. METODOS

2.2.1. *Cultivos de células*

En cultivos celulares en monocapa confluyente se descarta el medio de cultivo lavándose las células con PBS, tripsinizándose a continuación para individualizar las células de la monocapa desprendiéndose del frasco de cultivo. Se centrifugan a 200 xg durante 5 minutos para separar la tripsina de la suspensión de células obtenida. Inmediatamente se resuspende el sedimento de células en medio fresco de multiplicación en la proporción

adecuada, para lo que se distribuye en los recipientes adecuados para los experimentos a realizar o para seguir sucesivos pases, y se coloca en estufa a 37°C de temperatura, una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad, controlándose la evolución del cultivo diariamente y mediante microscopía óptica.

Se conservan las cepas celulares congeladas en nitrógeno líquido en medio especial de congelación. Se almacenan en criotubos (Nunc), llevándose a cabo la congelación de la siguiente manera: se mantienen 45 minutos a 4°C, seguido de 45 minutos a -20°C y varias horas a -70°C, al cabode las cuales se introducen en nitrógeno líquido.

2.2.2. *Multiplicación del virus*

La multiplicación del vPPA se lleva a cabo en cultivos en monocapa de células Vero en frascos de 75 cm² o de 25 cm² (Costar).

Se descarta el medio de multiplicación del cultivo y se inocula la suspensión de virus a una multiplicidad de infección (mdi) de 0.1 ufp/célula y en un volumen escaso de Hank's para que la monocapa quede cubierta por una fina lámina y los viriones entren fácilmente en contacto con las células subyacentes. Tras un periodo de adsorción de una hora se retira la fase líquida, se lava la monocapa celular con PBS añadiéndose el medio de mantenimiento. Diariamente y mediante microscopía óptica se observa la aparición y evolución de efectos citopáticos específicos. Cuando estos llegan a un 90% , se recoge el medio con los restos celulares, y con la ayuda de un *policía* (varilla de vidrio con un fragmento de silicona en el extremo) se desprenden las células, se someten a un rompedor por ultrasonidos durante 15 minutos, se centrifugan a 500 xg. durante 5 minutos en centrífuga

refrigerada descartando el sedimento y se distribuye en pequeñas alícuotas conservándose a -70°C. Posteriormente se realiza la titulación del virus.

2.2.3. Método de titulación del virus.

En una placa de 24 pocillos (Costar) con una monocapa de células confluentes se inoculan diluciones decimales consecutivas del *stock* de virus producido en un frasco de cultivo. Estas diluciones se realizan en solución de Hank's. Se añaden 0,2 ml de cada dilución en, al menos, dos pocillos.

Se mantienen en estufa a 37°C durante una hora y media para permitir la adsorción de las partículas víricas a las células. Al cabo de este tiempo se retiran los inóculos, se lava la monocapa celular con PBS y se añade medio Dulbecco doblemente concentrado con agar noble al 0,9%, a partes iguales. La incubación se realiza en estufa a 37°C y 5% de CO₂.

A los 5-7 días post-infección se retira el medio y se tiñe la monocapa celular con una solución de violeta cristal al 1% en etanol.

Se cuenta el número de placas infectivas con un contador de placas provisto de lupa y se calcula el título:

$$\text{Título} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de placas infectivas contadas en cada pocillo}}{\text{inóculo (0.2 ml) X dilución del virus}}$$

2.2.4. *Purificación del virus de la peste porcina africana.*

Placas de 150 mm de diámetro se inoculan a una moi de 0.1 ufp/célula. Cuando los cultivos celulares presentan efecto citopático (ECP) en un 80%, se recoge el cultivo con *policía*. Se centrifuga a 500 xg. durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y el sedimento se resuspende en un volumen pequeño de PBS y se rompen mediante tres sucesivos choques de ultrasonidos de 15 segundos y consiguiente centrifugación a 500 xg. durante 5 minutos en una centrífuga refrigerada. Se recoge el sobrenadante y se resuspende en una solución de sacarosa al 35% con 1 M de ClNa, 10 mM de Tris ClH pH 8 y 1 mM EDTA pH 8 (*colchón* de sacarosa) y se centrifuga a 48.000 xg. en ultracentrífuga Beckman. Los sedimentos obtenidos se resuspenden en PBS y se almacenan a -70°C.

2.2.5. *Marcado radiactivo del vPPA*

Placas de 150 mm se inoculan con virus a una mdi de 0.1 ufp/célula. Se incuban a 37°C durante 2 horas. Se descarta el exceso de inóculo, se lava la monocapa con PBS y se añade medio de mantenimiento sin metionina y se suplementa con 15 μ Ci/ml de (³⁵S)-metionina. Se incuba a 37°C durante 48 horas. A partir de este momento la células se rompen por ultrasonidos, se centrifugan para quitar los restos celulares y el virus contenido en el sobrenadante se purifica a través de un *colchón* de sacarosa como se describe en el apartado 2.2.4. Con una alícuota se calcula el título de virus y otra alícuota se completa hasta dos mililitros con líquido de centelleo y se cuenta en un contador de centelleo líquido LKB Wallac 1219 Rackbeta, para comprobar la relación cpm/ufp.

2.2.6. Síntesis de proteínas.

2.2.6.1. Marcado radiactivo de las proteínas.

En placa de 96 pocillos (Costar), se inoculan las filas impares con virus a una mdi de 1 ufp/célula. Se mantiene una hora y media el cultivo celular en adsorción en estufa a 37°C. Pasado este periodo se añaden en la totalidad de la placa diluciones diferentes de los compuestos a estudiar. Cuando los ECP alcanzan un 80% retiramos el medio de cultivo, lavamos con PBS y marcamos con 1 μ Ci por pocillo de (³⁵S)-metionina, diluido en medio Dulbecco sin metionina. Mantenemos en incubación el cultivo 2 horas a 37°C. Retiramos el medio radiactivo, precipitamos con ácido tricloroacético al 5%, se lava 2 veces con PBS y una vez con etanol. Se seca la placa a 37°C y más tarde se recoge la monocapa con 200 μ l de una solución de NaOH 0,1N y 1% SDS. Se recogen los líquidos que se completan con líquido de centelleo y se cuentan en un contador de centelleo líquido.

2.2.6.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

Monocapas de células Vero multiplicándose en placas de 24 pocillos se inoculan con el vPPA a una mdi de 10 ufp/célula. Según los casos a diferentes horas postinfección, se marca el cultivo con 10 μ Ci/ml de (³⁵S)-metionina en medio sin metionina. Se mantiene el marcaje durante 2 horas. Se retira el medio radiactivo, se lava con PBS y se recoge el cultivo con un tampón de lisis cuya composición es la siguiente: 62,5 mM Tris ClH pH 6,8, 3% SDS, 15% glicerol, 1% β -mercaptoetanol y 0,015% de azul de bromofenol (Hirt et cols. 1986).

A continuación se realiza la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de un 17% de acrilamida. Se fija el gel con 10% ácido acético glacial y 30% de

metanol. Se seca en un secador de geles (Biorad) durante 2 horas. Se realiza a continuación una autorradiografía, colocando el gel desecado junto con un film X- OMAT de Kodak en un *cassette*. Se espera 4-7 días para que la radiactividad incorporada en el gel impresione el film. Al cabo de dichos días se revela el film.

2.2.7. Adsorción del virus purificado y marcado con (³⁵S)-metionina a las células.

Cultivos de células en monocapa confluyente en placas de 96 pocillos (Costar) se pretratan durante 15 minutos con PBS que contiene 1% de suero fetal bovino, 0,1% de glucosa y albúmina de suero bovino (5 mg/ml) con el fin de bloquear la adsorción inespecífica. Entonces las células se inoculan con viriones purificados y marcados con (³⁵S)-metionina ($2,7 \times 10^5$ ufp/ml o 3×10^5 cpm/ml) en 50 μ l de PBS suplementado con seroalbúmina (1 mg/ml) con o sin el compuesto antivírico a ensayar. Después de 1 hora de adsorción a 37°C se descarta el exceso de virus lavándose el cultivo exhaustivamente con PBS. Las células con el virus adsorbido son lisadas en PBS con 1% de SDS y 1% de Tritón X-100. Los lisados se contaron en un contador de centelleo líquido.

2.2.8. Determinación de las concentraciones citotóxicas de los compuestos ensayados.

2.2.8.1. Evaluación por el método colorimétrico.

Se siembran células Vero en una placa de 96 pocillos (Costar), al cabo de 48 horas de cultivo se añaden concentraciones variables de sustancias dejando pocillos de control.

Se observan diariamente al microscopio óptico los posibles efectos tóxicos producidos por las sustancias sobre las células. A los 3-5 días se tiñen los cultivos. El método de tinción es semejante al descrito por Finter (1969) para medir efectos citopáticos en células infectadas por virus y tratadas con interferón con la única diferencia en que éste usa rojo neutro como colorante.

En nuestro caso teñimos con una solución de violeta cristal al 1% en etanol. Después de un periodo de 2 a 3 minutos en contacto con el colorante, se elimina el exceso de colorante y se lava sucesivas veces con agua. Se deja secar. Dependiendo de la intensidad de color, se establece que el 100% de citotoxicidad es el cultivo destruido y el 0% el cultivo control. El CC_{50} será la concentración de sustancia añadida al cultivo que presente una coloración 50% respecto al control.

2.2.8.2. Evaluación por la inhibición de la síntesis de proteínas mediante la incorporación de (^{35}S)-metionina.

Se realiza la evaluación según 2.2.6.1.

El cálculo de la CC_{50} se realiza comparando las cpm (cuentas por minuto) de radiactividad generadas por cada cultivo celular infectado (media de 2 pocillos) con las cpm de radiactividad del control celular sin inocular.

2.2.8.3. Evaluación por observación directa al microscopio óptico.

Los cultivos de células suplementados con diferentes concentraciones de las sustancias en experimentación, se observan diariamente al microscopio óptico invertido determinándose las alteraciones morfológicas y grados de destrucción celular o efectos citotóxicos inducidos por las sustancias en ensayo. Los valores CC_{50} se calculan basándose en que el cultivo control presenta un 0% de efectos citotóxicos y el cultivo totalmente alterado un 100% y por tanto se observa el 50% de efectos citotóxicos.

2.2.9. *Método de selección de los compuestos con capacidad inhibidora frente al vPPA.*

Se siembran cultivos de células Vero en placas de 96 pocillos. Se inoculan las filas impares de la placa con vPPA a una mdi de 0,5 ufp/ml. Después de 90 minutos se retiran los inóculos y se añaden cantidades de compuestos a unas concentraciones prefijadas, dejando varios controles de células sin infectar ni tratar, y varios infectados no tratados. Cuando los controles infectados hayan alcanzado el 100% de ECP, se tiñen los cultivos con violeta cristal al 1% en etanol. Podemos obtener de esta experiencia una primera aproximación del posible efecto antivírico de los compuestos ensayados.

2.2.10. *Determinación de las concentraciones inhibidoras de la multiplicación del virus de los compuestos ensayados.*

Se infectan con vPPA a una mdi de 0,5 ufp/ml, cultivos de células Vero en monocapa confluyente en placas de 24 pocillos (250.000 cel/pocillo) en medio de multiplicación que contiene 2 g/l de bicarbonato sódico e incubados a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad. Después de un periodo de adsorción de 90 minutos, el virus no adsorbido se elimina lavándose los cultivos con solución salina tamponada (PBS). A continuación se añade medio de mantenimiento conteniendo diferentes concentraciones de los compuestos ensayados y se incuban los cultivos a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Cada cultivo se observa diariamente, y cuando los controles (cultivos inoculados con virus pero no sometidos a la acción de los compuestos) presentan destrucción celular total (usualmente 3 días después de la infección) se extraen las células de cada pocillo con un *policía* de silicona y se rompen por ultrasonidos. Los restos celulares se separan por

centrifugación y el contenido total de virus extra- e intracelular se determina mediante ensayo por el método de formación de placas en cultivos de células Vero en placas de 24 pocillos. Las placas infectivas se cuentan cuando los controles de cultivos infectados pero sin tratar, presentan placas infectivas bien definidas, a los 5-7 días post-infección, expresándose los resultados en ufp/ml y calculándose la concentración inhibidora o efectiva antivírica 50% (CE₅₀).

2.2.11. *Indice selectivo.*

Para la valoración de un agente antivírico es esencial el cálculo del índice selectivo que viene dado por la relación:

$$IS = \frac{CC_{50}}{CE_{50}}$$

donde CC₅₀ es la concentración de agente antivírico máxima que causa un 50% de efectos citotóxicos en el cultivo y el CE₅₀ es la concentración mínima efectiva de agente que inhibe en un 50% la formación de placas por el virus o bien que inhibe los ECP en un 50%.

3. RESULTADOS

Todos los compuestos ensayados en su posible capacidad antivírica se agrupan por su afinidad de composición química en cinco grupos y uno de éstos se divide en dos subgrupos con el fin de poder comparar su potencialidad y entender mejor las características de su acción. Estos grupos son: D-penicilaminas sintéticas, derivados de amantadina, polisacáridos, compuestos aniónicos, y análogos de nucleósidos que a su vez los hemos subdividido en fosfonilmetoxialquilpurinas y fosfonilmetoxialquilpirimidinas por una parte y derivados de adenosina por otra.

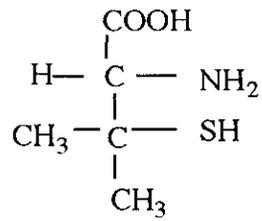
3.1. D-PENICILAMINAS SINTETICAS

El estudio de este grupo de derivados de la D-penicilamina nos pareció interesante debido a que ésta bloquea la multiplicación del virus HTLV III/LAV asociado al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Chandra y Sarin, 1986), lo que unido a su baja toxicidad, ha abierto un campo de estudio para diversos virus.

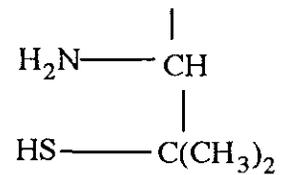
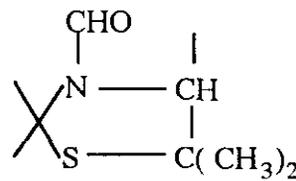
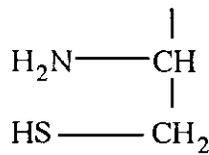
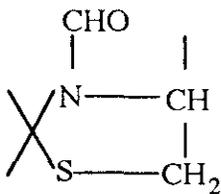
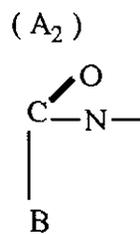
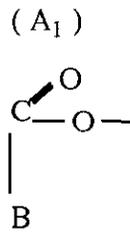
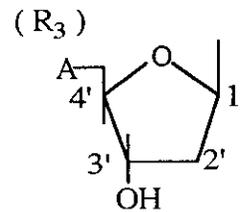
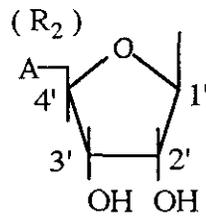
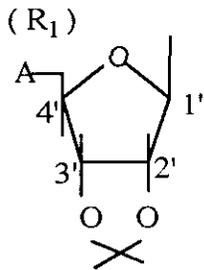
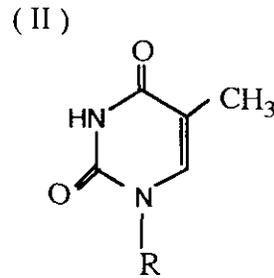
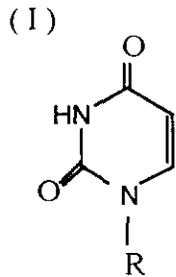
Este grupo reúne 44 derivados de D-penicilamina de nueva síntesis incluyendo ésta como control. Son presentados en la tabla II, así como su fórmula química en la figura 2.

Primeramente se ha realizado un *screening* de todos los compuestos como se describe en Materiales y Métodos (2.2.9), en el cual las concentraciones ensayadas están comprendidas dentro de un amplio margen para poder determinar la máxima concentración no tóxica para las células y la concentración mínima necesaria para producir inhibición del efecto citopático.

Una vez conocida su acción antivírica se procede a cuantificar la inhibición producida (2.2.10).



D-pencilamina



(B₁)

(B₂)

(B₃)

(B₄)

Figura 2. D-pencilamina y derivados, composición química.

TABLA II. Composición química de los derivados de D-penicilamina

| Compuesto | Heterociclo | R | A | B |
|-----------|-------------|-----------------|----------|--------------------|
| RH 365 | I | R1 | A2 | B1 (enantiómero R) |
| RH 369 | I | R2 | A2 | B1 " |
| RH 405 | I | R2 | A2 | B2 " |
| RH 410 | I | R1 | A2 | B1 (enantiómero S) |
| RH 413 | I | R2 | A2 | B1 " |
| RH 414 | I | R2 | A2 | B2 " |
| RH 348 | I | R1 | A2 | B3 " |
| RH 370 | I | R2 | A2 | B3 " |
| RH 403 | I | R2 | A2 | B4 " |
| RH 411 | I | R1 | A2 | B3 (enantiómero R) |
| RH 412 | I | R1 | A2 | B3 " |
| RH 415 | I | R2 | A2 | B4 " |
| RH 417 | I | R1 | A1 | B1 " |
| RH 419 | I | R2 | A1 | B1 " |
| RH 425 | I | R2 | A1 | B2 " |
| RH 422 | I | R1 | A1 | B1 (enantiómero S) |
| RH 424 | I | R2 | A1 | B1 " |
| RH 426 | I | R2 | A1 | B2 " |
| RH 418 | I | R1 | A1 | B3 " |
| RH 420 | I | R2 | A1 | B3 " |
| RH 427 | I | R2 | A1 | B4 " |
| RH 423 | I | R2 | A1 | B3 (enantiómero R) |
| RH 428 | I | R2 | A1 | B4 " |
| RH 443-3 | II | R3 | A1 | B3 (enantiómero S) |
| RH 443-1 | II | R3 (4'-B3-(S)) | A1 | B3 " |
| RH 444 | II | R3 (4'-B3-(S)) | Tartrato | |
| RH 434-3 | II | R3 (4'-acetato) | A1 | B3 (enantiómero S) |
| RH 445 | II | R3 (4'-B3-(S)) | OH | |
| RH 433 | II | R3 | A2 | B3 (enantiómero S) |
| RH 447 | II | R3 | A1 | B4 " |
| RH 449 | II | R3 (4'-B3-(S)) | OH | |
| RH 451 | II | R3 (4'-B3-(S)) | A1 | B4 (enantiómero S) |
| RH 441 | II | R3 | A2 | " |
| RH 430-3 | II | R3 | A1 | B1 (enantiómero R) |
| RH 430-1 | II | R3 (4'-B1-(R)) | A1 | B1 " |
| RH 436 | II | R3 (4'-B1-(R)) | Tartrato | |
| RH 432 | II | R3 (4'-acetato) | A1 | B1 " |
| RH 437 | II | R3 (4'-B1-(R)) | OH | |
| RH 435-2 | II | R3 | A2 | B1 " |
| RH 438 | II | R3 | A1 | B2 " |
| RH 439 | II | R3 (4'-B2-(R)) | OH | |
| RH 450 | II | R3 (4'-B2-(R)) | A1 | B2 " |
| RH 442 | II | R3 | A2 | B2 " |

TABLA III. Citotoxicidad (CC₅₀), concentración efectiva antivírica (CE₅₀) e índice selectivo (IS) de los derivados de D-penicilamina ensayados frente al vPPA en células Vero.

| Compuesto | CC ₅₀ ^a (μ g/ml) | CE ₅₀ ^b (μ g/ml) | Índice ^c selectivo |
|----------------|--|--|----------------------------------|
| D-penicilamina | 450 | 10 | 45 |
| RH-365 | >400 | .d | - |
| RH-369 | 400 | - | - |
| RH-405 | 400 | 400 | 1 |
| RH-410 | 400 | - | - |
| RH-413 | 400 | 400 | 1 |
| RH-414 | 400 | - | - |
| RH-348 | 400 | - | - |
| RH-370 | 400 | <10 | >40 |
| RH-403 | 400 | - | - |
| RH-411 | 400 | - | - |
| RH-412 | 400 | 50 | 8 |
| RH-415 | 400 | - | - |
| RH-417 | 400 | - | - |
| RH-419 | 400 | - | - |
| RH-425 | 400 | - | - |
| RH-422 | 400 | - | - |
| RH-424 | 400 | - | - |
| RH-426 | 400 | - | - |
| RH-418 | 400 | - | - |
| RH-420 | 400 | - | - |
| RH-427 | 400 | - | - |
| RH-423 | 400 | - | - |
| RH-428 | 400 | - | - |
| RH-443-3 | 200 | 50 | 4 |
| RH-441 | 200 | - | - |
| RH-443-1 | 200 | 100 | 2 |
| RH-433 | 200 | 25 | 8 |
| RH-434-3 | 200 | - | - |
| RH-442 | 200 | - | - |
| RH-450 | 200 | - | - |
| RH-451 | 200 | - | - |
| RH-436 | 200 | 30 | 6 |
| RH-444 | 200 | 100 | 2 |
| RH-447 | 200 | - | - |
| RH-445 | 200 | - | - |
| RH-437 | 200 | - | - |
| RH-438 | 200 | - | - |

| | | | |
|----------|-----|-----|------|
| RH-439 | 200 | - | - |
| RH-430-3 | 200 | - | - |
| RH-435-2 | 75 | <50 | >1,5 |
| RH-432 | 200 | - | - |
| RH-449 | 200 | - | - |
| RH-430-1 | 200 | - | - |

a Concentración que produce un 50% de toxicidad en las células, obtenida por el método de tinción.

b Concentración efectiva antivírica requerida para alcanzar una reducción de un 50% sobre el título de virus.

c Relación entre CC_{50}/CE_{50} .

d Negativo

En la tabla III se exponen los resultados de citotoxicidad. Los cultivos de células Vero fueron inoculados con el vPPA a una mdi de 0,5 ufp/ml en presencia de 400, 200, 100, 50, 25 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de derivados de D-penicilamina incorporados en medio de mantenimiento después del periodo de adsorción. A los 3 días post-infección se realiza la lectura de resultados. Cada cifra representa el valor medio de 3 cultivos.

Como puede observarse estos compuestos no presentan alta toxicidad para las células Vero, siendo la concentración citotóxica (CC_{50}) que afecta al 50% del cultivo celular normalmente entre 200 y 400 $\mu\text{g/ml}$. La concentración efectiva (CE_{50}) que reduce la producción de virus en un 50%, varía de 400 $\mu\text{g/ml}$ para RH-405 y RH-413 a $<10 \mu\text{g/ml}$ para RH-370. El índice selectivo (IS) es negativo para 30 compuestos, y en los 16 restantes positivos presentan un valor bajo, siendo mayor para la D-penicilamina y el compuesto RH-370 que ronda los 40-45 de IS.

Por todo ello no se ha considerado conveniente continuar el estudio de este grupo de compuestos al ser considerados no eficaces o escasamente activos frente al vPPA, aunque si lo es al menos la D-penicilamina frente a otros virus. (Chandra y Sarin. 1986).

3.2. ANALOGOS DE AMANTADINA

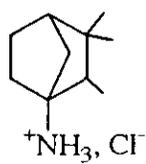
Existen una serie de sustancias lisosomotrópicas entre las que se encuentran la amantadina, que se han descrito como inhibidores de la multiplicación del vPPA (Geraldés y Valdeira, 1985; Alcamí y cols, 1989a). Por ello, hemos considerado interesante ensayar un grupo de análogos de amantadina.

A este grupo pertenecen 9 compuestos, cuyas fórmulas químicas vienen representadas en la figura 3.

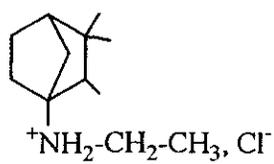
La tabla IV recoge el resumen de los resultados obtenidos en la fase de *screening*. Todos los compuestos manifiestan baja toxicidad (200-400 $\mu\text{g/ml}$) para las células Vero, pero los índices selectivos, aunque con valores medios superiores a los obtenidos con el grupo de la D-penicilamina son moderadamente significativos.

El índice selectivo más elevado corresponde al compuesto AT-3 y alcanza un valor superior a 30 con valores para los otros compuestos que oscilan entre 10 y 20 para la mayor parte salvo el TM-5 que presenta un valor poco significativo.

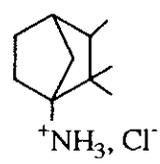
Las figuras 4 y 5 representan la relación entre la dosis del compuesto y la inhibición de la multiplicación del virus. Entre los compuestos de la serie TM (Figura 4), el TM-2 es el que produce mayor inhibición del título de virus, 2,5 logs. (unidades logarítmicas) a 100 $\mu\text{g/ml}$; con el TM-5 se consigue la misma inhibición a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$. El TM-1 y TM-6 que producen una inhibición aproximada del título de virus de 2 logs, le siguen en actividad. El TM-3 es el que presenta menor inhibición. Los compuestos de la serie AT (figura 5) son más activos que los de la serie TM a concentraciones menores y en general presentan menor citotoxicidad que se refleja en que sus índices selectivos son mayores aún cuando la inhibición de la multiplicación vírica sea menor.



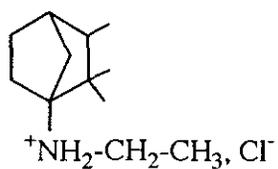
TM - 1



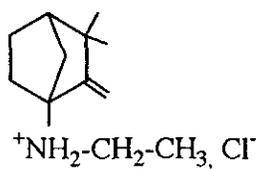
TM - 2



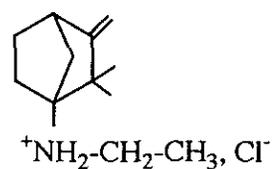
TM - 3



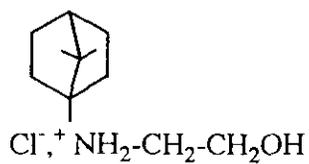
TM - 4



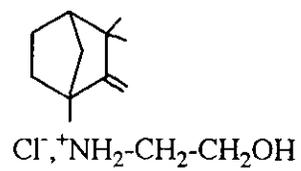
TM - 5



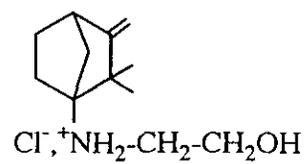
TM - 6



AT - 1



AT - 2



AT - 3

Figura. 3. Análogos de amantadina

TABLA IV. Citotoxicidad (CC₅₀), concentración efectiva antivírica (CE₅₀) e índice selectivo (IS) de los análogos de amantadina ensayados frente al vPPA en células Vero.

| Compuesto | CC ₅₀ ^a (μ g/ml) | CE ₅₀ ^b (μ g/ml) | Índice ^c selectivo |
|-----------|--|--|----------------------------------|
| TM-1 | 200 | 25 | 8 |
| TM-2 | 400 | 25 | 16 |
| TM-3 | 300 | 30 | 10 |
| TM-4 | 300 | 30 | 10 |
| TM-5 | 300 | 20 | 15 |
| TM-6 | 400 | 30 | 13 |
| AT-1 | 400 | <20 | >20 |
| AT-2 | 400 | <20 | >20 |
| AT-3 | 300 | <10 | >30 |

^a Concentración que produce un 50% de toxicidad en las células, determinada por el método de tinción.

^b Concentración efectiva antivírica requerida para alcanzar una reducción de un 50% sobre el título de virus.

^c Relación entre CC₅₀/CE₅₀.

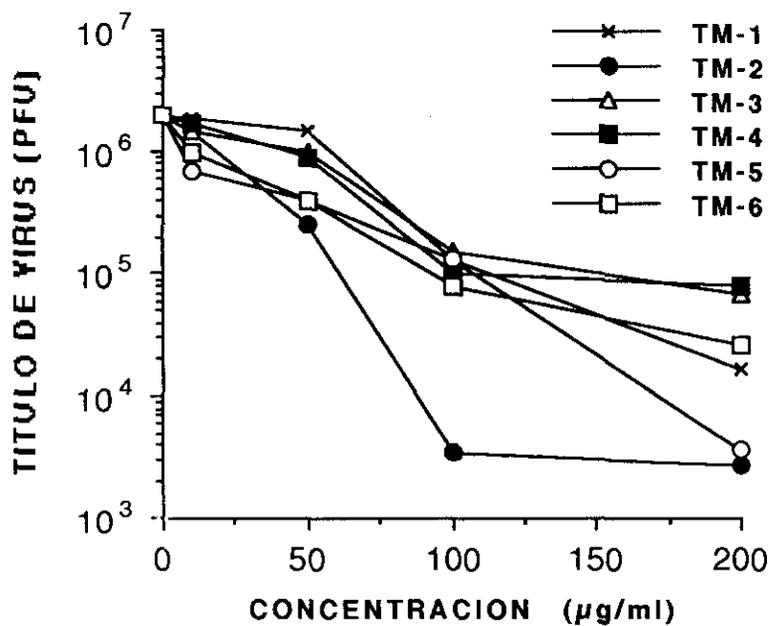


Figura 4. Efecto inhibitor de los derivados de amantadina indicados en la figura sobre la multiplicación del vPPA en células Vero. Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 0,5 en presencia de 10, 50, 100 y 200 µg/ml de TM-1, TM-2, TM-3, TM-5 y TM-6 incorporados en el medio de mantenimiento. A los 3 días post-infección se realiza la lectura de los resultados. Cada punto representa el valor medio de 3 cultivos.

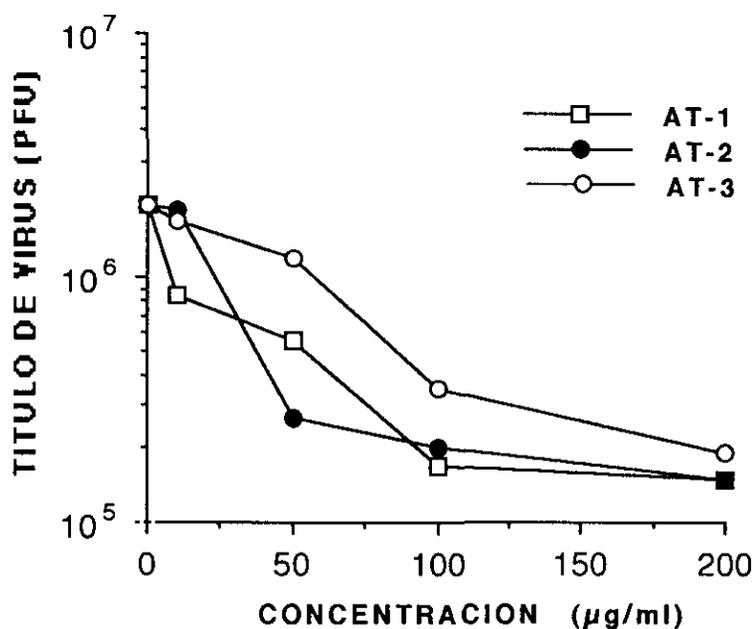


Figura 5. Efecto inhibitor de los derivados de amantadina indicados en la figura sobre la multiplicación del vPPA en células Vero. Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 0,5 en presencia de 10, 50, 100 y 200 µg/ml de AT-1, AT-2 y AT-3 incorporados en el medio de mantenimiento. A los 3 días post-infección se realiza la lectura de los resultados. Cada punto representa el valor medio de 3 cultivos.

3.3. POLISACARIDOS SULFATADOS

Se ha demostrado la actividad de diversos polisacáridos contra varios virus como son herpes simple, citomegalovirus, estomatitis vesicular, arenavirus y HIV (virus de la inmunodeficiencia humana) (González y cols. 1987; Andrei y De Clercq, 1990; Baba y cols. 1988a; De Clercq, 1989a; De Clercq, 1989b). La carragenina iota inhibe una fase temprana de la multiplicación del vPPA (González y cols. 1987), por esto hemos considerado importante estudiar un grupo de polisacáridos sulfatados

En este grupo hemos ensayado seis polisacáridos sulfatados: carragenina kappa, carragenina lambda, dextran sulfato (PM 8.000), heparina, pentosan polisulfato y fucoidina. Sus fórmulas se presentan en la figura 6.

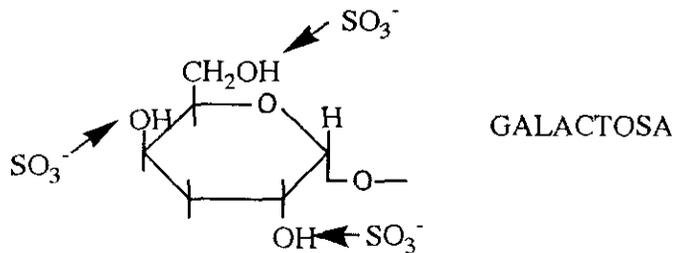
Se ha realizado la determinación de la citotoxicidad de los compuestos en células Vero mediante el control de tres parámetros: alteración de la morfología celular, tinción selectiva vital, e inhibición de la síntesis de proteínas de las células huésped mediante la incorporación de (³⁵S)-metionina tal y como se describe en Materiales y Métodos (2.2.8.2.).

Realizamos una aproximación, señalando como niveles de citotoxicidad, la inhibición de la síntesis de proteínas mediante la incorporación de (³⁵S)-metionina.

En la tabla V se presentan los resultados de todos los compuestos midiendo su citotoxicidad (CC₅₀), la concentración efectiva (CE₅₀) y el índice de selectividad (IS). Con respecto a la citotoxicidad se observa que es muy escasa en general para todos los polisacáridos. La concentración citotóxica 50% (CC₅₀) para la carragenina kappa corresponde a 2.000 µg/ml mientras

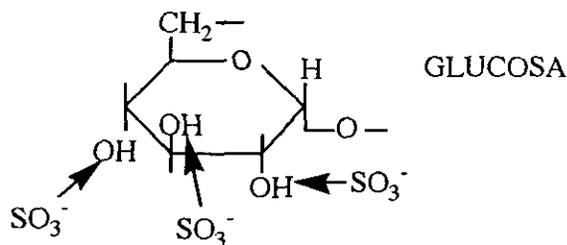
CARRAGENINA LAMBDA: Unidades de α -D-galactosa éster sulfatados

CARRAGENINA KAPPA: Copolímeros alternantes de β (1,3)-D-galactosa y (1,4)-3,6 anhidro-D ó L-galactosa

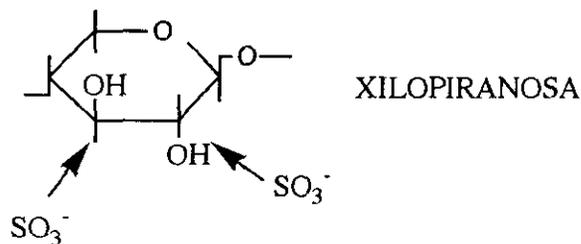


FUCOIDINA: L-fucosa + 1/2 éster sulfato

DETRAN SULFATO: Unidades α -D-glucosa unidas por enlaces 1 \rightarrow 6



PENTOSAN POLISULFATO: Unidades de xilopiranosasulfatadas



HEPARINA: Unidades de ácido L-idurónico (ácido D-glucurónico (1:4) D-glucosamina) + sulfamida de la D-glucosamina.

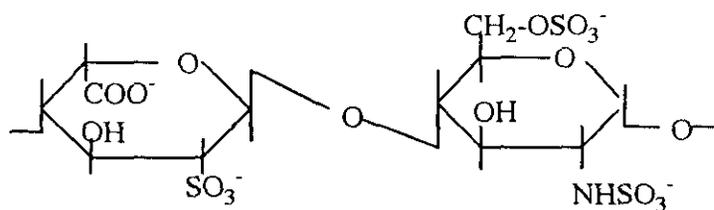


Figura. 6. Polisacáridos sulfatados, las flechas indican que la sulfatación de los grupos hidroxilo a lo largo de los polisacáridos no es total ni específica para una determinada posición.

TABLA V. Citotoxicidad (CC₅₀), concentración efectiva antivírica (CE₅₀) e índice selectivo (IS) de los polisacáridos ensayados frente al vPPA en células Vero.

| Compuesto | CC ₅₀ ^a (µg/ml) | CE ₅₀ ^b (µg/ml) | Índice ^c selectivo |
|----------------------|--|--|----------------------------------|
| λ-carragenina | 3000 | 25 | 120 |
| κ-carragenina | 2000 | 150 | 13,3 |
| Pentosan polisulfato | 3000 | 100 | 30 |
| Fuoidina | 3000 | 300 | 10 |
| Heparina | 3000 | 2000 | 1,5 |
| Dextran sulfato | 3000 | 2000 | 1,5 |

^a Concentración que produce un 50% de toxicidad en las células, obtenida por el método de tinción.

^b Concentración efectiva antivírica requerida para ejercer una reducción de un 50% sobre el título de virus.

^c Relación entre CC₅₀/CE₅₀.

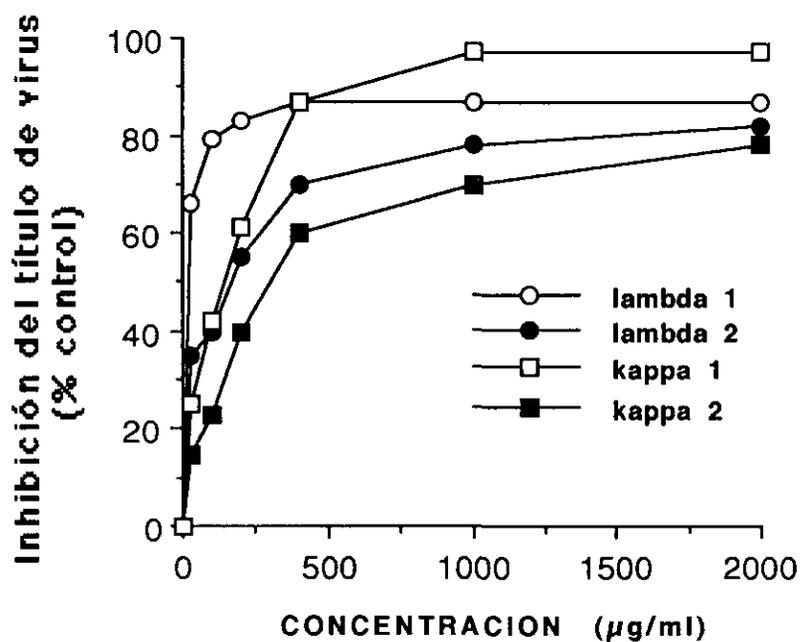


Figura 7. Efectos inhibidores de los polisacáridos carrageninas lambda y kappa sobre la multiplicación del vPPA en células Vero. Los compuestos se añadieron durante (1) y después (2) de la adsorción del virus a una mdi de 0,5. El rendimiento en virus se midió por recuento de placas infectivas cuando los cultivos de control infectados mostraron destrucción celular total.

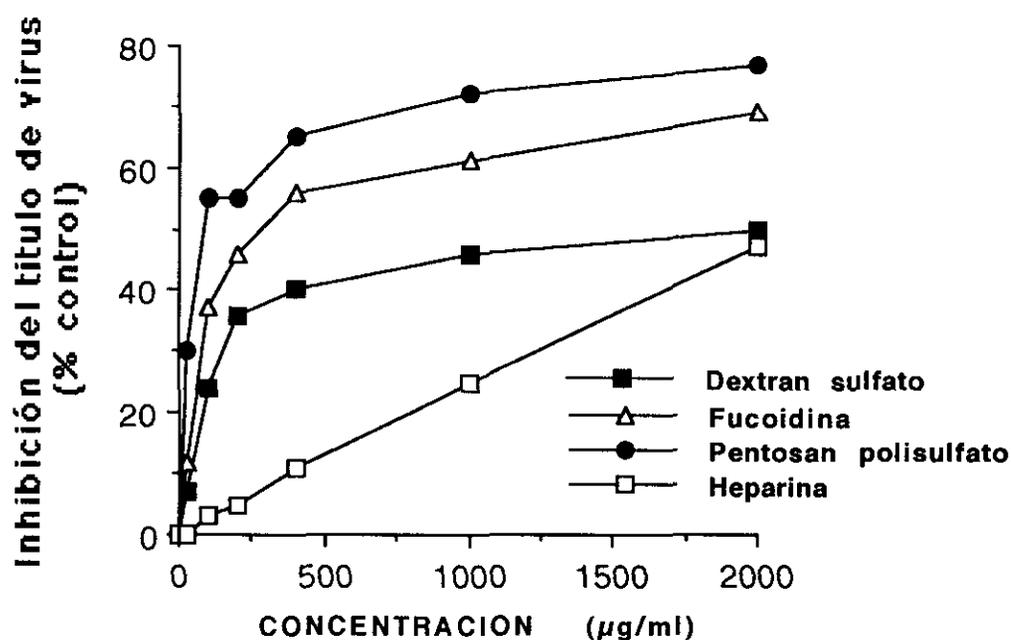


Figura 8. Efecto inhibitor de los polisacáridos dextran sulfato, fucoidina, pentosan polisulfato y heparina sobre la multiplicación del vPPA en células Vero. Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 0,5 en presencia de 25, 100, 200, 400, 1000 y 2000 µg/ml de dextran sulfato, fucoidina y pentosan polisulfato y 100, 200, 400, 1000 y 2000 µg/ml de heparina incorporados durante el periodo de adsorción en medio de mantenimiento. A los 3 días post-infección se realiza la lectura de los resultados. Cada punto representa el valor medio de 3 cultivos.

que para el resto de los polisacáridos es de 3.000 $\mu\text{g/ml}$ que coincide con la mayor concentración ensayada.

La concentración efectiva antivírica (CE_{50}) y el índice de selectividad (IS) como así mismo la CC_{50} han sido obtenidos cuando los compuestos inhibidores estaban presentes durante el periodo de adsorción del virus y después del mismo, cuando virus y droga fueron descartados de los cultivos lavando con PBS y se reemplazó por medio nuevo con el compuesto incorporado. Se observa que la carragenina lambda es el compuesto que necesita menos dosis para inhibir el 50% del título de virus, cantidad que va aumentando relativamente en los casos de carragenina kappa, pentosan polisulfato y fucoidina, necesitando concentraciones muy altas (2000 $\mu\text{g/ml}$) la heparina y el dextran sulfato.

El índice de selectividad resulta bastante significativo ($\text{IS} = 120$) en el caso de carragenina lambda, le sigue el pentosan polisulfato con 30, carragenina kappa con 13,3 y fucoidina con 10; la heparina y el dextran sulfato pueden considerarse negativos.

Las figuras 7 y 8 presentan reunidas las curvas de inhibición del título de virus relacionando la dosis de compuesto y la respuesta de inhibición correspondientes a los seis compuestos. En la figura 7 se muestran las curvas correspondientes a las dos carrageninas como compuestos más activos, registrando dos tipos de resultados. Los reseñados en la gráfica con (1) corresponde a la inhibición inducida cuando la droga está presente solamente durante el periodo de adsorción; y (2) cuando los compuestos se añadieron después de dicho periodo de adsorción. Del examen de los resultados se deduce que la mayor inhibición se produce en el primer caso, es decir, durante el periodo de adsorción.

En la figura 8 se encuentran las curvas dosis-respuesta de los restantes compuestos obtenidas cuando están presentes únicamente durante el periodo de adsorción. Cuando se añadieron los compuestos después del periodo de adsorción no se observó inhibición inducida por estos compuestos, excepto con las dos carrageninas.

Podemos destacar que a la concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ de compuesto, la mayor inhibición de la multiplicación de vPPA corresponde a la inducida por carragenina lambda con un 68% de inhibición y pentosan polisulfato con un 30% de inhibición. A 400 $\mu\text{g/ml}$ los inhibidores más potentes son carragenina lambda (90%) y carragenina kappa (88%).

Las figuras 9,10,11,12,13 y 14 corresponden a los experimentos de inhibición de la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas con las distintas concentraciones de los compuestos comparando con las células sin infectar y tratadas con los compuestos a las mismas concentraciones. Estos experimentos se han realizado utilizando la técnica de incorporación de (^{35}S)-metionina ya descrita. Además de las curvas de incorporación de (^{35}S)-metionina en las células infectadas y sin infectar por cada compuesto, viene representada en la misma figura la inhibición de ECPs con las distintas concentraciones del compuesto ensayado. En lo que se refiere a la citotoxicidad de los compuestos podemos decir que en general son poco tóxicas. El dextran sulfato y la heparina resultan ser los menos citotóxicos, mientras el pentosan polisulfato, carragenina kappa y fucoidina inhiben la incorporación de (^{35}S)-metionina en un 25%.

La incorporación de (^{35}S)-metionina en células infectadas y tratadas con dextran sulfato y fucoidina respectivamente muestra una dosis-dependencia prácticamente lineal. Con carragenina lambda y pentosan polisulfato, la

incorporación de (^{35}S)-metionina en células infectadas se eleva a concentraciones de 100 $\mu\text{g/ml}$ o mayores.

Como descripción detallada de los resultados expresados en dichas figuras podemos indicar que carragenina lambda a 1.000 $\mu\text{g/ml}$ induce el máximo de incorporación de metionina marcada en las células infectadas y que se mantiene hasta 3.000 $\mu\text{g/ml}$; es poco tóxica porque a la máxima concentración (3000 $\mu\text{g/ml}$) incorpora 80% de metionina marcada en las células sin infectar con respecto al control y al máximo de concentración no inhibe totalmente los ECPs. (Figura 9). La carragenina kappa a 1.000 $\mu\text{g/ml}$ de concentración produce la mayor incorporación de proteína marcada en células infectadas y tratadas y a 3.000 $\mu\text{g/ml}$ bloquea los ECPs. (Figura 10). El pentosan polisulfato da lugar a una incorporación de proteína marcada en células infectadas que es mayor que en los compuestos anteriores, a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo muestra una cierta citotoxicidad a esta concentración, los ECPs se reducen en un 50% aproximadamente (Figura 11). La fucoídina alcanza el máximo de incorporación de proteína marcada en las células infectadas a la dosis de 3.000 $\mu\text{g/ml}$ siendo de un 50%; a bajas concentraciones es poco tóxica manteniéndose a un nivel igual aunque se aumente la concentración del compuesto; los ECPs no se bloquean totalmente a la máxima concentración ensayada. (Figura 12). La heparina a 1.000 $\mu\text{g/ml}$ alcanza el máximo de incorporación de proteína marcada en las células infectadas (30%), se mantiene a 2.000 $\mu\text{g/ml}$ y después a más altas concentraciones desciende dicha incorporación; la toxicidad es nula prácticamente; los ECPs se mantienen sin alterar hasta las dosis más altas del compuesto (Figura 13). El dextran sulfato alcanza el máximo de incorporación de proteína marcada en las células infectadas a la

dosis de 3.000 $\mu\text{g/ml}$ llegando a un 65%; resulta poco tóxica; la inhibición de ECP alcanza un máximo a 3.000 $\mu\text{g/ml}$ no siendo total. (Figura 14).

En la tabla VI se presentan los valores 50% de inhibición de incorporación de (^{35}S)-metionina en las células infectadas y sin infectar y las dosis de compuesto que inhiben el 50% de ECPs. La toxicidad de los compuestos es prácticamente igual por esta técnica y el método colorimétrico y los compuestos más activos son las dos carrageninas y el pentosan polisulfato lo que corrobora los resultados anteriores.

Con el fin de estudiar el mecanismo del efecto inhibitor de los oligo- y polisacáridos sulfatados, se han llevado a cabo experimentos utilizando vPPA marcado radiactivamente con (^{35}S)-metionina, para determinar si los compuestos inhiben los primeros eventos de la infección por el vPPA y en particular la adsorción del virus a la célula. La figura 15 muestra la inhibición en la adsorción del vPPA con diferentes concentraciones de los seis compuestos, incubados con el virus y las células durante una hora, como se ha explicado en Materiales y Métodos. A 50 $\mu\text{g/ml}$ todos los compuestos, con la excepción de la fucoidina y dextran sulfato, inhiben la adsorción del virus en un 25%. El pentosan polisulfato alcanza una inhibición máxima de un 50% a una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$.

La carragenina lambda es más inhibitora que la carragenina kappa a 5 $\mu\text{g/ml}$, pero a 3.000 $\mu\text{g/ml}$ la inhibición es mayor con carragenina kappa con respecto a carragenina lambda.

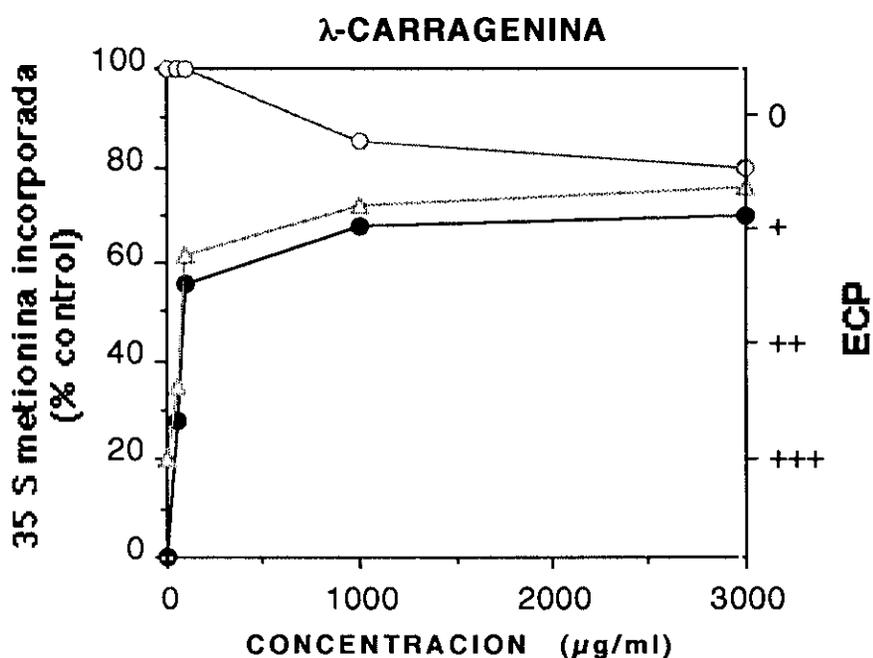


Figura 9. Efecto de λ-carragenina sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 50, 100, 1000 y 3000 µg/ml de λ-carragenina incorporado en medio de mantenimiento. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

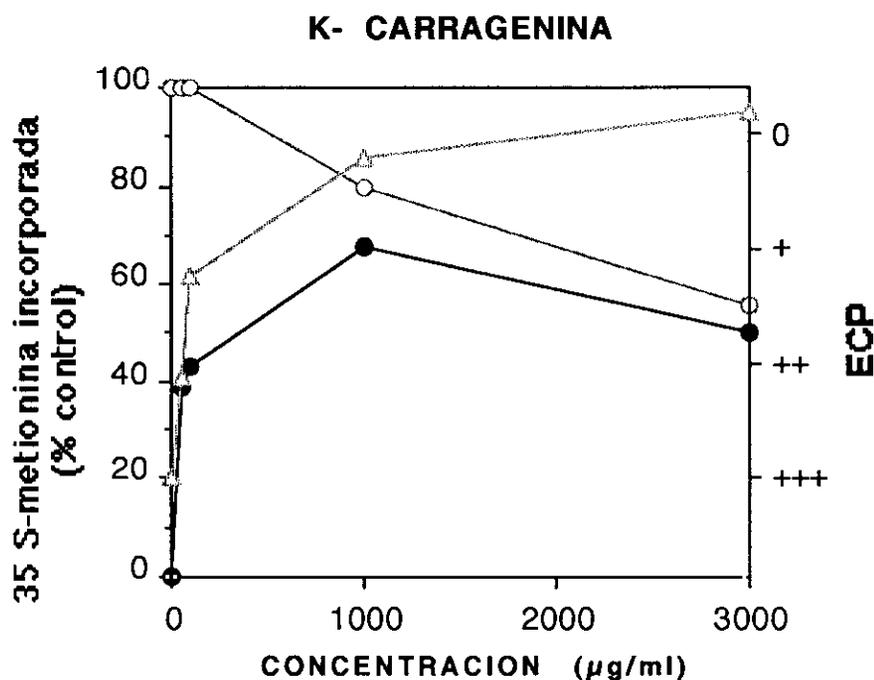


Figura 10. Efecto de κ -carragenina sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (\bullet) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 50, 100, 1000 y 3000 $\mu\text{g/ml}$ de κ -carragenina incorporado en medio de mantenimiento. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (^{35}S)-metionina. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

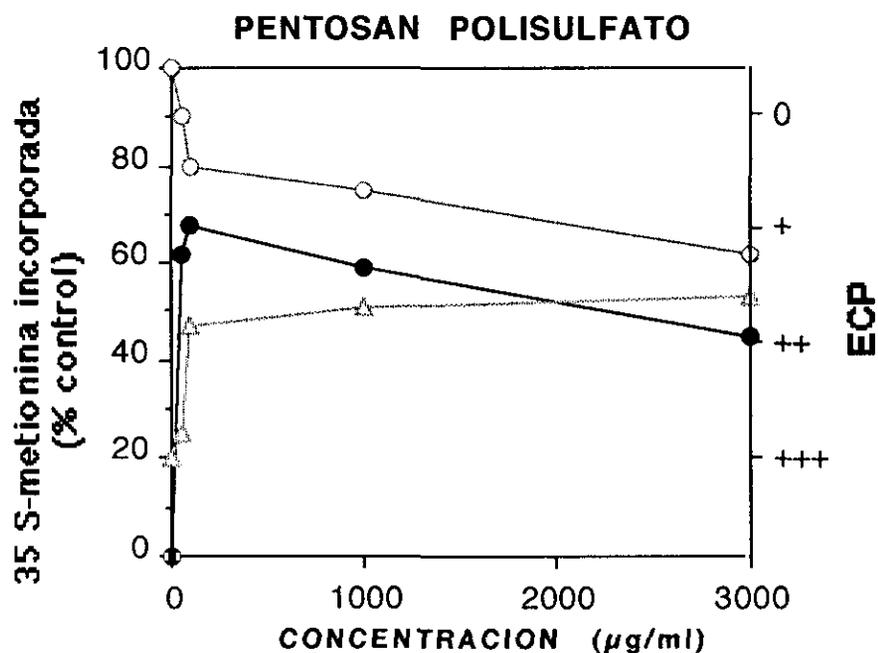


Figura 11. Efecto del pentosan polisulfato sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (\bullet) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 50, 100, 1000, 2000 y 3000 $\mu\text{g/ml}$ de pentosan polisulfato incorporado en medio de mantenimiento. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (^{35}S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

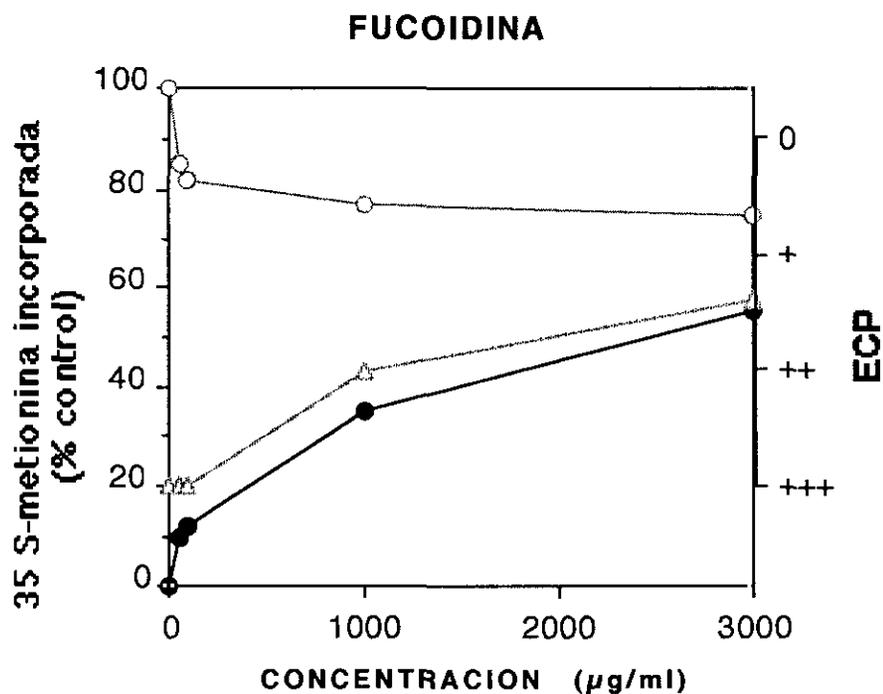


Figura 12. Efecto de la fucoidina sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (\bullet) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 50, 100, 1000 y 3000 $\mu\text{g/ml}$ de fucoidina incorporada en medio de mantenimiento. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (^{35}S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

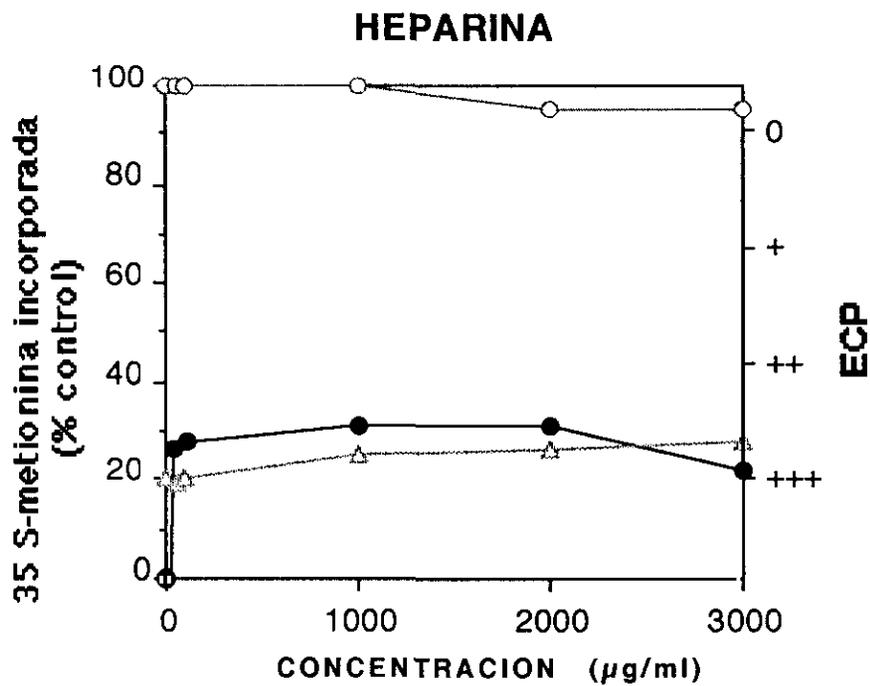


Figura 13. Efecto de la heparina sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (\bullet) y en controles de células no infectadas y tratadas (\circ). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 50, 100, 1000 y 3000 $\mu\text{g/ml}$ de heparina incorporado en medio de mantenimiento. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (^{35}S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

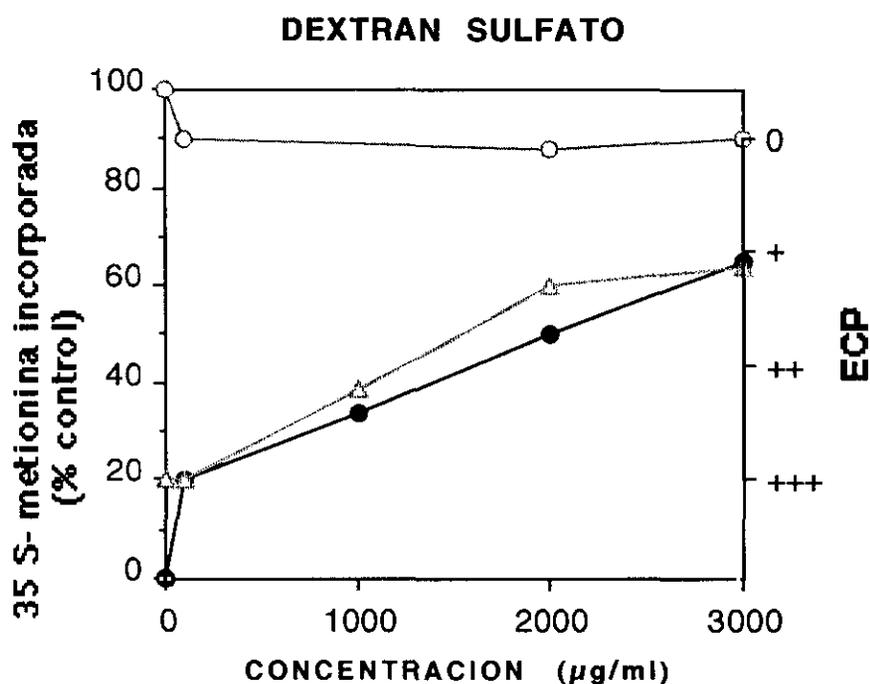


Figura 14. Efecto del dextran sulfato sobre la inhibición del ECP en células infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 50, 100, 1000, 2000 y 3000 µg/ml de dextran sulfato incorporado en medio de mantenimiento. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

TABLA VI. Efecto de diversos polisacáridos sobre la síntesis de proteínas en células Vero infectadas y sin infectar con el vPPA, en controles de células no infectadas, y sobre la inhibición de efectos citopáticos en células infectadas y tratadas.

| Compuesto | Inhibición 50% de incorporación de ^{35}S -metionina ^a | | Inhibición 50% de ECP ^b |
|------------------------|--|----------------------------|------------------------------------|
| | Cel. no infectadas y tratadas | Cel. infectadas y tratadas | Cel. infectadas y tratadas |
| λ -carragenina | >3000 | 100 | 75 |
| κ -carragenina | >3000 | 100 | 75 |
| pentosan polisulfato | >3000 | 50 | 100 |
| fucoïdina | >3000 | 1500 | 800 |
| heparina | >3000 | >3000 | >3000 |
| dextan sulfato | >3000 | 2000 | 1500 |

^a Dosis mínima de compuesto ($\mu\text{g}/\text{ml}$) que inhibe la incorporación en un 50% de metionina marcada

^b Dosis mínima de compuesto ($\mu\text{g}/\text{ml}$) que inhibe el 50% del ECP.

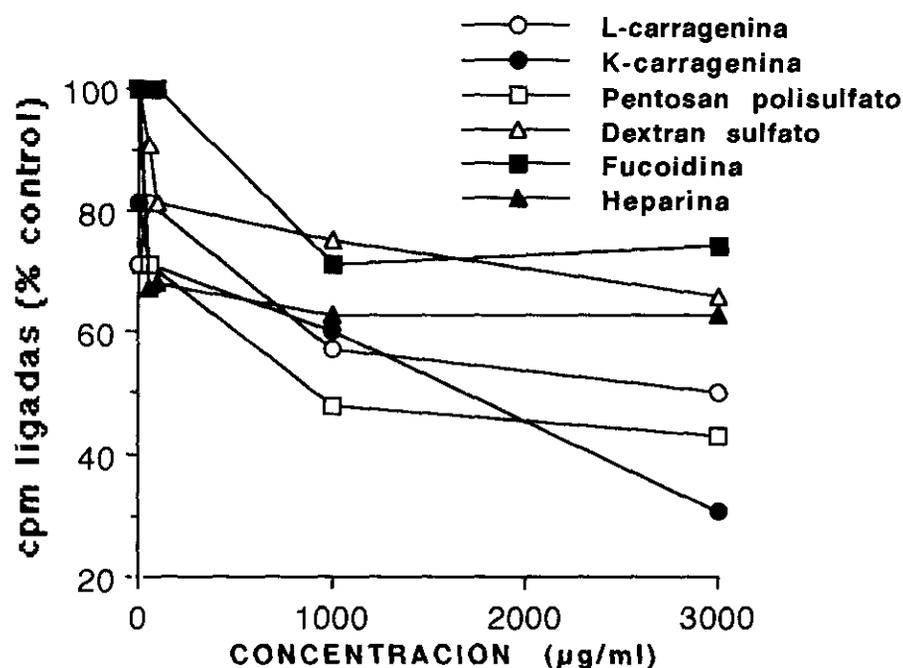


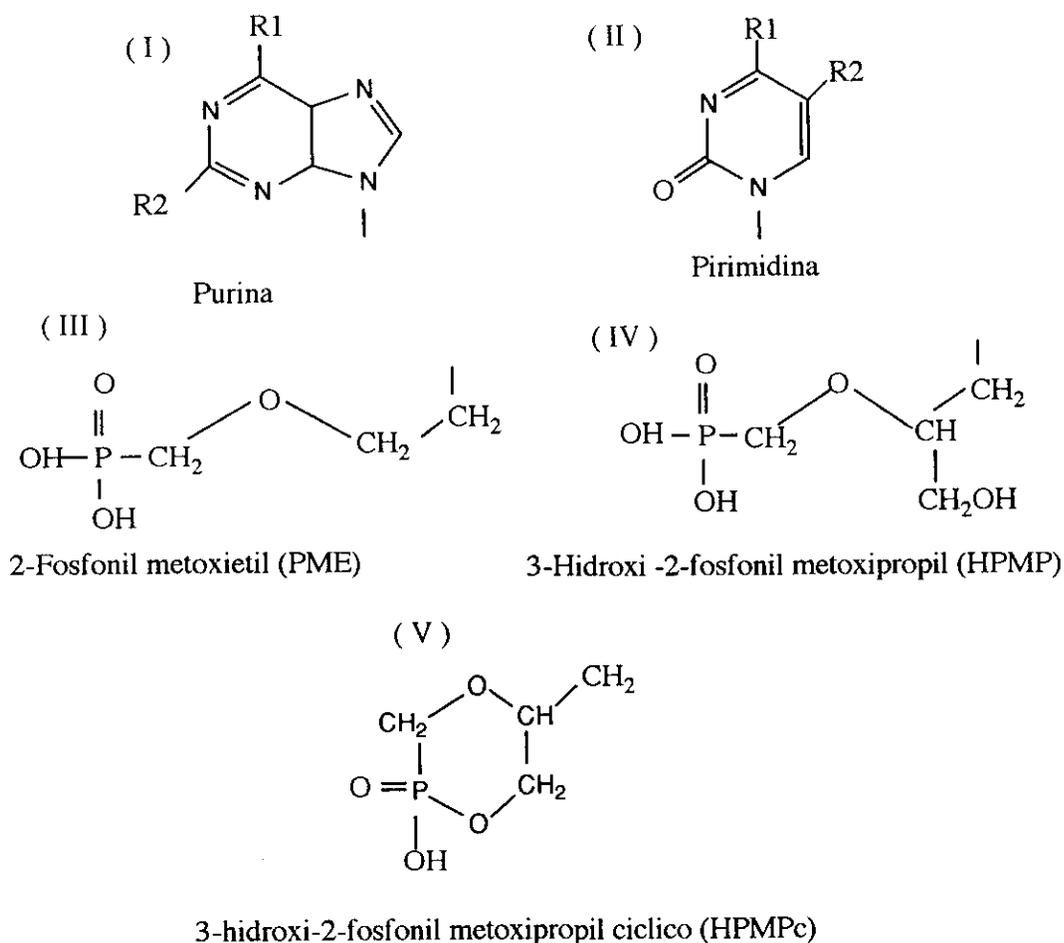
Figura 15. Efecto de polisacáridos sulfatados sobre la adsorción del vPPA a células Vero. Se purificó vPPA marcado con (35S0-metionina, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Cultivos de células Vero fueron infectadas con el virus a una mdi de 2 en presencia de 5, 50, 100, 1000 y 3000 µg/ml de carragenina λ, carragenina κ, pentosan polisulfato, fucoidina o heparina. Después de 1 hora de adsorción del virus, las células se lavaron tres veces con PBS para descartar el virus no adsorbido. Las células se lisaron con 1% SDS y 1% Tritón X-100. Los lisados se contaron con un espectrofotómetro de centelleo. Cada punto representa el valor medio de dos cultivos.

3.4. ANALOGOS DE NUCLEOSIDOS

3.4.1. Fosfonilmetoxialquilpurinas y fosfonilmetoxialquilpirimidinas.

Recientemente se han evaluado dos de los más potentes antivíricos ensayados frente al vPPA, como son el (S)-9(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil) adenina [(S)-HPMPA] y el 9(2-fosfonilmetoxietil) adenina (PMEA) (De Clercq y cols. 1986; Gil Fernández y De Clercq, 1987b).

Estas investigaciones se han extendido ahora a una variedad de derivados relacionados con estos dos compuestos análogos de nucleósidos. Los 12 compuestos ensayados se agrupan en 7 derivados púricos y 5 pirimidínicos. En abreviatura corresponden al primer grupo: (S)-9(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxi propil)adenina cíclico [(S)-HPMPAc], (S)-9(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)-2,6 diaminopurina [(S)-HPMPDAP], (RS)-9(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil) guanina [(RS)-HPMPG], (S)-9(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)citosina [(S)-HPMPC], (S)-3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil timina [(S)-HPMPT], (RS)-9(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil)uridina [(RS)-HPMPU] y (S)-9(3-hidroxi-2-fosfonil metoxi propil)-6-metil-citosina [(S)-HPMPC] y al segundo grupo: 9(2-fosfonilmetoxietil)-2,6-diaminopurina (PMEDAP), 9(2-fosfonilmetoxietil)-6-amino purina (PMEMAP), 9(2-fosfonilmetoxietil)-2-hidroxipurina (PMEHx), 9(2-fosfonilmetoxietil) uridina (PMEU) y 9(2-fosfonilmetoxietil)6-metil-citosina (PMEMC). Las correspondientes fórmulas se presentan seguidamente representado núcleos moleculares a los que se acoplan radicales diversos que son acíclicos o heterocíclicos y dan lugar a los diferentes compuestos, (figura 16).



| <u>Abreviatura</u> | <u>Heterociclo</u> | | <u>Cadena acíclica</u> | |
|--------------------|--------------------|-----------------|------------------------|-----------------|
| | <u>I o II</u> | <u>R1</u> | <u>R2</u> | <u>III o IV</u> |
| (S)-HPMPA | I | NH ₂ | H | IV |
| (S)-HPMPAc | I | NH ₂ | H | V |
| (S)-HPMPDAP | I | NH ₂ | NH ₂ | IV |
| (S)-HPMPG | I | OH | NH ₂ | IV |
| (S)-HPMPC | II | NH ₂ | H | IV |
| (S)-HPMPT | II | OH | CH ₃ | IV |
| (RS)-HPMPU | II | OH | H | IV |
| (S)-HPMPMC | II | NH ₂ | CH ₃ | IV |
| PMEA | I | NH ₂ | H | III |
| PMEDAP | I | NH ₂ | NH ₂ | III |
| PMEMAP | I | H | NH ₂ | III |
| PMEHx | I | OH | H | III |
| PMEU | II | OH | H | III |
| PMEMC | II | NH ₂ | CH ₃ | III |

Figura 16. Fosfonilmetoxialquilpurinas y fosfonilmetoxialquilpirimidinas
 (S), (RS): enantioisomería; A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina;
 U: uracilo; c: cíclico; x: base púrica sustituida.

TABLA VII. Citotoxicidad (CC₅₀), concentración efectiva antivírica (CE₅₀) e índice selectivo (IS) de las fosfonilmetoxialquil purinas y fosfonilmetoxialquil pirimidinas indicadas ensayadas frente al vPPA en células Vero.

| Compuesto | CC ₅₀ ^a (µg/ml) | CE ₅₀ ^b (µg/ml) | Índice ^c selectivo |
|-------------|--|--|----------------------------------|
| (S)-HPMPAc | 500 | 0,2 | 2.500 |
| (S)-HPMPDAP | 700 | 0,5 | 1.400 |
| (RS)-HPMPG | 600 | 1 | 600 |
| (S)-HPMPC | 700 | 1 | 700 |
| (S)-HPMPT | >500 | 200 | ≥ 2,5 |
| (RS)-HPMPU | >500 | 300 | ≥ 1,6 |
| (S)-HPMPMC | >500 | 300 | ≥ 1,6 |
| PMEDAP | 200 | 2 | 100 |
| PMEMAP | 600 | 100 | 6 |
| PMEHx | >500 | 200 | ≥ 2,5 |
| PMEU | >500 | 300 | ≥ 1,6 |
| PMEMC | >500 | 200 | ≥ 1,6 |

^a Concentración que produce un 50% de toxicidad en las células, obtenida por el método de tinción.

^b Concentración efectiva antivírica requerida para alcanzar una reducción del 50% sobre el título de virus.

^c Relación entre CC₅₀/EC₅₀.

Se ha evaluado la citotoxicidad, la concentración efectiva antivírica y la selectividad de los compuestos frente al vPPA presentándose los resultados en la tabla VII .

El cálculo de la citotoxicidad se ha basado en los métodos de la tinción vital, la observación directa al microscopio y en la incorporación de (³⁵S)-metionina en las proteínas celulares, haciéndose las lecturas a los 3 días post-infección para el primer método (tabla VII) y a los 2 días post-infección para el segundo y tercer método (tabla VIII). La concentración citotóxica mínima (CC₅₀) se expresa como la concentración requerida para que se produzca una reducción del 50% en la tinción celular o en la incorporación de (³⁵S)-metionina. Según los métodos de tinción vital y la observación directa al microscopio, podemos decir que el compuesto PMEDAP es el más citotóxico de todos los compuestos (Tabla VII) y presenta una CC₅₀ de 200 µg/ml. El resto de los compuestos presentan CC₅₀ superiores a 500 µg/ml. De la estimación de la citotoxicidad (figs. 18, 19, 20, 21 y 22) por inhibición de la incorporación de (³⁵S)-metionina también se deduce que el compuesto PMEDAP es el más citotóxico de todos los compuestos. De los cuatro más activos de toda la serie, (S)-HPMPAc, (RS)-HPMPG, (S)-HPMPC y (S)-HPMPDAP el primero tiene un CC₅₀ de >200 µg/ml, los otros 3 no son tóxicos a concentraciones superiores a 500 µg/ml.

Todos los compuestos ensayados han sido controlados en su citotoxicidad mediante el método colorimétrico, pero en el caso de aquellos compuestos que por este método dan lugar a valores que al ser elaborados con el parámetro CE₅₀ producen índices de selectividad muy bajos (véase tabla VII), y que comprenden a (S)-HPMPT, (RS)-HPMPU, (S)-HPMPMC, PME_{Hx}, PME_U y PME_{MC}, éstos no han sido controlados en su citotoxicidad por el método de la incorporación de (³⁵S)-metionina, por estimarse innecesario.

TABLA VIII. Efecto de diversas fosfonilmetoxialquil purinas y fosfonilmetoxialquil pirimidinas sobre la síntesis de proteínas en células Vero infectadas con el vPPA, en controles de células no infectadas, y sobre la inhibición de efectos citopáticos sobre células infectadas y tratadas.

| Compuesto | Inhibición 50% de incorporación de 35S-metionina ^a | | Inhibición 50% de ECP ^b |
|------------------------|---|----------------------------|------------------------------------|
| | Cel. no infectadas y tratadas | Cel. infectadas y tratadas | Cel. infectadas y tratadas |
| (S)-HPMPA ^c | >200 | <10 | 25 |
| (S)-HPMPDAP | >500 | <10 | 10 |
| (RS)-HPMPG | >500 | 75 | <10 |
| (S)-HPMPC | >500 | <10 | <10 |
| PMEDAP ^d | 175 | 75 | >300 |

^a Dosis mínima de compuesto ($\mu\text{g/ml}$) que inhibe la incorporación en un 50% de metionina marcada

^b Dosis mínima de compuesto ($\mu\text{g/ml}$) que inhibe el 50% de ECP

^c Fosfonilmetoxialquilpurinas

^d Fosfonilmetoxialquilpirimidinas

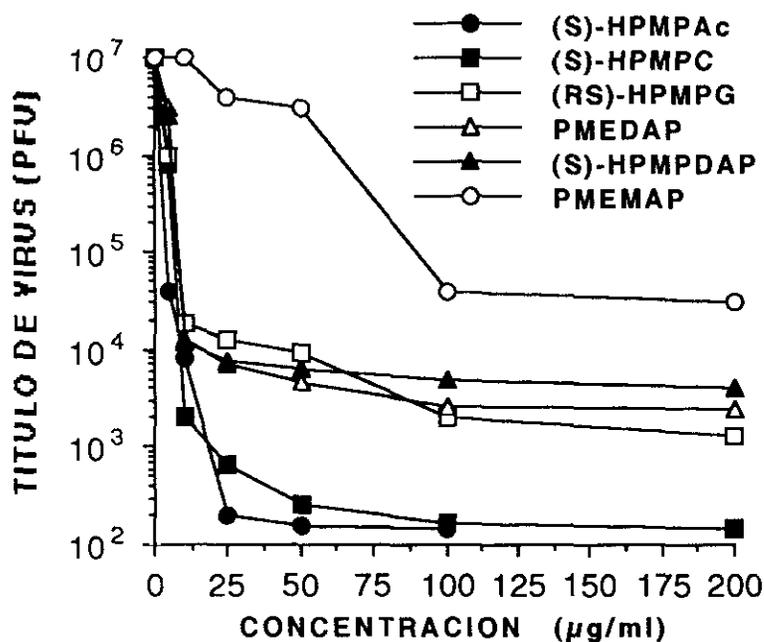


Figura 17. Efectos inhibidores de fosfonilmetoxialquilpurinas y fosfonilmetoxialquilpirimidinas sobre la multiplicación del vPPA en células Vero. Cultivos de células inoculados con vPPA a una mdi de 1 en presencia de 5, 10, 25, 50, 100 y 200 µg/ml de (S)-HPMPAc, (S)-HPMPC, (RS)-HPMPG, PMPDAP, (S)-HPMPDAP y PMEMAP incorporados en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. A los 3 días post-infección se realiza la lectura de los resultados. Cada punto representa el valor medio de 3 cultivos.

Se han llevado a cabo experimentos de reducción del rendimiento en virus con diferentes concentraciones de los compuestos. Las curvas dosis-respuesta se muestran en la figura 17. El más potente inhibidor entre los análogos de (S)-HPMPA es (S)-HPMPAc con un CE_{50} de $0,2 \mu\text{g/ml}$. El segundo compuesto más potente es (S)-HPMPDAP con un CE_{50} de $0,5 \mu\text{g/ml}$. Les siguen en orden de menor a mayor concentración (RS)-HPMPG y (S)-HPMPC con un CE_{50} de $1 \mu\text{g/ml}$ y PMEDAP con un CE_{50} de $2 \mu\text{g/ml}$, PMEMAP con un CE_{50} de $100 \mu\text{g/ml}$, y los otros compuestos [(S)-HPMPT, (RS)-HPMPU, (S)-HPMPMC, PMEhx, PMEU y PMEMC] pueden considerarse como inactivos contra vPPA.

De los compuestos activos (S)-HPMPAc y (S)-HPMPC alcanzan la mayor inhibición en el rendimiento de virus ($>4,5$ logs), mientras los valores correspondientes a (S)-HPMPDAP, PMPDAP y (RS)-HPMPG no exceden de 3,5 logs. Para el resto de los compuestos excepto para (RS)-HPMPG la reducción del rendimiento en virus parece nivelarse con las concentraciones más altas.

Basándose en la relación CC_{50}/CE_{50} se calculan los índices de selectividad de los compuestos que en orden decreciente se colocan como sigue: (S)-HPMPAc $>$ (S)-HPMPDAP $>$ (S)-HPMPC \sim (RS)-HPMPG $>$ PMEDAP $>$ PMEMAP resultando (S)-HPMPAc el más potente inhibidor del vPPA de este grupo de análogos estudiado.

De la observación de los efectos de las fosfonilmetoxialquilpurinas y pirimidinas determinados por métodos radiactivos puede deducirse los siguientes resultados para cada compuesto ensayado: (S)-HPMPAc alcanza el máximo porcentaje de incorporación de metionina marcada en las células infectadas a los $25 \mu\text{g/ml}$ pero en ningún momento llega al 100%, y a partir de esta concentración la incorporación disminuye, de lo que posiblemente es

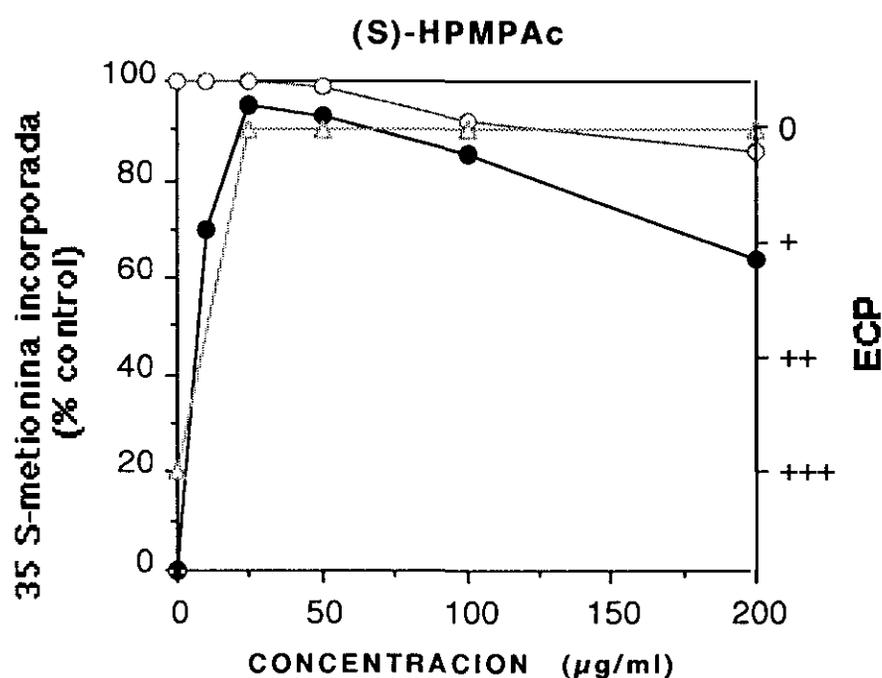


Figura 18. Efecto del (S)-HPMPAc sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 10, 25, 50, 100 y 200 µg/ml de (S)-HPMPAc incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

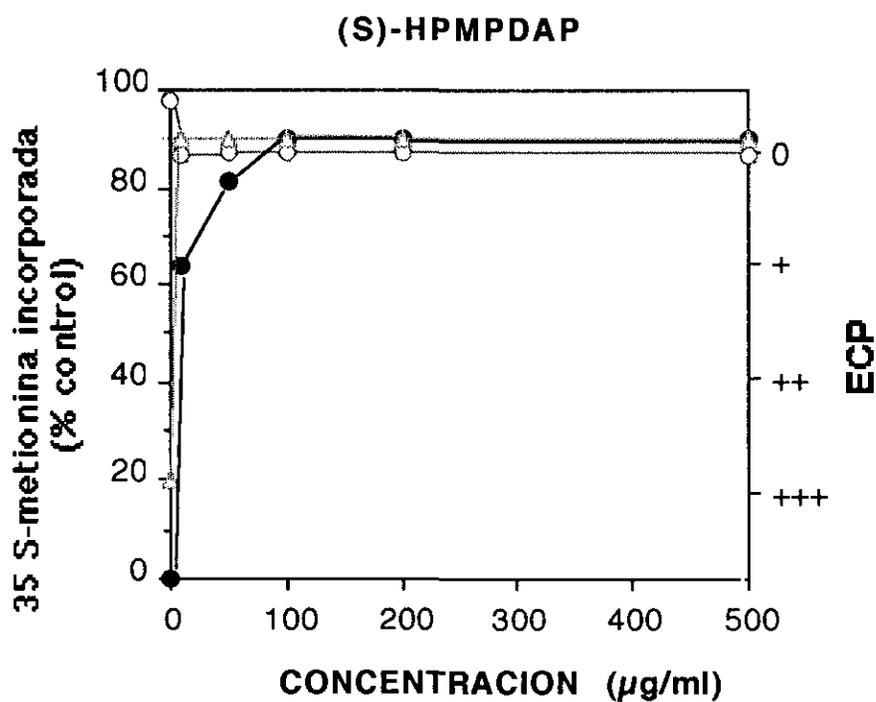


Figura 19. Efecto del (S)-HPMPDAP sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (○). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 10, 50, 100, 200 y 500 µg/ml de (S)-HPMPDAP incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

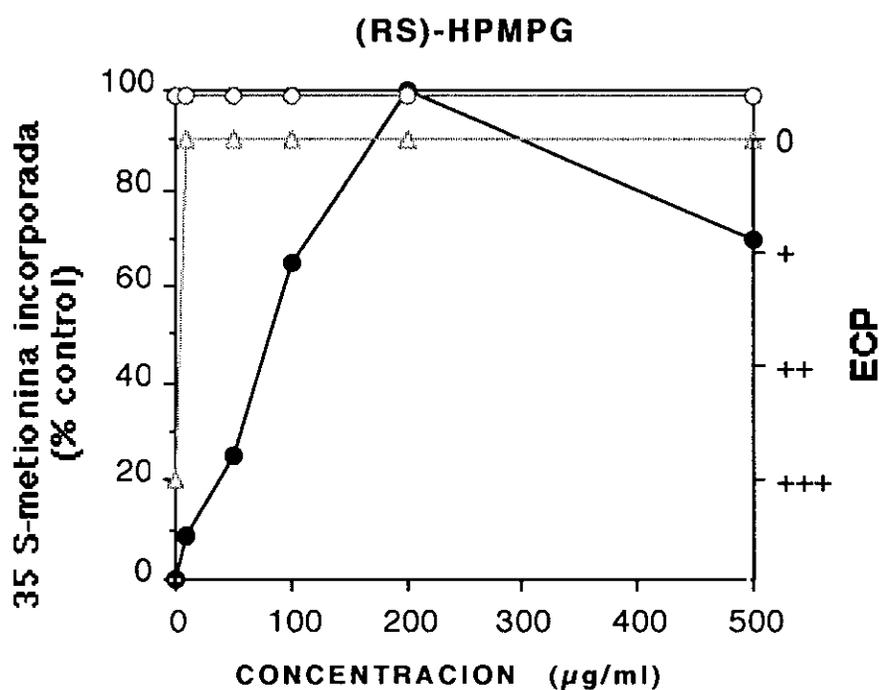


Figura 20. Efecto del (RS)-HPMPG sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (\bullet) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 10, 50, 100, 200 y 500 $\mu\text{g/ml}$ de (RS)-HPMPG incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (^{35}S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

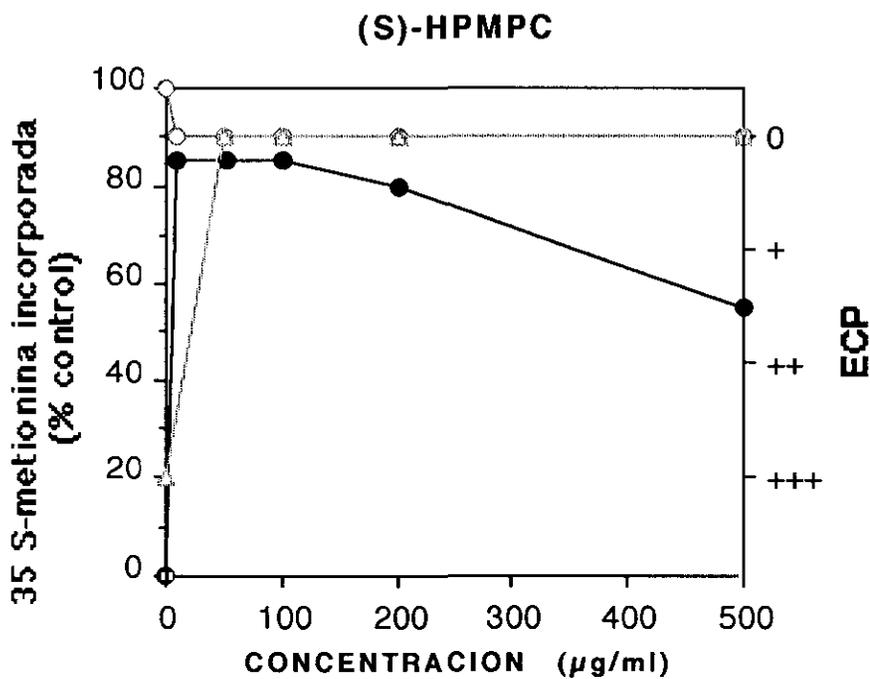


Figura 21. Efecto del (S)-HPMPC sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 10, 50, 100, 200 y 500 µg/ml de (S)-HPMPC incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

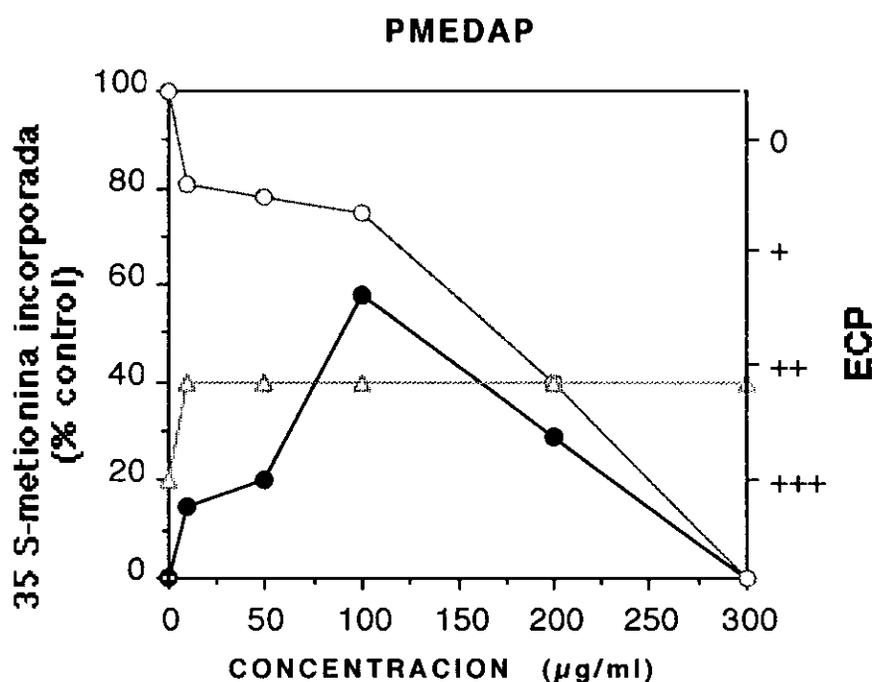


Figura 22. Efecto del PMEDAP sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 10, 50, 100, 200 y 300 µg/ml de PMEDAP incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (++++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

responsable la citotoxicidad, porque la incorporación de metionina sigue siendo alrededor del 90%; los ECPs a 25 $\mu\text{g/ml}$ se bloquean totalmente. (Figura 18).

(S)-HPMPDAP induce el máximo de incorporación de metionina en las células infectadas a bajas concentraciones (10 $\mu\text{g/ml}$) y se mantiene a todas las concentraciones probadas; no presenta toxicidad y los ECPs se bloquean totalmente a partir de baja concentración (10 $\mu\text{g/ml}$) (Figura 19).

Con (RS)-HPMPG la máxima incorporación de metionina marcada en las células infectadas no ocurre hasta los 200 $\mu\text{g/ml}$ aunque luego desciende; no produce toxicidad y sin embargo los ECPs se bloquean totalmente a partir de bajas concentraciones (10 $\mu\text{g/ml}$) (figura 20).

(S)-HPMPC induce el máximo de incorporación de metionina marcada en las células infectadas a la dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ manteniéndose con un ligero descenso; apenas presenta toxicidad hasta la concentración máxima ensayada de 500 $\mu\text{g/ml}$ y los ECPs se bloquean totalmente a la dosis de 50 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 21).

PMEDAP produce el máximo de incorporación de metionina marcada en las células infectadas a la dosis de 100 $\mu\text{g/ml}$ sin embargo después desciende y a 300 $\mu\text{g/ml}$ no hay incorporación; la citotoxicidad es moderada hasta la dosis de 100 $\mu\text{g/ml}$ y después aumenta hasta el 100% de toxicidad a 300 $\mu\text{g/ml}$; los ECPs se mantienen alrededor del 50% con todas las concentraciones ensayadas. (Figura 22).

3.4.2. Derivados de adenosina

Se han estudiado 15 compuestos de este tipo, parte de cuyas fórmulas se representan en la figura 23.

La evaluación de la citotoxicidad de estos productos se realiza mediante los métodos de observación directa al microscopio, tinción vital y de incorporación de (³⁵S)-metionina a las proteínas celulares, como han sido descritos anteriormente.

Mediante el método de la tinción vital observamos alta citotoxicidad con 6β'-fluoroaristeromicina, neplanocin A, MDL y 3-deazaneplanocin cuyos valores (CC₅₀) son de 10, 10, 20 y 30 μg/ml de compuesto respectivamente, este parámetro es más moderado para el resto de los compuestos. La menor citotoxicidad encontrada corresponde a la adenosina 2',3'-dialdehido y adenosina N'-oxido, 400 y 300 μg/ml respectivamente (Tabla IX).

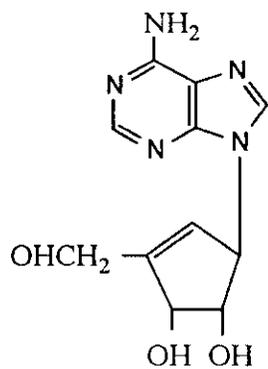
Realizando experimentos de inhibición del título del virus, llevados a cabo como se ha descrito, obtenemos las curvas que presentamos en las figuras de la 24 a la 30 ambas inclusive. Las cuatro primeras corresponden a 6β'-fluoroaristeromicina, neplanocin A, 3-deazaneplanocin y MDL; agrupándose en la figura 28, DHCA, DHCDA, compuesto 3 y compuesto 4; en la figura 29, el grupo de los 4'-derivados de DHCaA, y finalmente en la figura 30 los compuestos adenosina 2',3'-dialdehido y adenosina N'-oxido. Al calcularse el CE₅₀ determinamos que el compuesto más potente en su capacidad inhibidora de la multiplicación del virus es 6β'-fluoroaristeromicina con un valor de 0,008 μg/ml capaz de inhibir el 50% de producción de virus. Con muy poca diferencia le siguen en actividad 3-deazaneplanocin con un CE₅₀ de 0,01 μg/ml, MDL con 0,03, compuesto 4 con 0,08 y posteriormente 4'β'-vinil-DHCaA con 0,1 μg/ml, neplanocin A con 0,15 μg/ml, compuesto 3 con 0,3 μg/ml, 4'β'-metil-DHCaA con 0,5 μg/ml, igual que DHCA. Ya con valores de 1 μg/ml y algo superiores encontramos los restantes como son DHCDA y adenosina 2',3'-dialdehido con 1 μg/ml; 4'β'-etil-DHCaA y adenosina N'-oxido con 5 μg/ml y por último con 10 μg/ml encontramos 4'β'-fenil-DHCaA y 4'α-

metil-DHCaA. En general su actividad a tan bajas dosis indica que son potentes inhibidores la mayoría.

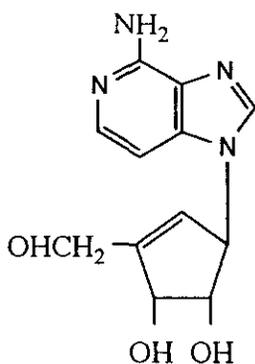
La 6 β '-fluoroaristeromicina a la dosis de 1 μ g/ml inhibe el rendimiento en virus en más de 2,5 logs como sucede con neplanocin A a 5 μ g/ml, 3-deazaneplanocin a 50 μ g/ml, MDL a 25 y DHCA, DHCDA y compuesto 4 a 100 μ g/ml. También se encuentran en esta línea 4' β -fenil-DHCaA, 4' β -vinil-DHCaA, 4' α -metil-DHCaA, 4' β -metil-DHCaA a la dosis de 100 μ g/ml.

Sobrepasan la inhibición de 3 logs el compuesto 4 a 100 μ g/ml como así mismo 4' β -etil-DHCaA a la misma dosis.

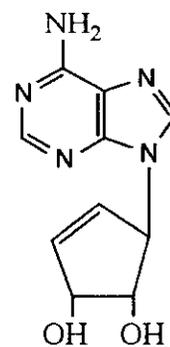
Finalmente y con los parámetros CC₅₀ y CE₅₀ determinados, procedemos al cálculo del índice de selectividad. Tenemos cuatro compuestos con un índice de selectividad más alto que son 3-deazaneplanocin A= 3.000, compuesto 4= 2.500, 4' β -vinil-DHCaA= 2.000 y 6 β '-fluoroaristeromicina= 1.250. Le siguen en actividad los siguientes compuestos de mayor a menor: con un índice de selectividad de 666 el MDL y el compuesto 3; con 400, DHCA, 4' β -metil-DHCaA y adenosina 2',3'-dialdehido; con 200 el DHCDA; con 66 el neplanocin A; con 60 la adenosina N'-oxido; con 40 el 4' β -etil-DHCaA; con 20 el 4' α -metil-DHCaA y con 15 el 4' β -fenil-DHCaA.



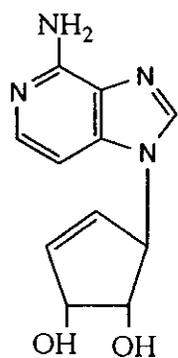
NEPLANOCIN A



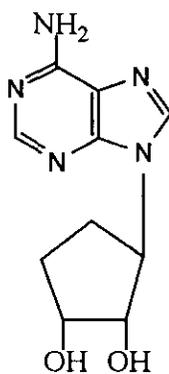
3 - DEAZANEPLANOCIN A



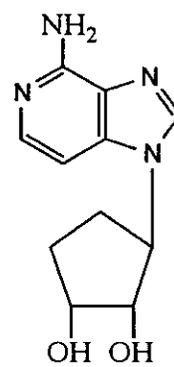
DHCA



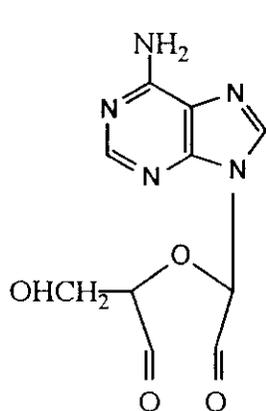
DHCDA



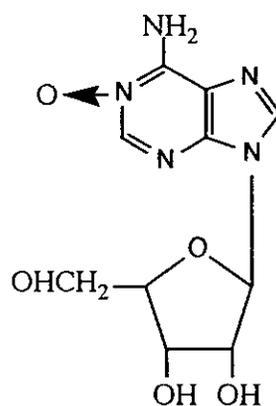
COMPUESTO 3



COMPUESTO 4



ADENOSINA 2',3'-DIALDEHIDO



ADENOSINA N¹- OXIDO

Figura 23. Derivados de adenosina

TABLA IX. Citotoxicidad (CC₅₀), concentración efectiva antivírica (CE₅₀) e índice selectivo (IS) de los diferentes derivados de adenosina ensayados frente al vPPA en células Vero.

| Compuesto | CC ₅₀ ^a (μ g/ml) | CE ₅₀ ^b (μ g/ml) | Índice ^c selectivo |
|---------------------------------|--|--|----------------------------------|
| 6 β -fluoroaristeromicina | 10 | 0,008 | 1250 |
| Neplanocin A | 10 | 0,15 | 66 |
| 3-Deazaneplanocin A | 30 | 0,01 | 3000 |
| MDL | 20 | 0,03 | 666,6 |
| DHCA | 200 | 0,5 | 400 |
| DHCDA | 200 | 1 | 200 |
| Compuesto 3 | 200 | 0,3 | 666,6 |
| Compuesto 4 | 200 | 0,08 | 2500 |
| 4' β -vinil-DHCaA | 200 | 0,1 | 2000 |
| 4' β -fenil-DHCaA | 150 | 10 | 15 |
| 4' α -metil-DHCaA | 200 | 10 | 20 |
| 4' β -metil-DHCaA | 200 | 0,5 | 400 |
| 4' β -etil-DHCaA | 200 | 5 | 40 |
| Adenosina 2',3'-dialdehido | 400 | 1 | 400 |
| Adenosina N'-oxido | 300 | 5 | 60 |

^a Concentración que produce un 50% de toxicidad en las células, obtenida por el método de tinción.

^b Concentración efectiva antivírica requerida para alcanzar una reducción de un 50% sobre el título de virus.

^c Relación entre CC₅₀/CE₅₀.

Compuesto 3: 9-(trans-2',trans-3'-dihidroxiciclopentil) adenina.

Compuesto 4: 9-(trans-2',trans-3'-dihidroxiciclopentil) deazaadenina.

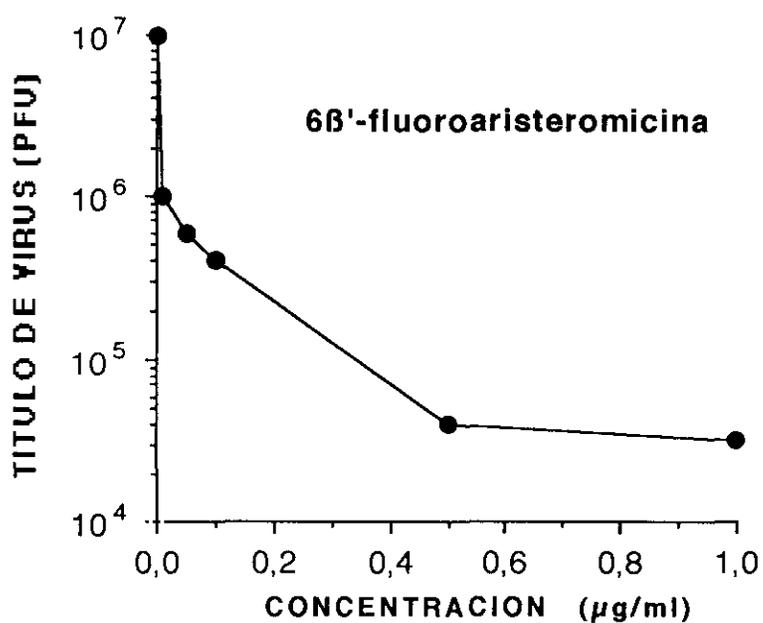


Figura 24. Efecto inhibitor de 6β'-fluoroaristeromicina sobre la multiplicación del vPPA en células Vero. Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 0,1 en presencia de 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 y 1 µg/ml de 6β'-fluoroaristeromicina incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. A los 3 días post-infección se realiza la lectura de los resultados. Cada punto representa el valor medio de 3 cultivos.

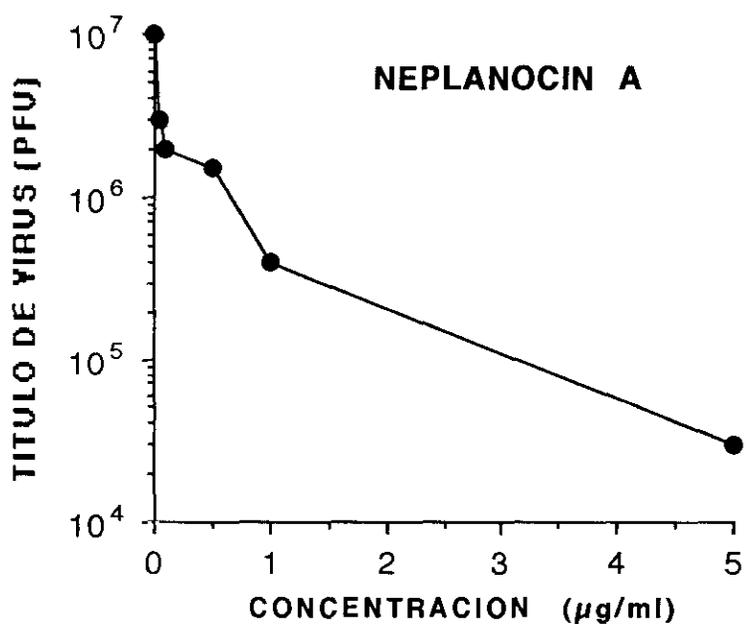


Figura 25. Efecto inhibitor de Neplanocin A sobre la multiplicación del vPPA en células Vero. Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 0,1 en presencia de 0,05; 0,1; 0,5; 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de neplanocin A incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. A los 3 días post-infección se realiza la lectura de los resultados. Cada punto representa el valor medio de 3 cultivos.

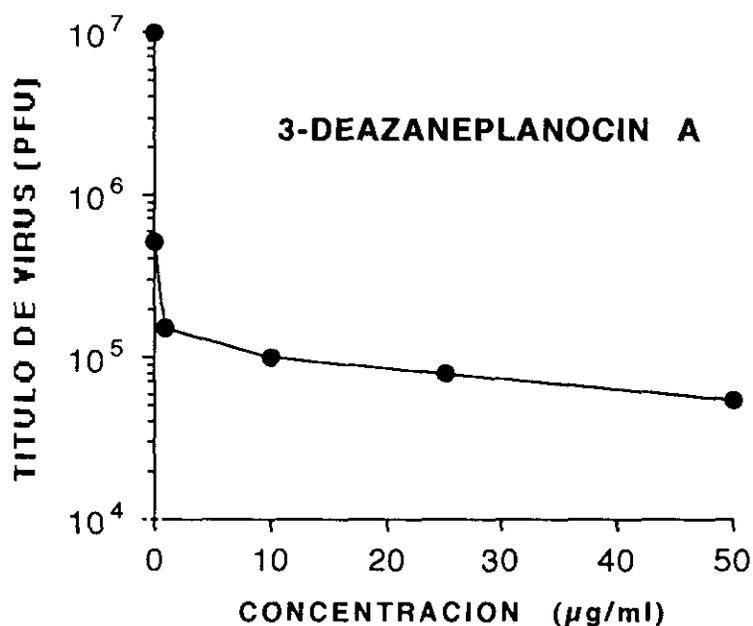


Figura 26. Efecto inhibidor de 3-deazaneplanocin A sobre la multiplicación del vPPA en células Vero. Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 0,1 en presencia de 0,1; 1; 10; 25 y 50 µg/ml de 3-deazaneplanocin A incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. A los 3 días post-infección se realiza la lectura de los resultados. Cada punto representa el valor medio de 3 cultivos.

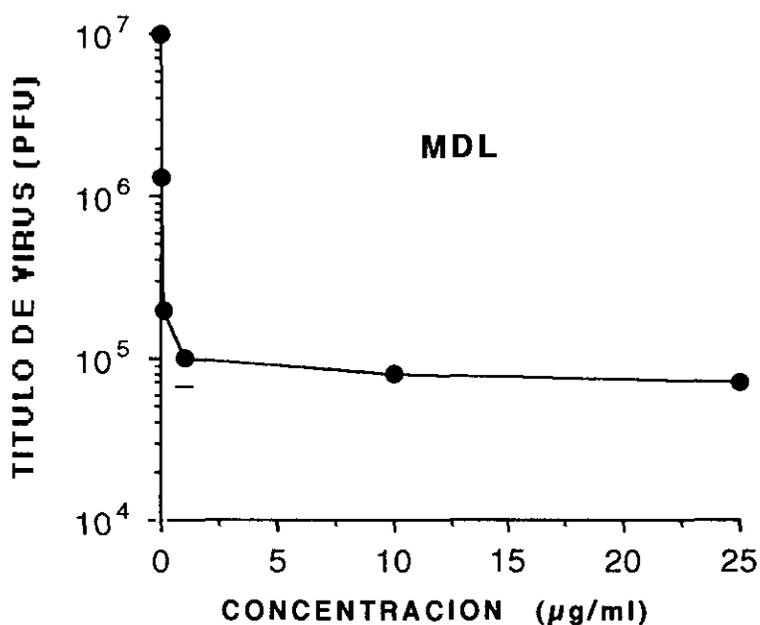


Figura 27. Efecto inhibitor de MDL sobre la multiplicación del vPPA en células Vero. Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 0,5 en presencia de 0,01; 0,1; 1; 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$ de MDL incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. A los 3 días post-infección se realiza la lectura de los resultados. Cada punto representa el valor medio de 3 cultivos.

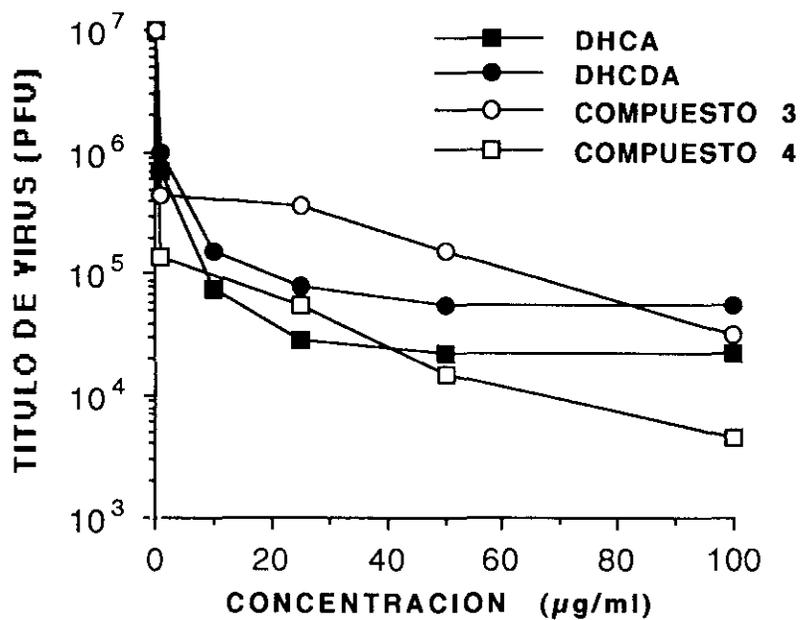


Figura 28. Efectos inhibidores de DHCA, DHCDA, compuesto 3 y compuesto 4 sobre la multiplicación del vPPA en células Vero. Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 0,5 en presencia de 1, 10, 25, 50 y 100 µg/ml de DHCA, DHCDA, compuesto 3 y compuesto 4 incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. A los 3 días post-infección se realiza la lectura de los resultados. Cada punto representa el valor medio de 3 cultivos.

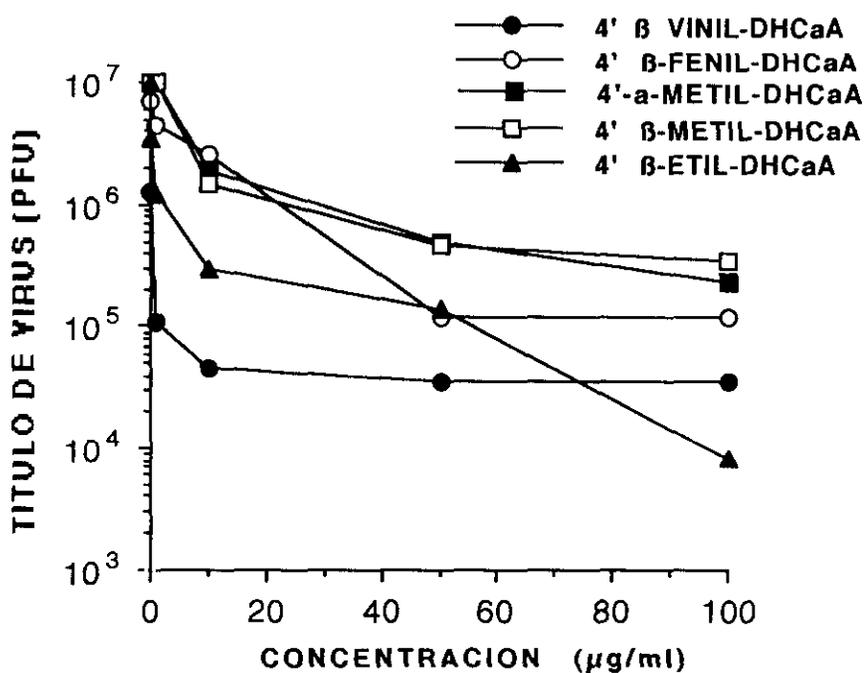


Figura 29. Efectos inhibidores de los derivados de adenosina indicados en la figura, sobre la multiplicación del vPPA en células Vero. Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 0,5 en presencia de 0,1; 1; 10; 50 y 100 µg/ml de análogos de 4'β-DHCaA incorporados en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. A los 3 días post-infección se realiza la lectura de los resultados. Cada punto representa el valor medio de 3 cultivos.

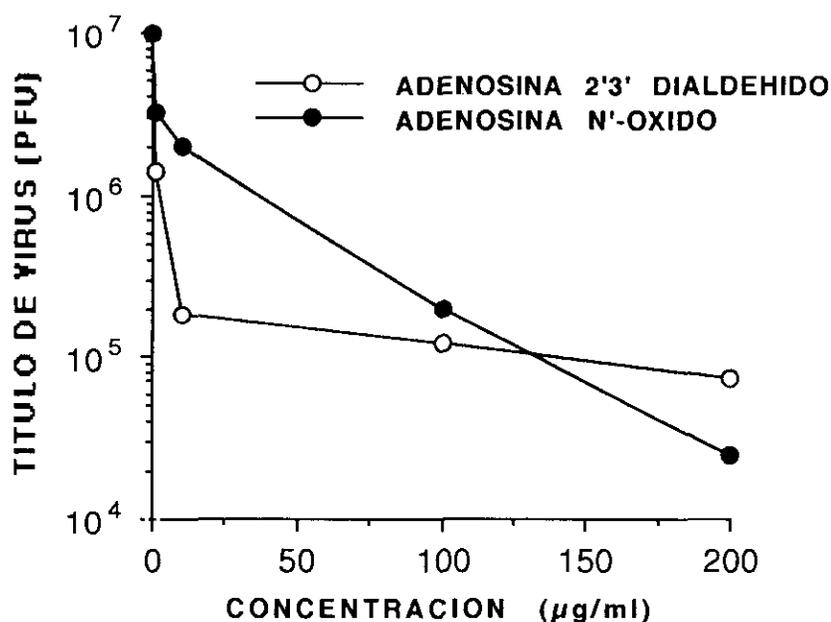


Figura 30. Efectos inhibidores de adenosina 2',3'-dialdehido y adenosina N'-oxido indicadas en la figura, sobre la multiplicación del vPPA en células Vero. Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 0,5 en presencia de 1, 10, 100 y 200 µg/ml de adenosina 2',3'-dialdehido y adenosina N'-oxido incorporado en medio de mantenimiento. después del periodo de adsorción. A los 3 días post-infección se realiza la lectura de los resultados. Cada punto representa el valor medio de 3 cultivos.

Por incorporación de (^{35}S)-metionina en las células sin infectar los resultados muestran una mayor toxicidad para todos los compuestos (Figuras 31 a 45 ambas inclusive). En la tabla X se agrupan los valores 50% de inhibición de la incorporación de (^{35}S)-metionina en células infectadas y sin infectar, que en líneas generales se corresponden con los calculados mediante el método colorimétrico pero demostrando una mayor sensibilidad el método de inhibición de incorporación de (^{35}S)-metionina.

En la figura 31 se presentan los resultados correspondientes a 6 β '-fluoroaristeromicina, la cual produce el máximo de la incorporación de metionina marcada en células infectadas (87%) a muy baja concentración (0,01 $\mu\text{g/ml}$), a partir de 1 $\mu\text{g/ml}$ disminuye la incorporación de metionina paulatinamente hasta la dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ a la cual es prácticamente nula; la citotoxicidad es alta y aumenta rápidamente con la concentración del compuesto; los ECPs desaparecen a la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$.

El neplanocin A al igual que el compuesto anterior, el máximo de incorporación de metionina marcada (87%) en las células infectadas corresponde a baja concentración del compuesto (0,05 $\mu\text{g/ml}$), y a partir de 1 $\mu\text{g/ml}$ disminuye la incorporación de metionina paulatinamente; la citotoxicidad es mayor que la del compuesto anterior y aumenta más rápidamente; los ECPs sólo son bloqueados en un 50% (Figura 32).

El 3-deazaneplanocin a concentraciones de tan sólo 0,005 $\mu\text{g/ml}$, las células infectadas incorporan el máximo de metionina (97%) que decrece suavemente hasta un 50% a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$, para luego mantenerse este porcentaje de incorporación hasta 10 $\mu\text{g/ml}$; la citotoxicidad es menor que la del Neplanocin A; los ECPs se bloquean totalmente a la dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 33).

El MDL también permite una incorporación de (³⁵S)-metionina en las células infectadas de un 90% a dosis bajas (0,01 μ g/ml) descendiendo al aumentar la dosis y posteriormente se mantiene; la inhibición de incorporación de (³⁵S)-metionina en las células sin infectar es de un 30% a 10 μ g/ml; los ECPs se bloquean prácticamente a bajas concentraciones del compuesto (Figura 34).

El DHCA induce el máximo de incorporación de metionina marcada en las células infectadas a baja concentración (0,1 μ g/ml) manteniéndose su valor hasta dosis de 1 μ g/ml descendiendo posteriormente de forma ligera; la citotoxicidad es de un 50% a 10 μ g/ml y se mantiene al mismo nivel hasta los 100 μ g/ml (resultados no mostrados); los ECPs disminuyen el 50% a 0,5 μ g/ml (Figura 35).

El DHODA da un máximo de incorporación de metionina en las células infectadas (97%) a baja concentración (0,5 μ g/ml) con un pequeño descenso en 1 μ g/ml manteniéndose; inhibe la incorporación de (³⁵S)-metionina en un 32% a 10 μ g/ml; los ECPs se bloquean parcialmente siendo poco afectados por dosis crecientes (Figura 36).

El compuesto 3 produce la incorporación máxima de metionina marcada en células infectadas (55%) a baja concentración (0,05 μ g/ml) disminuyendo con el aumento de la concentración alrededor de un 30% manteniéndose en este valor finalmente; la citotoxicidad se mantiene en un 50% desde los 0,1 hasta los 10 μ g/ml; los ECPs son inhibidos aproximadamente al 50% a dosis de 0,05 μ g/ml (Figura 37).

El compuesto 4 induce la máxima incorporación de metionina marcada (80%) en células infectadas a baja concentración (0,05 μ g/ml), y a 1 μ g/ml baja a un 55% manteniéndose después; los ECPs son afectados como con el compuesto anterior (Figura 38).

TABLA X. Efecto de diferentes derivados de adenosina sobre la síntesis de proteínas en células Vero infectadas con el vPPA, en controles de células no infectadas, y sobre la inhibición de efectos citopáticos sobre células infectadas y tratadas.

| Compuesto | Inhibición 50% de incorporación de ³⁵ S-metionina ^a | | Inhibición 50% de ECP ^b |
|----------------------------|---|----------------------------|------------------------------------|
| | Cel. no infectadas y tratadas | Cel. infectadas y tratadas | Cel. infectadas y tratadas |
| 6β'-fluoroaristeromicina | 6 | 0,005 | 0,1 |
| Neplanocin A | 4 | <0,005 | >10 |
| 3-deazaneplanocin A | >10 | <0,005 | 0,005 |
| MDL | >10 | <0,005 | 0,1 |
| DHCA | 6 | <0,1 | >10 |
| DHCDA | >10 | <0,1 | 0,25 |
| Compuesto 3 | 5 | 0,05 | >10 |
| Compuesto 4 | >10 | 0,05 | >10 |
| 4'β-vinil-DHCaA | >10 | 0,1 | >10 |
| 4'β-fenil-DHCaA | >10 | >10 | >10 |
| 4'α-metil-DHCaA | >10 | >10 | >10 |
| 4'β-metil-DHCaA | >10 | >10 | >10 |
| 4'β-etil-DHCaA | >10 | >10 | >10 |
| Adenosina 2',3'-dialdehido | >100 | <1 | 4 |
| Adenosina N'-oxido | >200 | <10 | 5 |

^a Dosis mínima de compuesto ($\mu\text{g/ml}$) que inhibe la incorporación en un 50% de metionina marcada

^b Dosis mínima de compuesto ($\mu\text{g/ml}$) que inhibe el 50% del ECP

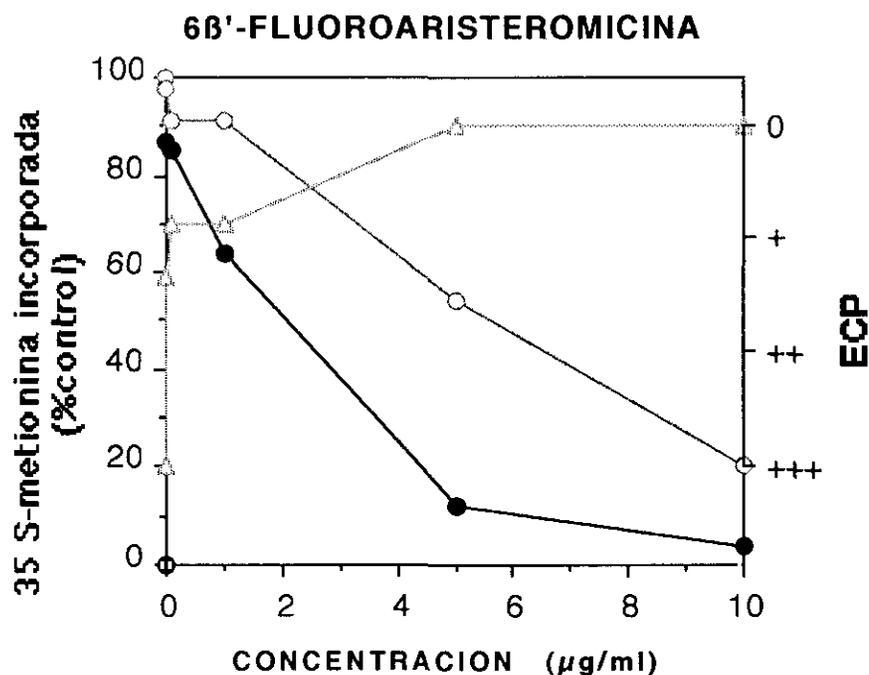


Figura 31. Efecto del 6 β '-fluoroaristeromicina sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (\bullet) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 0,01; 0,1; 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de 6 β '-fluoroaristeromicina incorporado en el medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (^{35}S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

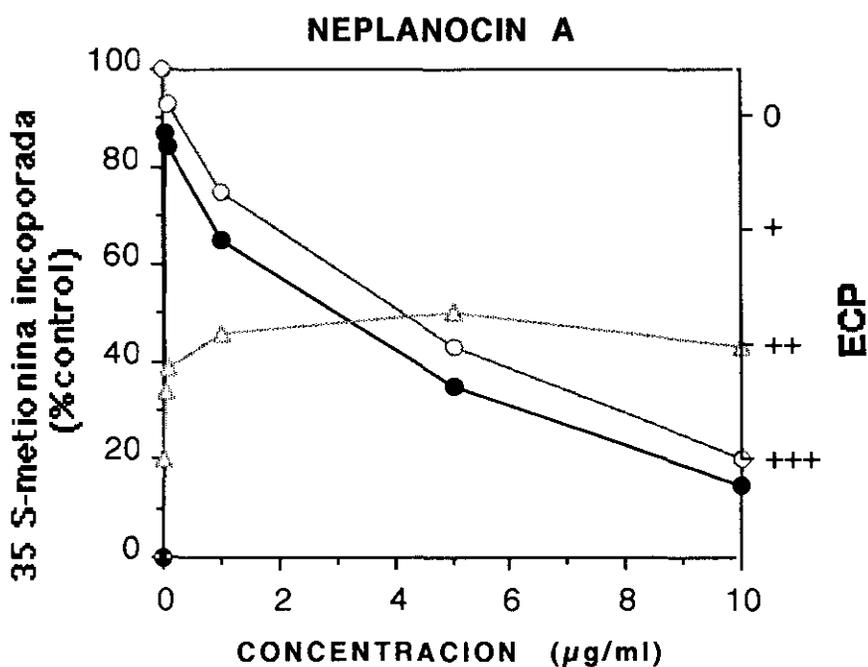


Figura 32. Efecto del neplanocin A sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 0,05; 0,1; 1; 5 y 10 µg/ml de neplanocin incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

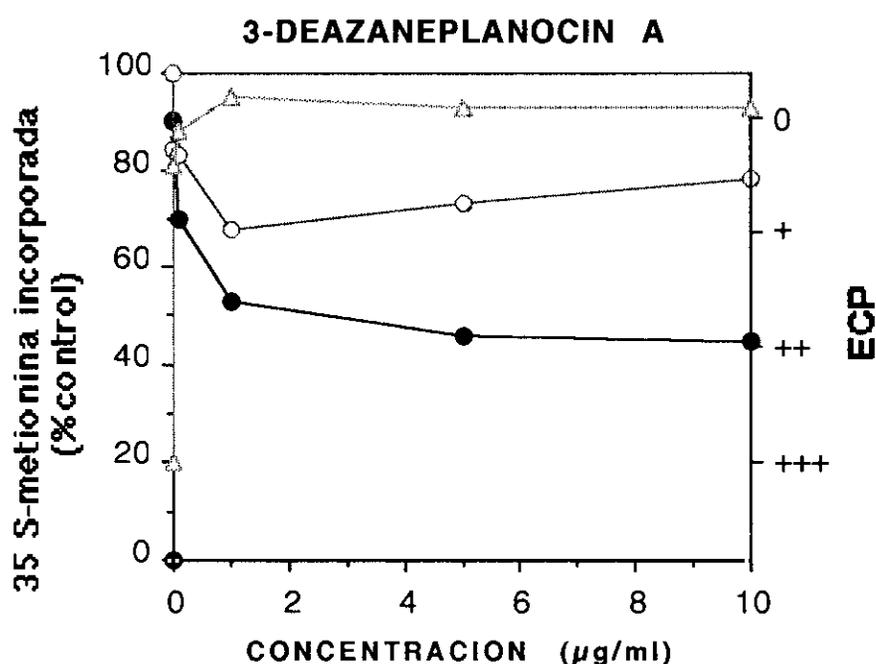


Figura 33. Efecto del 3-deazaneplanocin A sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (○). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 0,01; 0,1; 1; 5 y 10 µg/ml de 3-deazaneplanocin incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

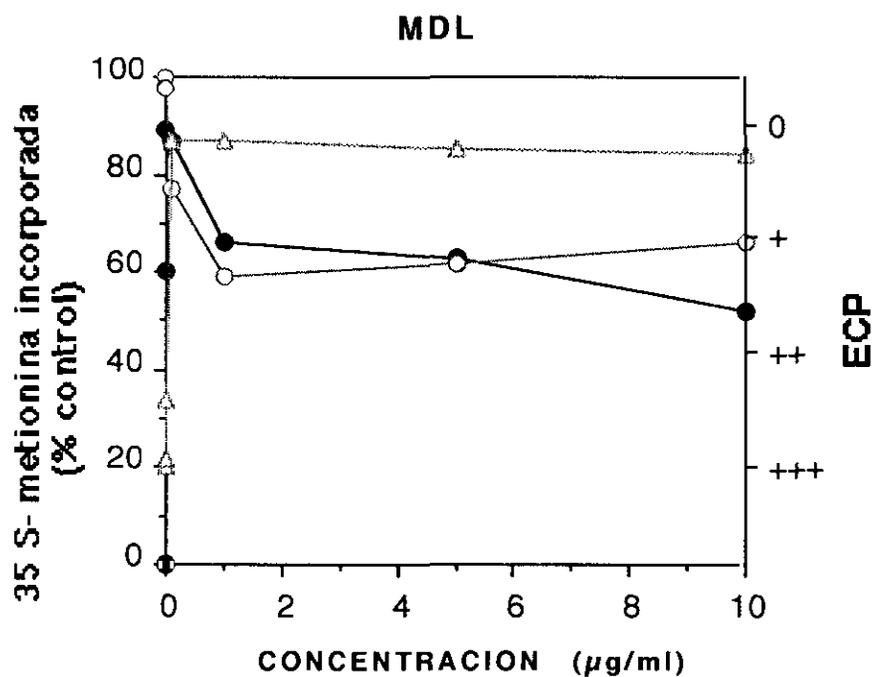


Figura 34. Efecto del MDL sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 0,005; 0,01; 0,1; 1; 5 y 10 µg/ml de MDL incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (35S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

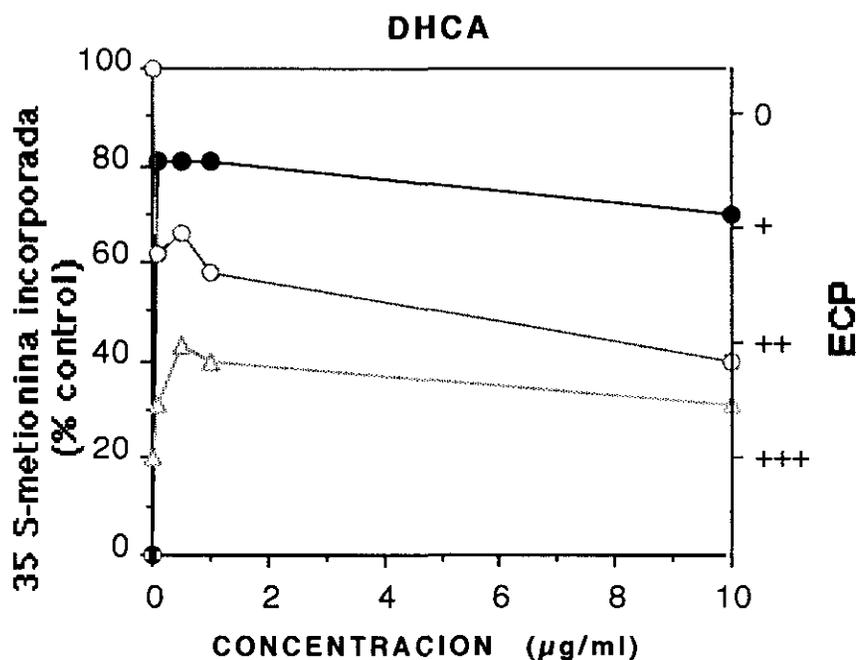


Figura 35. Efecto del DHCA sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (\bullet) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 0,1; 0,5; 1; 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de DHCA incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (^{35}S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

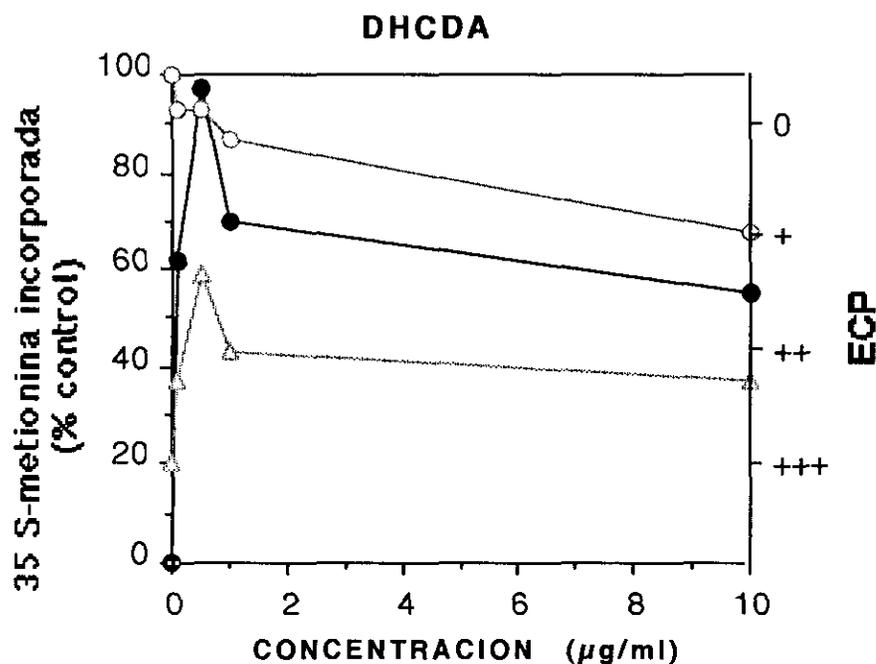


Figura 36. Efecto del DHCDA sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 0,1; 0,5; 1; 5 y 10 µg/ml de DHCDA incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

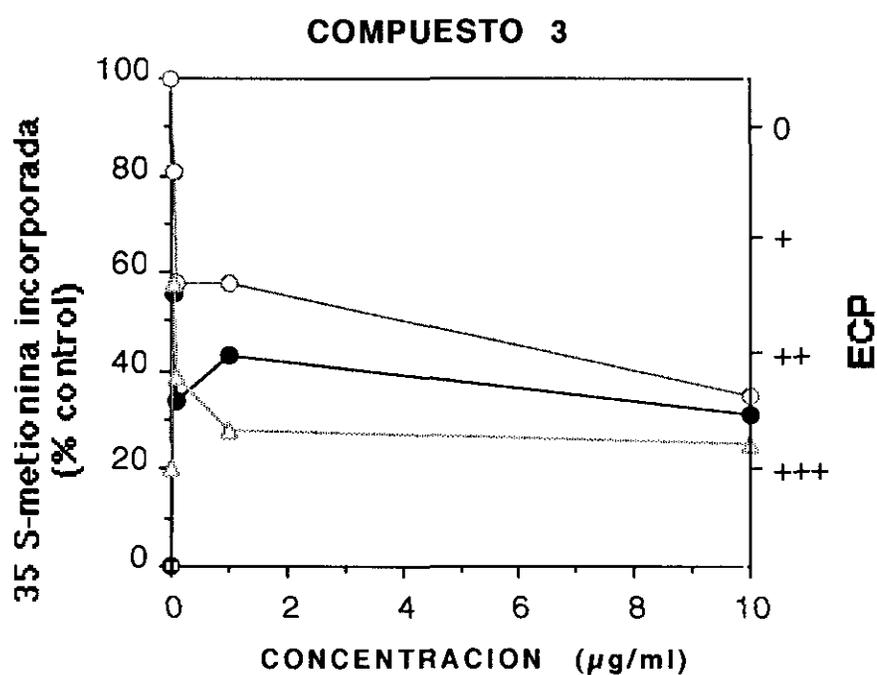


Figura 37. Efecto del compuesto 3 sobre la inhibición de ECP en células Vero infectadas con vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con vPPA a una moi de 1 en presencia de 0,05; 0,1; 1 y 10 µg/ml del compuesto 3 incorporado en medio de mantenimiento. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el % de (S³⁵)-metionina incorporada. Los ECP han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

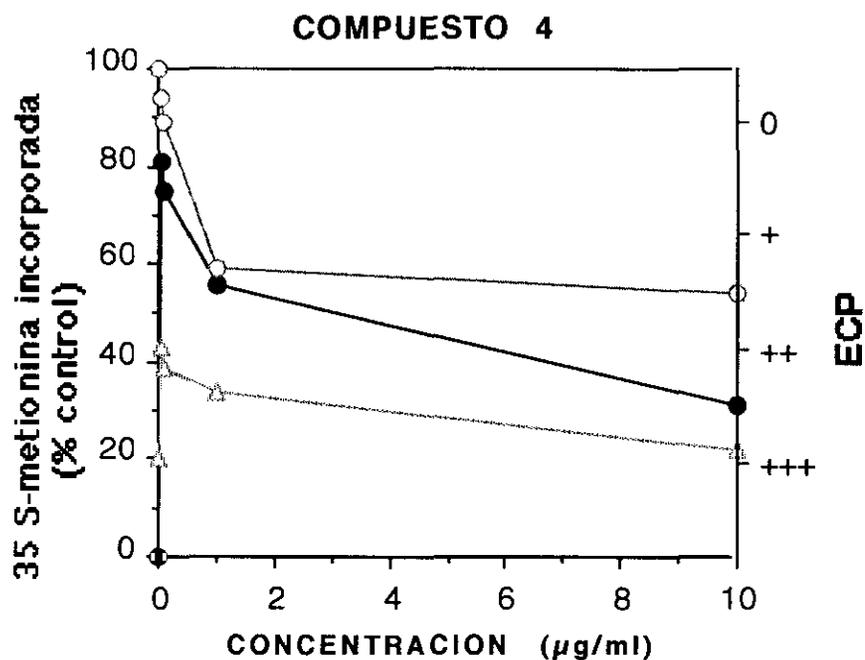


Figura 38. Efecto del compuesto 4 sobre la inhibición de ECP en células Vero infectadas con vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (\bullet) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con vPPA a una moi de 1 en presencia de 0,05; 0,1; 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto 4 incorporado en medio de mantenimiento. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el % de (S^{35})-metionina incorporada. Los ECP han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

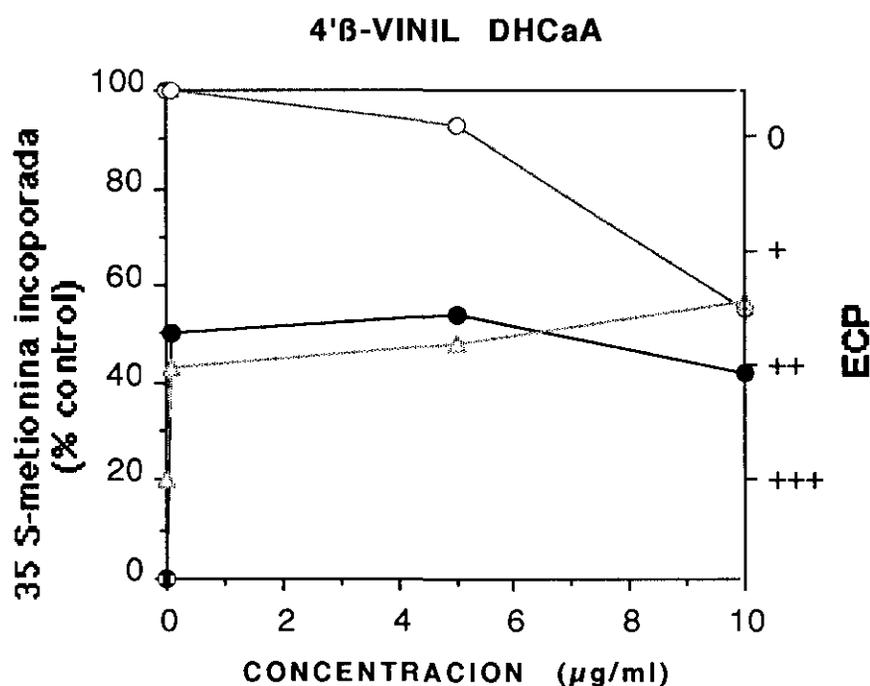


Figura 39. Efecto del 4'β-vinil-DHCaA sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (○). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 0,1; 5 y 10 μg/ml de 4'β-vinil-DHCaA incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

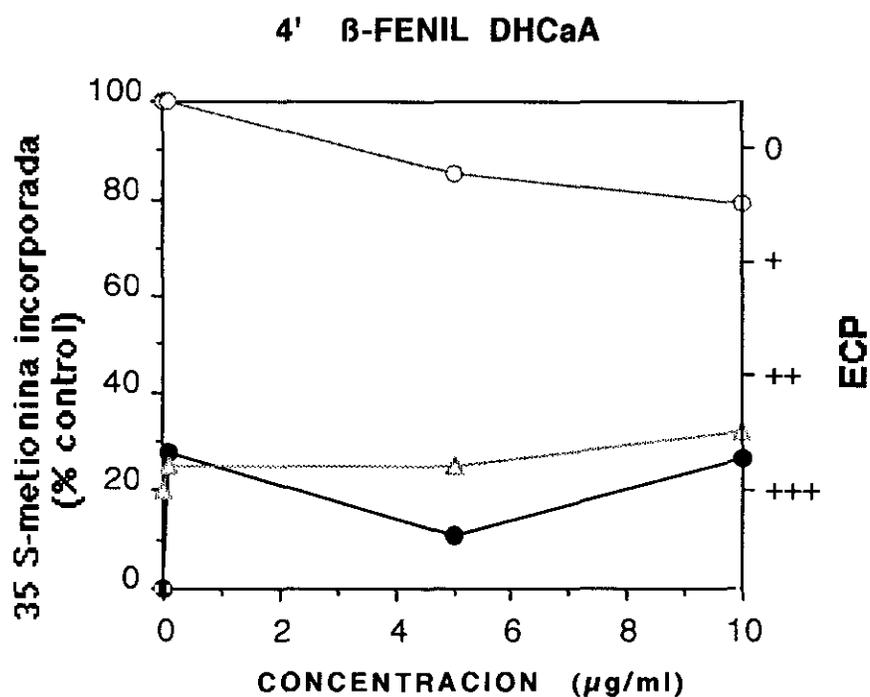


Figura 40. Efecto del 4' β -fenil-DHCaA sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (\bullet) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 0,1; 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de 4' β -fenil-DHCaA incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (^{35}S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

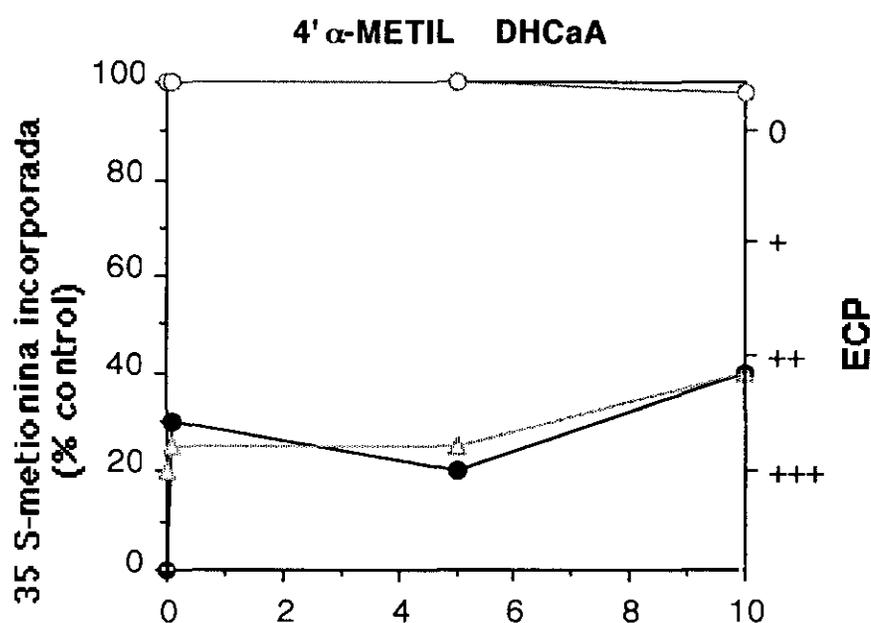


Figura 41. Efecto del 4'α-metil-DHCA sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 0,1; 5 y 10 μg/ml de 4'α-metil-DHCA incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (++++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

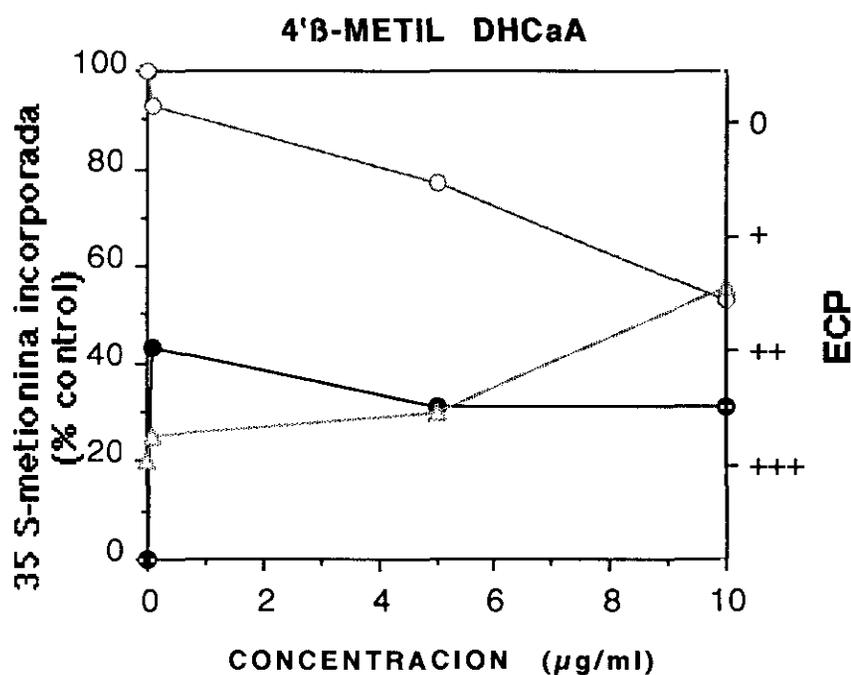


Figura 42. Efecto del 4'β-metil-DHCaA sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (○). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 0,1; 5 y 10 μg/ml de 4'β-metil-DHCaA incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

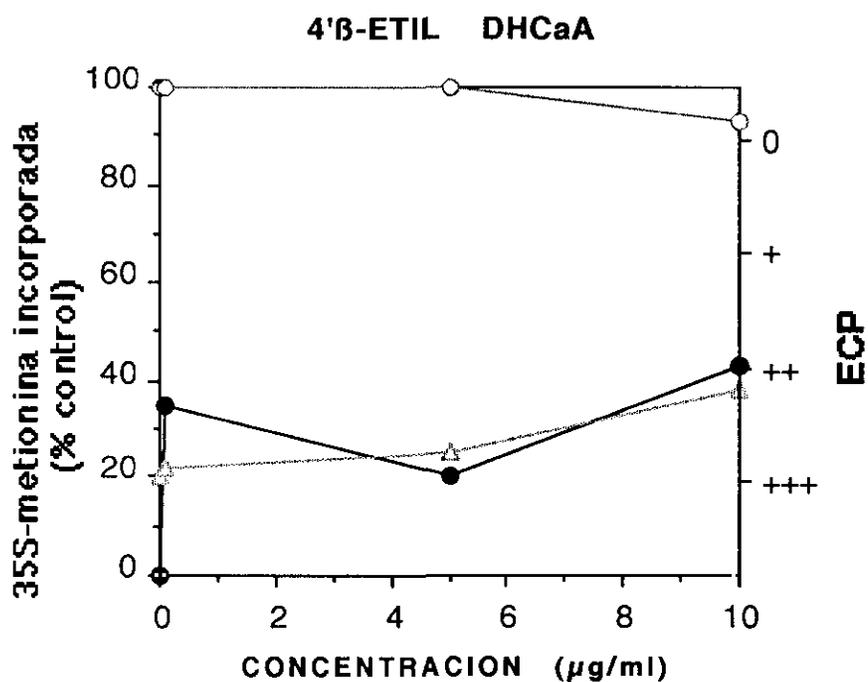


Figura 43. Efecto del 4'β-etil-DHCA sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 0,1; 5 y 10 μg/ml de 4'β-etil-DHCA incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

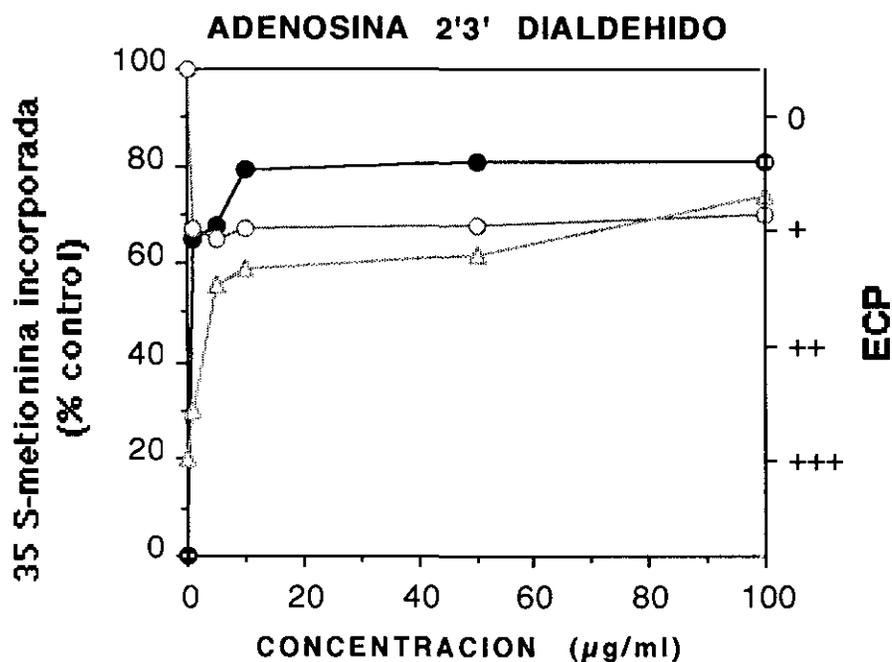


Figura 44. Efecto de la adenosina 2',3'-dialdehido sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (○). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 1, 5, 10, 50 y 100 µg/ml de adenosina 2',3'-dialdehido incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

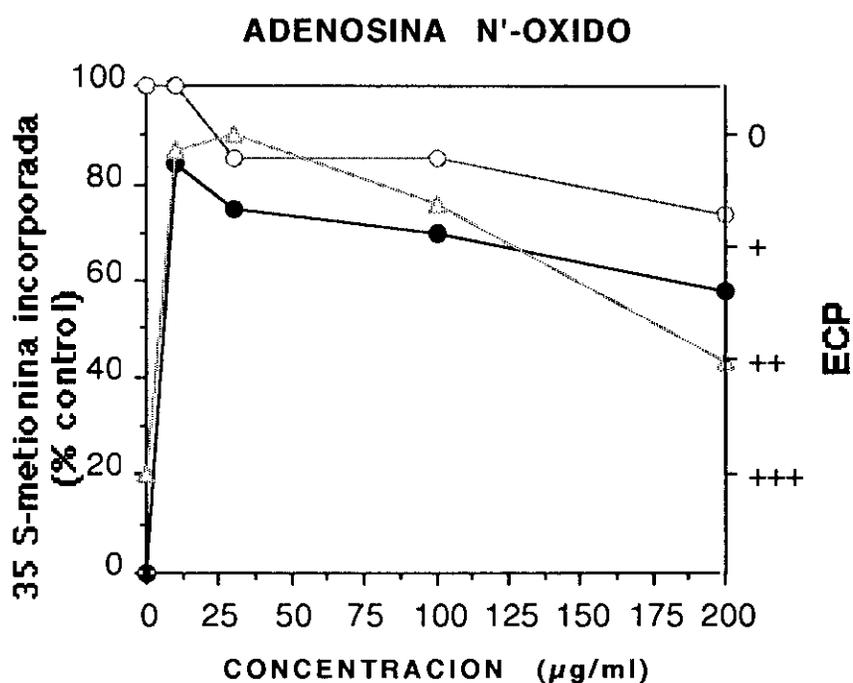


Figura 45. Efecto de la adenosina N'-oxido sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 1, 10, 100 y 200 µg/ml de adenosina N'-oxido incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

El 4' β -vinil-DHCaA induce la incorporación máxima de un 50% de (^{35}S)-metionina en las células infectadas a la concentración de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ la cual se mantiene a mayores concentraciones, la citotoxicidad es baja a concentraciones hasta 5 $\mu\text{g/ml}$ y de un 50% a una dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ aumentando con la dosis del compuesto; el bloqueo de un 50% de los ECPs se produce a la dosis de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ y se mantiene prácticamente sin variar a todas las dosis (Figura 39).

El 4' β -fenil-DHCaA da un máximo de incorporación de (^{35}S)-metionina en células infectadas de un 28% a la concentración de 0,1 $\mu\text{g/ml}$, inferior a la del compuesto anterior y luego se mantiene al aumentar la dosis; la citotoxicidad es menor que la del compuesto anterior pero también es menor la inhibición de los ECPs (Figura 40).

El 4' α -metil DHCaA produce un máximo de incorporación de metionina marcada (30%) a baja concentración (0,1 $\mu\text{g/ml}$) que se mantiene a mayores concentraciones; citotoxicidad nula a todas las concentraciones ensayadas; la inhibición de los ECP es escasa no variando al aumentar la dosis del compuesto (Figura 41).

El 4' β -metil-DHCaA induce la incorporación máxima de metionina marcada en las células infectadas en un 45% a la baja concentración de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ descendiendo ligeramente al aumentar la concentración del compuesto; es medianamente tóxica incorporando un 50% a 10 $\mu\text{g/ml}$; los ECPs disminuyen ligeramente alcanzando el máximo parcial a 10 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 42).

El 4' β -etil-DHCaA produce una incorporación máxima de metionina marcada en las células infectadas de un 35% a la dosis de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ que se mantiene casi invariable a dosis mayores; la citotoxicidad es casi nula a concentraciones de hasta 10 $\mu\text{g/ml}$; los ECPs disminuyen en un 50% a 10 $\mu\text{g/ml}$ y se ven poco afectados por el aumento de la dosis (Figura 43).

La adenosina 2',3'-dialdehído da lugar a la máxima incorporación de metionina marcada en células infectadas (81%) a la dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ que se mantiene a dosis crecientes, la citotoxicidad se mantiene en un 30% de inhibición de incorporación de (^{35}S)-metionina en células sin infectar; y hay una brusca disminución de los ECPs a 5 $\mu\text{g/ml}$ aumentando ligeramente con el aumento de la dosis (Figura 44).

La adenosina N'-óxido produce la máxima incorporación de la metionina marcada en células infectadas (84%) a la dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ descendiendo ligeramente al aumentar la dosis; citotoxicidad baja que alcanza el máximo a 30 $\mu\text{g/ml}$ manteniéndose a concentraciones superiores; y los ECPs se bloquean prácticamente a 30 $\mu\text{g/ml}$ aunque aumentan a más altas concentraciones (Figura 45).

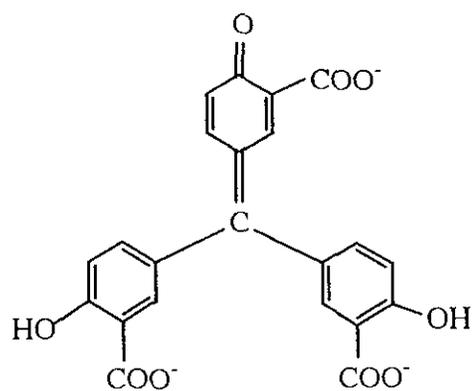
3.5. COMPUESTOS ANIONICOS

Se ha demostrado que la suramina, que es una sustancia aniónica, inhibe la multiplicación del vPPA (Sola y cols. 1986b). Por ello, hemos ampliado el estudio a otros compuestos aniónicos en su capacidad antivírica sobre la adsorción del virus a la célula, ya que en parte es el modo de acción de estos compuestos frente al HIV (De Clercq. 1989a).

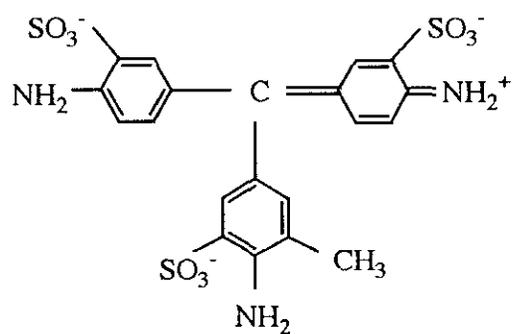
Se han estudiado los siguientes compuestos aniónicos: ácido aurintricarboxílico (ATA), azul de Evans, fucsina ácida, ácido taurolitocólico y ácido glicirrónico, cuyas fórmulas se muestran en la figura 46.

La citotoxicidad se midió según los tres parámetros utilizados con los compuestos anteriormente estudiados. Cuando la citotoxicidad fue evaluada por el método colorimétrico, el azul de Evans presenta un CC_{50} a $200 \mu\text{g/ml}$ seguido por el ATA y ácido taurolitocólico con un CC_{50} de 500 y $600 \mu\text{g/ml}$ respectivamente. La fucsina ácida y el ácido glicirrónico son los menos citotóxicos con un CC_{50} a 2000 y $2500 \mu\text{g/ml}$ respectivamente. La citotoxicidad de todos los compuestos resulta mayor cuando se mide por tinción que cuando se mide por incorporación de (^{35}S)-metionina, exceptuando el ácido taurolitocólico.

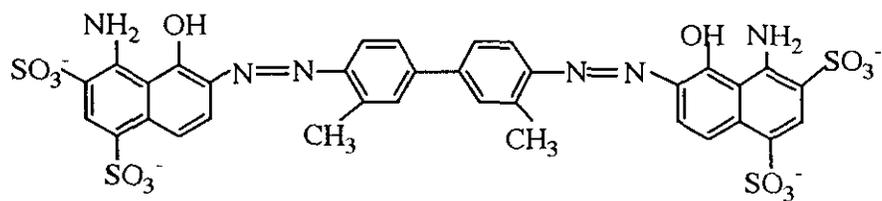
Las inhibiciones de la multiplicación del vPPA con diferentes concentraciones de los compuestos vienen representadas en las figuras 47 y 48. La inhibición mayor la consigue el ATA seguido de azul de Evans y el ácido taurolitocólico y con menor actividad la fucsina ácida y el ácido glicirrónico, gradación que no se corresponde exactamente con el IS al introducir el parámetro CE_{50} .



ACIDO AURINTRICARBOXILICO

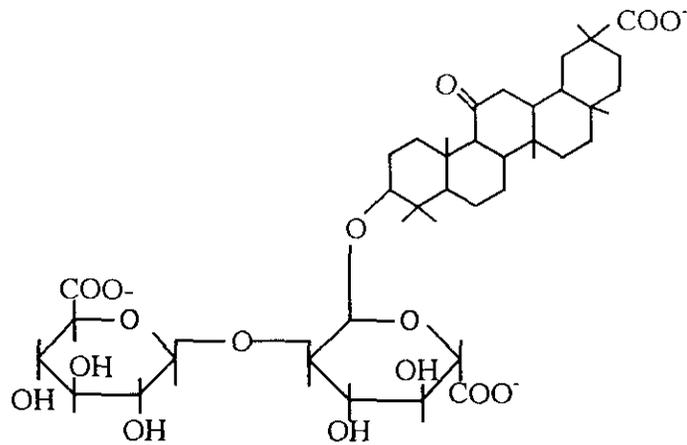


FUCSINA ACIDA

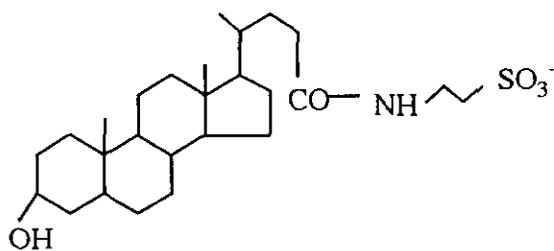


AZUL DE EVANS

Figura. 46. Compuestos aniónicos



ACIDO GLICIRRICO



ACIDO TAUROLITOCOLICO

Figura 46 (continuación). Compuestos aniónicos

TABLA XI. Citotoxicidad (CC_{50}), concentración efectiva antivírica (CE_{50}) e índice selectivo (IS) de los compuestos aniónicos ensayados frente al vPPA en células Vero.

| Compuesto | CC_{50}^a ($\mu\text{g/ml}$) | CE_{50}^b ($\mu\text{g/ml}$) | Índice ^c selectivo |
|---------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| Acido aurintricarboxílico | 500 | 1 | 500 |
| Azul de Evans | 200 | 5 | 40 |
| Fucsina ácida | 2.000 | 100 | 20 |
| Acido taurolitocólico | 600 | 50 | 12 |
| Acido glicirrónico | 2.500 | 500 | 5 |

^a Concentración que produce un 50% de toxicidad en las células, obtenida por el método de tinción.

^b Concentración efectiva antivírica requerida para alcanzar una reducción de un 50% sobre el título de virus.

^c Relación entre CC_{50}/CE_{50} .

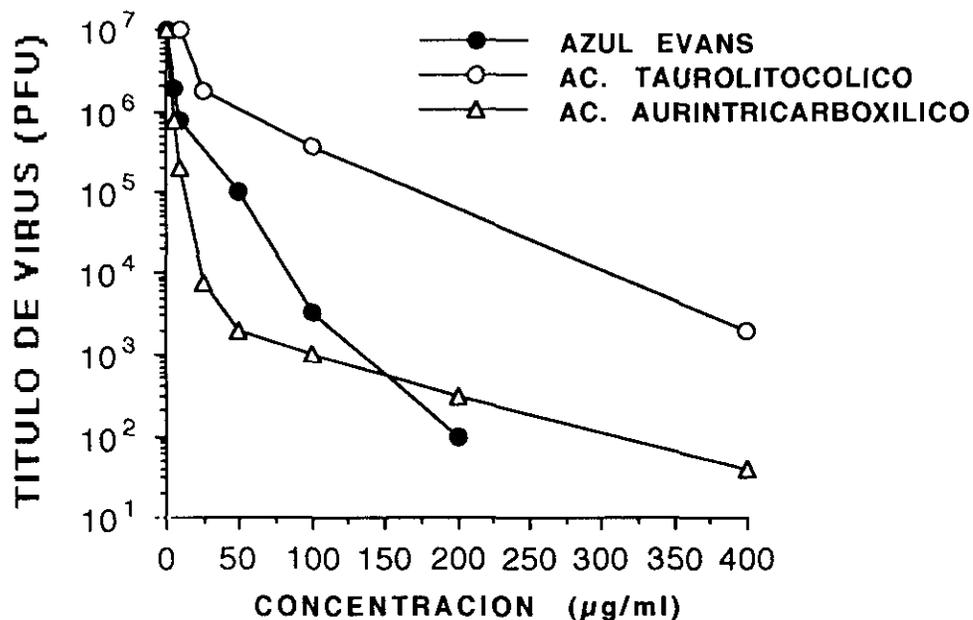


Figura 47. Efecto de diversos compuestos aniónicos indicados en la figura sobre la multiplicación del vPPA en células Vero. Cultivos de células inoculados con el vPPA a una mdi de 0,1 en presencia de 5, 10, 25, 50, 100, 200 y 400 µg/ml de azul de Evans, ácido taurolitocólico y ácido aurintricarboxílico incorporados en el medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. A los 3 días post-infección se realiza la lectura de los resultados. Cada punto representa el valor medio de 3 cultivos.

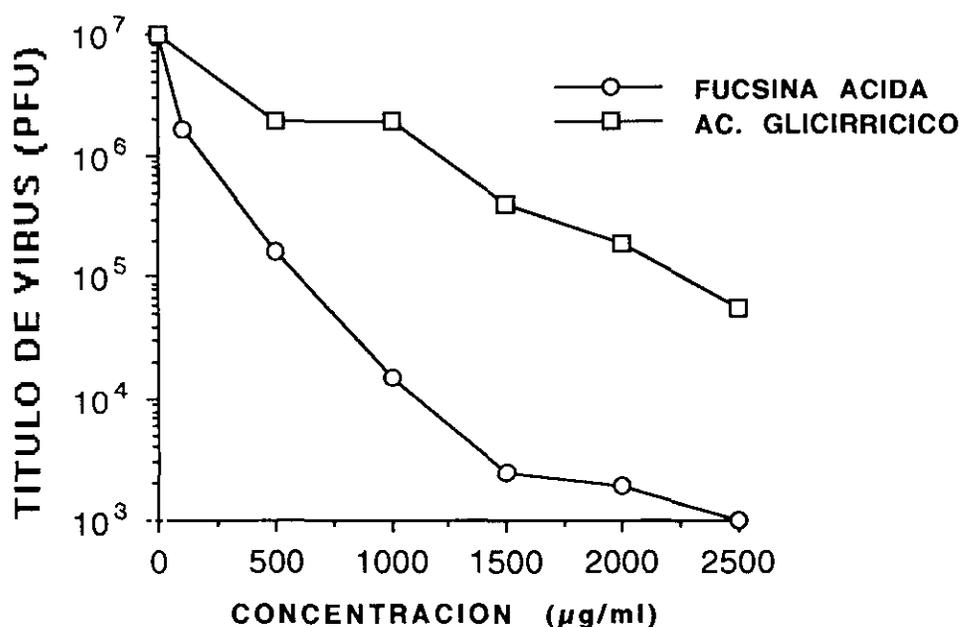


Figura 48. Efecto de diversos compuestos aniónicos indicados en la figura sobre la multiplicación del vPPA en células Vero. Cultivos de células inoculados con el vPPA a una mdi de 0,1 en presencia de 100, 500, 1000, 1500, 2000 y 2500 µg/ml de fucsina ácida y ácido glicirrónico incorporados en el medio de mantenimiento, después del periodo de adosrción. A los 3 días post-infección se realiza la lectura de los resultados. Cada punto representa el valor medio de 3 cultivos.

La concentración antivírica efectiva 50% (CE₅₀), la concentración citotóxica que afecta al 50% de las células (CC₅₀) y el índice selectivo (IS) se exponen en la Tabla XI. Todos los compuestos se añadieron después del periodo de adsorción del virus.

Los índices de selectividad calculados (CC₅₀/CE₅₀) (Tabla XI) (Figuras 47 y 48) indican que ATA puede ser considerado como el inhibidor más específico del vPPA entre las sustancias aniónicas ensayadas, seguido en orden decreciente por azul de Evans, fucsina ácida, ácido taurolitocólico y ácido glicirrónico.

Los resultados obtenidos de inhibición de la síntesis de proteínas en células infectadas y sin infectar por incorporación de (³⁵S)-metionina se comentan a continuación. El ácido aurintricarboxílico induce la máxima incorporación de metionina marcada en células infectadas en un 85% a baja concentración del compuesto (10 µg/ml) y a partir de 100 µg/ml hay una ligera disminución; la citotoxicidad es baja hasta 1 µg/ml y a concentraciones mayores inhibe un 25% la incorporación de (³⁵S)-metionina; los ECPs se bloquean prácticamente a la dosis de 10 µg/ml (Figura 49).

El azul de Evans induce la máxima incorporación de metionina marcada en células infectadas de un 98% a la dosis de 100 µg/ml bajando ligeramente a más altas concentraciones; la citotoxicidad es baja a 100 µg/ml aumentando con la concentración del compuesto; los ECPs quedan bloqueados totalmente a la dosis de 100 µg/ml. (Figura 50).

La fucsina ácida produce la máxima incorporación de metionina marcada en células infectadas a la máxima concentración probada (3.000 µg/ml); citotoxicidad nula hasta dosis de 500 µg/ml aumentando ligeramente.

TABLA XII. Efecto de diferentes compuestos aniónicos sobre la síntesis de proteínas en células Vero infectadas con vPPA, en controles de células no infectadas, y sobre la inhibición de efectos citopáticos sobre células infectadas y tratadas.

| Compuesto | Inhibición 50% de incorporación de ³⁵ S-metionina ^a | | Inhibición 50% de ECP ^b |
|-------------------------|---|----------------------------|------------------------------------|
| | Cel. no infectadas y tratadas | Cel. infectadas y tratadas | Cel. infectadas y tratadas |
| Ac. aurintricarboxílico | >300 | 5 | 10 |
| Azul de Evans | >300 | 50 | 5 |
| Fucsina ácida | >3000 | 700 | 100 |
| Ac. taurolitocólico | 200 | >600 | 75 |
| Ac. glicirrícico | >2000 | >2000 | 1200 |

^a Dosis mínima de compuesto ($\mu\text{g/ml}$) que inhibe la incorporación en un 50% de metionina marcada

^b Dosis mínima de compuesto ($\mu\text{g/ml}$) que inhibe el 50% de ECP

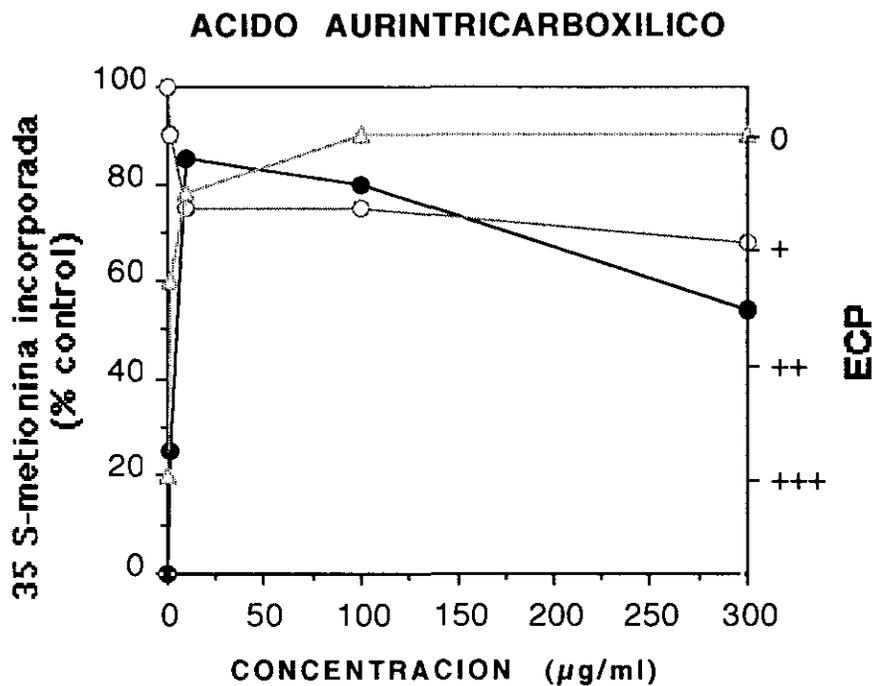


Figura 49. Efecto del ácido aurintricarboxílico sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (○). Cultivos de células inoculados con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 1, 10, 100 y 300 µg/ml de ácido aurintricarboxílico incorporado en medio de mantenimiento, después de la adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

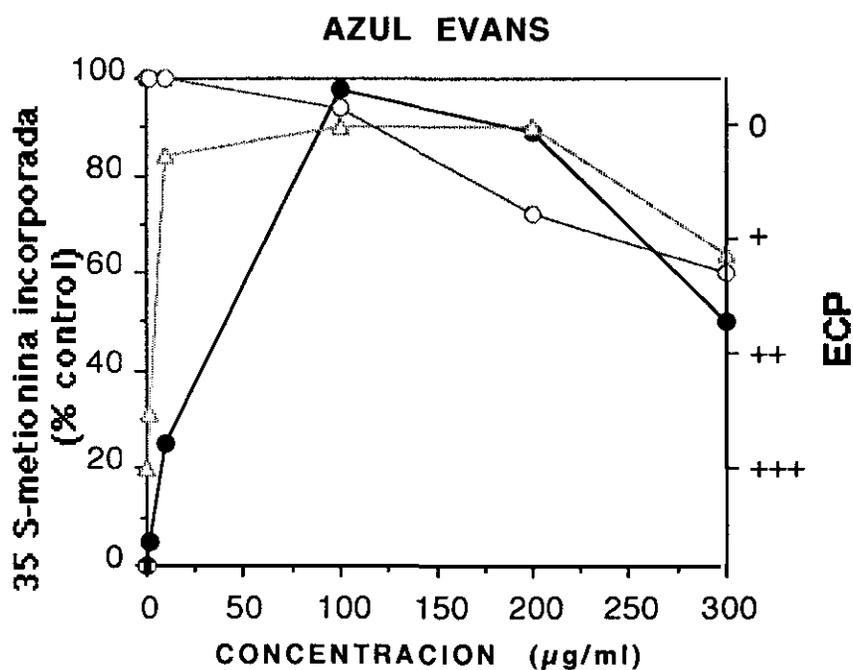


Figura 50. Efecto del azul de Evans sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (○). Cultivos de células inoculadas con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 1, 10, 200 y 300 µg/ml de azul de Evans incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

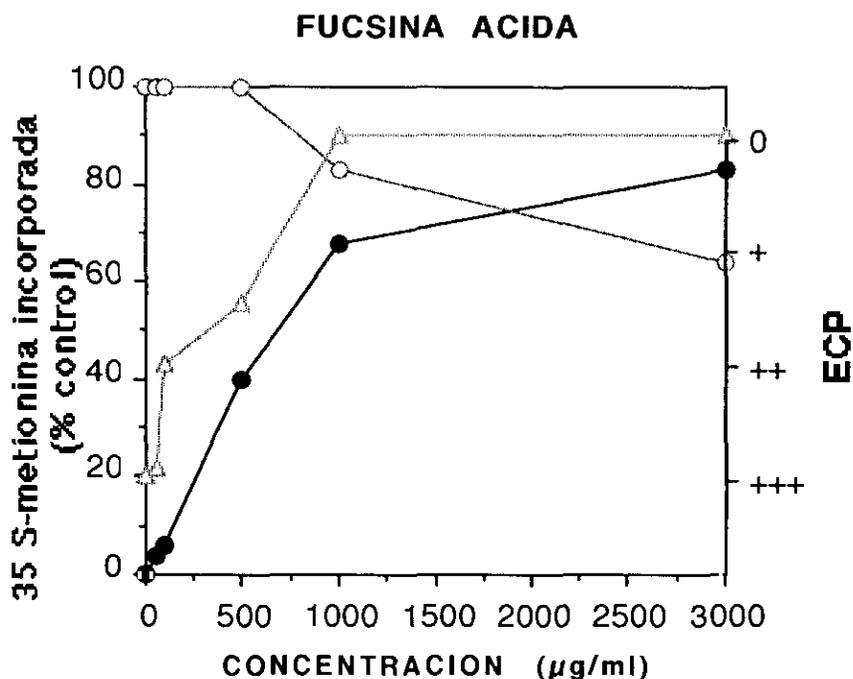


Figura 51. Efecto de la fucsina ácida sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculados con el vPPA a una mdí de 1 en presencia de 50, 100, 500, 1000 y 3000 µg/ml de fucsina ácida incorporada en medio de mantenimiento, después del periodo de adosrción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

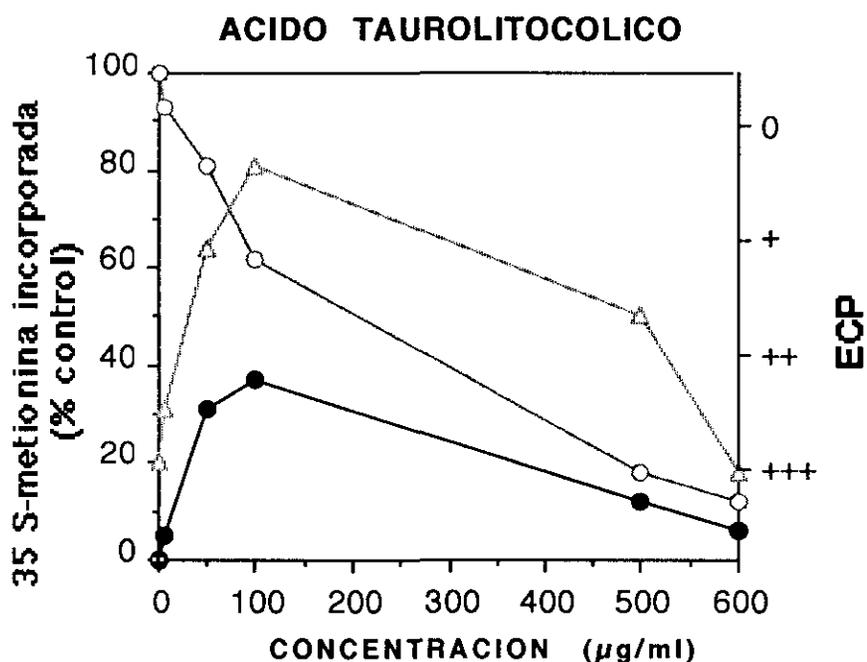


Figura 52. Efecto del ácido taurolitocólico sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculados con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 5, 50, 100, 500 y 600 µg/ml de ácido taurolitocólico incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

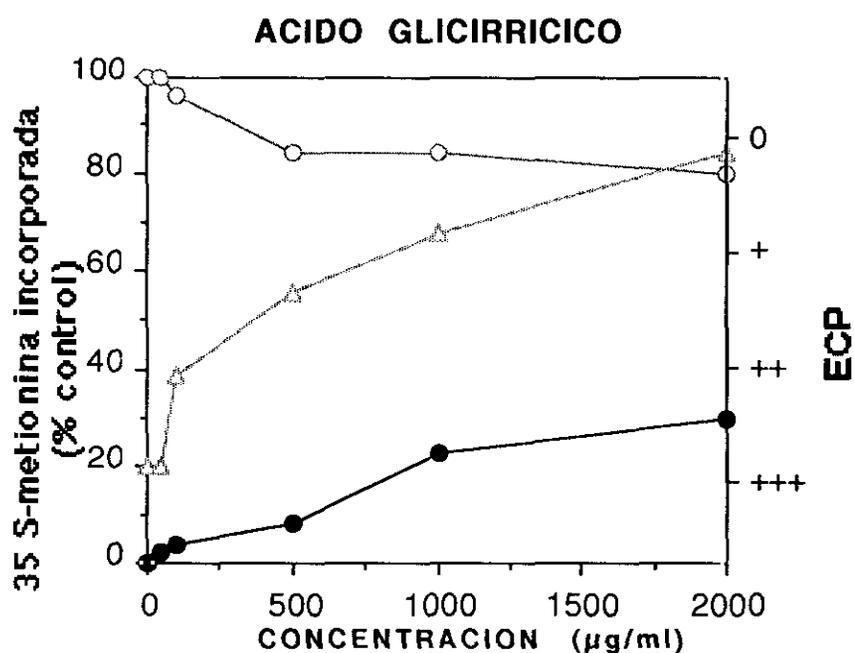


Figura 53. Efecto del ácido glicirrónico sobre la inhibición del ECP en células Vero infectadas con el vPPA (Δ), sobre la síntesis de proteínas en células infectadas y tratadas (●) y en controles de células no infectadas y tratadas (O). Cultivos de células inoculados con el vPPA a una mdi de 1 en presencia de 50, 100, 500, 1000 y 2000 µg/ml de ácido glicirrónico incorporado en medio de mantenimiento, después del periodo de adsorción. Se aplica la técnica ya descrita y se valora el porcentaje de (³⁵S)-metionina incorporada. Los ECPs han sido evaluados por (+++) efecto máximo, (0) sin efecto, (+) y (++) valores intermedios, y fueron registrados a las 48 horas post-infección.

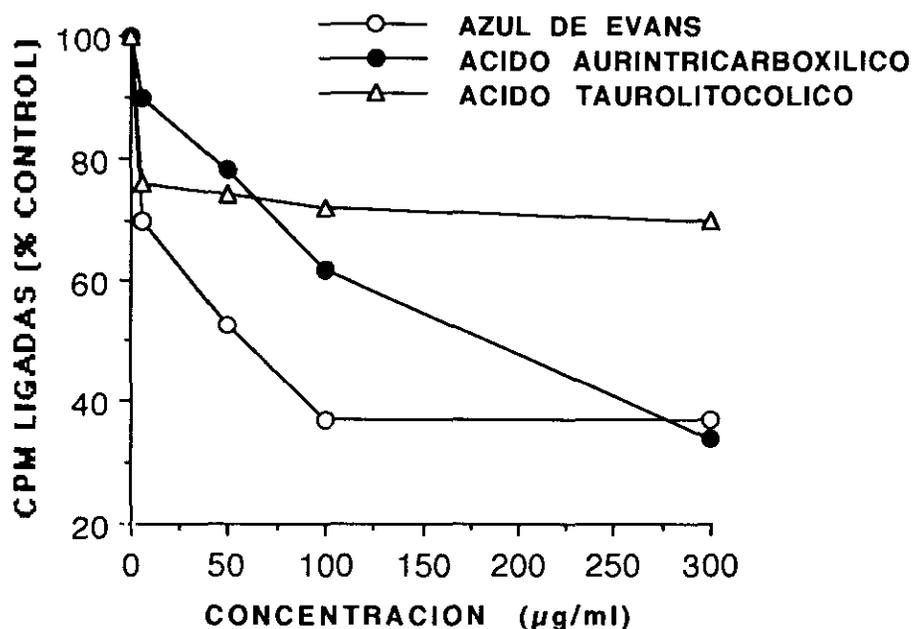


Figura 54. Efecto de los compuestos indicados sobre la adsorción del vPPA cultivado en células Vero, marcado con (^{35}S) -metionina y purificado. Cultivos de células Vero fueron infectados con el virus a una mdi de 2 en presencia de 5, 50, 100 y 300 $\mu\text{g/ml}$ de ácido aurintricarboxílico, ácido taurolitocólico y azul de Evans. Después de 1 hora de adsorción del virus las células se lavaron tres veces con PBS para descartar el virus, no adsorbido. Las células se lisaron con 1% SDS y 1% Tritón X-100. Los lisados se contaron con un espectrofotómetro de centelleo. Cada punto representa el valor medio de dos cultivos.

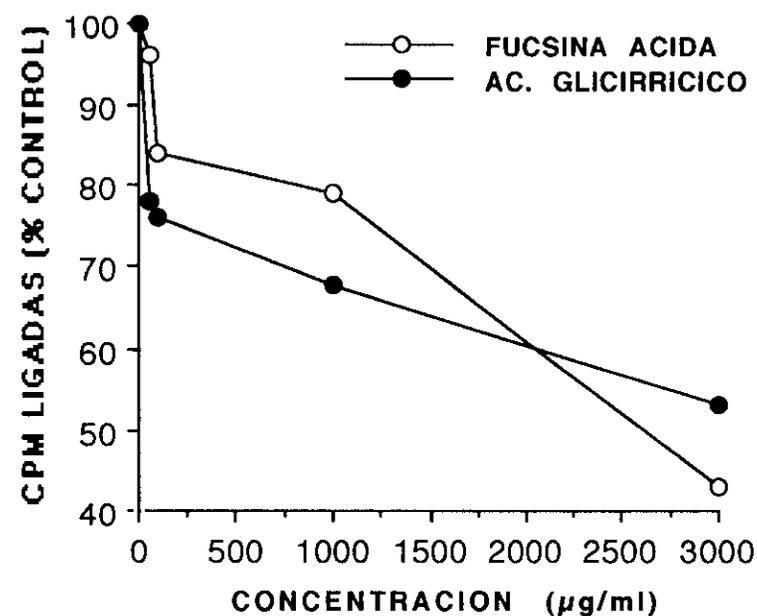


Figura 55. Efecto de los compuestos indicados sobre la adsorción del vPPA cultivado en células Vero, marcado con (^{35}S)-metionina y purificado. Cultivos de células Vero fueron infectados con el virus a una mdi de 2 en presencia de 50, 100, 1000 y 3000 $\mu\text{g/ml}$ de fucsina ácida y ácido glicirrónico. Después de 1 hora de adsorción del virus, las células se lavaron tres veces con PBS para descartar el virus no adsorbido. Las células se lisaron con 1% SDS y 1% Tritón X-100. Los lisados se contaron con un espectrofotómetro de centelleo. Cada punto representa el valor medio de dos cultivos.

después; los ECPs quedan bloqueados totalmente a partir de 1.000 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 51).

El ácido taurolitocólico produce la máxima incorporación de metionina marcada (40%) en las células infectadas a una dosis de 100 $\mu\text{g/ml}$; la citotoxicidad es bastante acusada siendo casi total a la dosis de 600 $\mu\text{g/ml}$; los ECPs disminuyen al máximo a la dosis de 100 $\mu\text{g/ml}$ y a dosis más altas aumenta (Figura 52).

El ácido glicirrónico apenas induce un aumento en la incorporación de metionina marcada en las células infectadas llegando a un máximo del 30% a la dosis de 2.000 $\mu\text{g/ml}$; la citotoxicidad es baja; y los ECPs disminuyen ligeramente según aumenta la concentración de la droga llegando a la inhibición máxima a la dosis de 2.000 $\mu\text{g/ml}$. (Figura 53).

Para conocer más datos sobre el mecanismo de acción, se han realizado experimentos con el vPPA marcado radiactivamente con (^{35}S)-metionina, con el fin de determinar si los compuestos de este grupo inhiben las primeras fases de la infección de la célula por el virus, y en particular sobre la adsorción del virus a la célula, como ha sido observado con otros virus (De Clercq y cols. 1989a). En las figuras 54 y 55 se presentan la inhibición de la adsorción del virus inducida por diferentes concentraciones de los cinco compuestos según lo indicado en Métodos incubando los compuestos con el virus y las células durante 1 hora.

La inhibición más alta de la adsorción del virus (68%) corresponde a 300 $\mu\text{g/ml}$ de ATA. A 5 $\mu\text{g/ml}$ el azul de Evans inhibe un 30% la adsorción del virus y el ácido taurolitocólico un 25% que se mantiene a concentraciones más altas del compuesto. A concentraciones de 3.000 $\mu\text{g/ml}$ de fucsina ácida y ácido glicirrónico producen una inhibición en la adsorción del vPPA en un 50%.

La inhibición de la síntesis de proteínas víricas con los compuestos aniónicos se muestran en un gel de proteínas en el que en el canal A se presenta el control celular y el canal B es el control del virus sin tratar. Los canales C, D y E presentan células tratadas después de la adsorción vírica (1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$). En el canal F se presentan células pretratadas con ATA (100 $\mu\text{g/ml}$) 1 hora antes de la infección vírica. (Figura 56).

Observamos que en el caso del pretratamiento no se observa bloqueo alguno de proteínas víricas. Sin embargo en el caso del tratamiento post-adsorción se observa una gradual desaparición de las proteínas víricas.

A 10 $\mu\text{g/ml}$ vemos una inhibición parcial de las PI 172; 73 y también de PI 16; 16,5 y 12. A 100 $\mu\text{g/ml}$ vemos inhibición casi total de todas las proteínas víricas.

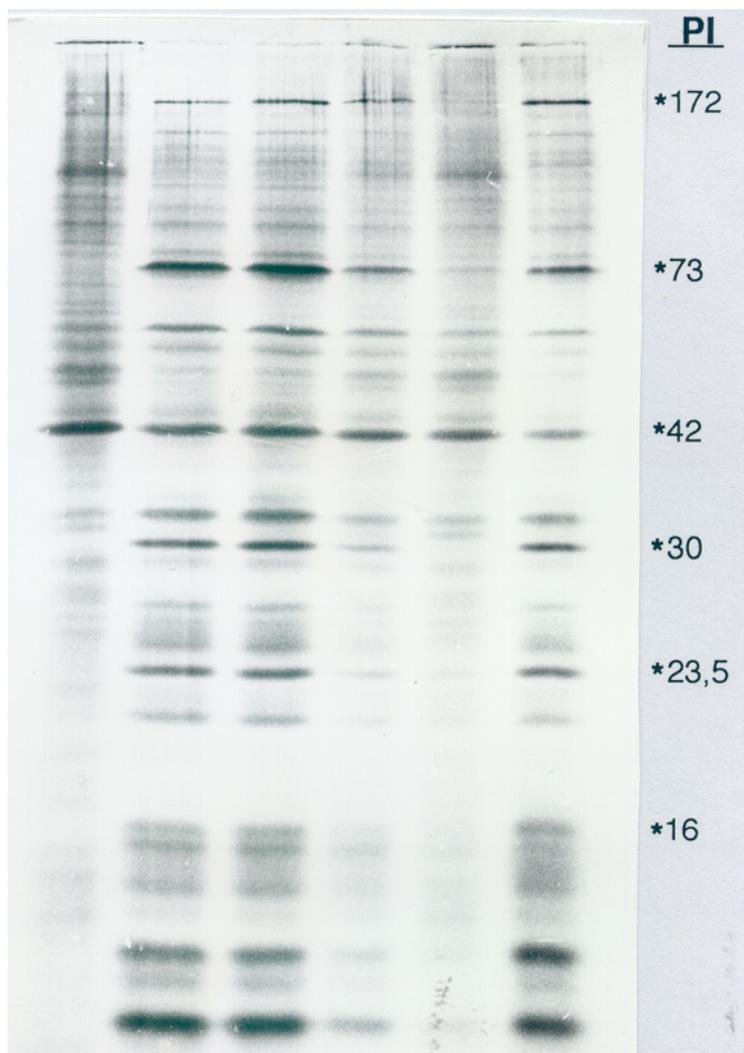


Figura 56. Efecto del tratamiento con el ácido aurintricarboxílico sobre la síntesis de proteínas del vPPA en células Vero. Canal A. Células Vero no infectadas. Canal B. Células Vero infectadas con el vPPA. Canales C, D y E. Células Vero infectadas con el vPPA y tratadas con 1, 10 y 100 µg/ml del compuesto citado, después del periodo de adsorción. Canal F. Tratamiento de las células con 100 µg/ml del compuesto citado, previamente a la inoculación con el vPPA.

4. DISCUSSION

En este trabajo hemos buscado compuestos que inhiban la multiplicación del vPPA, para poder paliar la imposibilidad de la obtención de una vacuna efectiva frente a dicho virus.

La D-penicilamina, análogo de la cisteína, bloquea la multiplicación del virus HTLV-III/LAV asociado al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Chandra y Sarin, 1986), lo que unido a su baja toxicidad, que también estos autores han resaltado, ha abierto un campo de estudio de este tipo de compuestos para los retrovirus.

Nosotros hemos ensayado cuarenta y cuatro derivados de nueva síntesis de la D-penicilamina, incluyendo ésta última, en su posible capacidad inhibidora de la multiplicación del vPPA. Los resultados obtenidos indican que son compuestos de baja citotoxicidad. El índice selectivo más elevado (IS=45) lo presenta la D-penicilamina y ninguno de los nuevos derivados supera a ésta última excepto el RH-370 que casi lo iguala (IS=40).

Por otra parte, la amantadina junto con otras sustancias lisosomotrópicas tales como la cloroquina, dansilcadaverina, metilamina y cloruro amónico, se han descrito como inhibidores de la multiplicación del vPPA (Geraldés y Valdeira. 1985; Alcamí y cols. 1989a), y se han utilizado con el fin de determinar el papel de las vacuolas intracelulares ácidas en la entrada del virus a la célula. Los autores antes citados concluyen que la fase más afectada por estos agentes en la infección de células Vero por el vPPA es la fase de desnudamiento.

Teniendo en cuenta estos datos, hemos ensayado una serie de nueve análogos de amantadina de nueva síntesis, que nos han proporcionado resultados de inhibición positivos en todos los casos con unos datos

moderadamente significativos llegando a valores de IS del orden de 30, debido a la influencia de una baja toxicidad de los compuestos para cultivos de células Vero.

Realizando un estudio comparativo de su capacidad inhibidora y de su estructura química, podemos afirmar que los compuestos de la serie AT presentan mayor IS que los de la serie TM y se sugiere que es debido a la presencia en su radical amino cuaternario de un grupo alcohólico terminal.

Debido a sus IS moderados no hemos considerado oportuno profundizar en el estudio de estos compuestos.

Hemos considerado interesante buscar nuevos compuestos que posean una capacidad inhibidora de la multiplicación del vPPA, en fases tempranas de ésta. La fase inicial de la entrada del vPPA en células Vero se ha estudiado recientemente (Alcamí y cols. 1989a). Se ha descrito la existencia de receptores específicos para el vPPA en la membrana plasmática de células Vero a diferencia de las células L resistentes al virus que no poseen dichos receptores (Alcamí y cols. 1989b). Por nuestra parte hemos realizado experimentos de competición entre vPPA marcado y no marcado radiactivamente durante la adsorción a los lugares de unión saturables utilizando la adsorción de viriones marcados radiactivamente y observamos que la cantidad de virus adsorbido marcado radiactivamente se reduce a la mitad. Haciendo competir el vPPA marcado con (³⁵S)-metionina con virus herpes sin marcar radiactivamente, no se ha visto inhibición en la adsorción del primero a las células. (Resultados no presentados). Esto sugiere que estos lugares de unión son específicos para el vPPA. Este hecho nos impulsó a la búsqueda y ensayo de compuestos que puedan impedir específicamente la adsorción del vPPA a las células.

Entre los compuestos descritos en la literatura como inhibidores de la adsorción del vPPA a las células se encuentra la carragenina iota y suramina (Sola y cols. 1986b). Recientes estudios han mostrado la actividad de diversos polisacáridos contra varios virus entre los cuales se encuentra herpes simple, citomegalovirus, estomatitis vesicular, arenavirus y virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (González y cols. 1987; Andrei y De Clercq. 1990; Baba y cols. 1988a) y particularmente sobre HIV (De Clercq. 1989a; De Clercq 1989b). Por todo ello, creemos resulta interesante la investigación del posible efecto inhibitor de estos polisacáridos sobre la replicación de vPPA.

La carragenina iota inhibe una fase temprana de la multiplicación del virus herpes simple (HSV) (Gonzalez y cols. 1987). En nuestros experimentos con heparina, fucoidina, pentosan polisulfato y dextran sulfato hemos confirmado este hecho para el vPPA, pues estos compuestos inhiben la adsorción del virus a las células. Sin embargo, con las carrageninas lambda y kappa también hemos demostrado que se produce actividad inhibitora de la multiplicación vírica cuando los compuestos se añaden inmediatamente después de finalizar el periodo de adsorción, lo cual indica que estos polisacáridos presentan al menos dos mecanismos de acción diferentes. Debemos destacar que las carrageninas y el pentosan polisulfato son los que muestran la mayor actividad antivírica entre todos los compuestos ensayados, tanto en experimentos de inhibición de adsorción como de reducción del rendimiento en virus.

La heparina y el dextran sulfato que son marcadamente inhibidores del HSV (Vaheri. 1964; Baba y cols. 1988a; Baba y cols. 1988b; Ito y cols. 1987; Ueno y Kuno. 1987; Mitsuya y cols. 1988), tienen poca actividad sobre el vPPA. La carragenina lambda es el compuesto más activo contra el vPPA, inhibiendo la adsorción de virus marcado radiactivamente en un 30% a una

dosis de 5 $\mu\text{g/ml}$, mientras es necesaria la concentración de 3000 $\mu\text{g/ml}$ para una inhibición de un 70% con carragenina kappa. Los polisacáridos polisulfatados inhiben HIV a concentraciones de 0.1 a 1 $\mu\text{g/ml}$ (De Clercq. 1989a; De Clercq. 1989b). A la dosis de 8 $\mu\text{g/ml}$, la heparina bloquea la fijación del HSV al heparan sulfato de la superficie celular que sirve de receptor inicial del virus (WuDunn y Spear. 1989).

Nuestros resultados indican que los polisacáridos sulfatados presentan poca toxicidad para las células e inhiben la adsorción del vPPA. Esto puede ser debido a la interacción con lugares saturables en la superficie de la membrana celular. La inhibición lograda a la mayor concentración (3000 $\mu\text{g/ml}$) puede explicarse por un aumento de la viscosidad del medio que impide el contacto del virus con la superficie celular. La acción antivírica de las carrageninas no solo puede ser atribuida a la inhibición de la adsorción vírica, sino también a cierta acción adicional que sigue a la internalización vírica.

Otra fase fundamental de la multiplicación del vPPA susceptible de inhibición es la replicación del DNA vírico. Los análogos de nucleósidos son compuestos con posible actividad antivírica en la replicación del DNA del virus, debido a su analogía con los nucleósidos naturales. Entre estos análogos se encuentra el (S)-HPMPA, que puede ser adquirido por las células. Por medio de enzimas celulares es fosforilado, y siendo éste último el compuesto activo (Votruba y cols. 1987). (S)-HPMPA es mucho más inhibidor de la síntesis del DNA vírico que de la síntesis del DNA celular, como ha sido demostrado en células Vero y de pulmón embrionario humano (HEL) infectadas con herpes simple tipo 1 (HSV-1) (Votruba y cols. 1987), así como células Raji infectadas con el virus Epstein-Barr (Lin y cols. 1987). En el caso

del vPPA, también se ha confirmado que el (S)-HPMPA inhibe específicamente la síntesis del DNA vírico (Arzuza y cols. 1988).

Por ello se han ensayado una serie de 3-hidroxi-2-fosfonil metoxi propil ('HPMP')-derivados y 2-fosfonil metoxi etil ('PME')-derivados. Podemos afirmar que los ('HPMP')-derivados resultan más efectivos como inhibidores de la multiplicación del vPPA que los ('PME')-derivados. Esto sucede también frente a otros virus tales como vaccinia, adenovirus, citomegalovirus y varicela-zoster (De Clercq y cols. 1987b). Sin embargo los compuestos 'PME' son igualmente activos que los 'HPMP' contra virus herpes simple tipos 1 y 2 y mutantes timidina-quinasa deficientes (TK⁻) (De Clercq y cols. 1987b).

Si comparamos en actividad antivírica y su estructura química, podemos apuntar que los ('HPMP')-derivados presentan mayores IS que los ('PME')-derivados debido a la presencia del grupo (-CH₂OH) en el radical alifático de la molécula. Dentro de los ('HPMP')-derivados, los que poseen un núcleo central de adenosina, presentan mayor IS que los derivados cuyo núcleo es otra base ya sea púrica o pirimidínica. Una afirmación similar se puede hacer con los ('PME')-derivados.

Debido al mayor IS que presentan los análogos de nucleósidos que contienen en su molécula una adenina como base, hemos considerado importante ensayar otra serie de compuestos que son todos ellos análogos de adenosina.

Neplanocin A es uno de estos compuestos que posee un amplio espectro de actividad antivírica. Es activo frente a los virus vaccinia, parainfluenza, sarampión, HSV-1 y HSV-2. Existen datos que sugieren que el efecto antivírico de este compuesto se lleva a cabo mediante la inhibición de la (S)-adenosil homocisteína hidrolasa (SAH hidrolasa) (De Clercq y Cools. 1985). La SAH hidrolasa es una enzima que hidroliza adenosilhomocisteína a

homocisteína y adenosina. A su vez la adenosilhomocisteína es el producto de la desmetilación de la adenosilmetionina y además un inhibidor *feed-back* de la reacción.

Las enzimas que catalizan el paso de adenosilmetionina a adenosilhomocisteína son metiltransferasas que utilizan los radicales metilos obtenidos para metilar en el extremo 5' los RNAs mensajeros y así aumentar la afinidad para la unión con los ribosomas.

Si se inhibe la actividad de la SAH hidrolasa se obtiene una inhibición de las metiltransferasas y por ende una inhibición de la maduración de los RNAs mensajeros. Esta inhibición de la metilación en el extremo 5' de los RNAs mensajeros impide una correcta unión de éstos a los ribosomas y por ello produce una detención de la multiplicación vírica.

Hasobe y cols (1987) han diseñado análogos de Neplanocin A tales como DHCA y DHODA y estudiándolos frente al virus vaccinia determinaron su actividad positiva y que la SAH hidrolasa es el blanco molecular para la actividad antivírica del Neplanocin A y estos análogos.

Por nuestra parte y frente al vPPA, neplanocin A es activo a un nivel moderado que aumenta en los análogos DHCA y DHODA. La sustancia 3-deaza-neplanocin A que presenta una moderada citotoxicidad alcanza un índice selectivo verdaderamente elevado de 3.000, que unido a un CE₅₀ excelente ya que 0,01 µg/ml son capaces de inhibir la multiplicación del virus en un 50%, configuran una capacidad antivírica claramente importante.

Los compuestos 3 y 4, 9-(trans-2'-trans-3'-dihidroxicloptil)adenina y -deazaadenina respectivamente, resultan fuertemente activos, sobre todo el compuesto 4, con un índice selectivo francamente alto de 2.500, con baja toxicidad. El índice selectivo del compuesto 3 resulta inferior que el IS del

compuesto 4, debido a que su concentración antivírica efectiva es a mayor concentración del compuesto.

El grupo de compuestos 4' β y 4' α poseen un índice selectivo bajo salvo en el caso del 4' β -vinil-DHCaA que con una concentración antivírica efectiva muy baja condiciona un IS francamente alto (2.000) que indica alta potencia antivírica.

El compuesto adenosina 2',3'-dialdehído formado por oxidación de adenosina se ha demostrado que es un potente inhibidor de SAH hidrolasa y en consecuencia el dialdehído produce un aumento en los niveles intracelulares de S-adenosil homocisteína y la consiguiente inhibición de metilaciones macromoleculares dependientes de S-adenosil metionina. Es un potente inhibidor del virus vaccinia (Keller y Borchardt, 1987).

De nuestros resultados frente al vPPA, puede deducirse que con una citotoxicidad moderada presenta una concentración antivírica interesante (1 μ g/ml) y un índice selectivo de 400 que es bastante significativo.

La adenosina N'-óxido es también un inhibidor de la SAH hidrolasa (Guranowski y cols, 1981). Ante las células Vero es relativamente poco citotóxico y activo a concentración baja, siendo el IS de un valor de 60, bastante inferior al compuesto anteriormente citado.

Como hemos visto anteriormente, los compuestos en cuya estructura química presentan grupos de naturaleza aniónica, son buenas sustancias antivíricas. En estudios previos se ha demostrado en nuestro laboratorio que la suramina, que es una sustancia aniónica, inhibe la multiplicación del vPPA (Sola y cols. 1986b). Por ello, se ha ampliado el estudio ahora a otros compuestos aniónicos en su capacidad antivírica especialmente sobre la adsorción del virus a la célula, ya que el modo de acción de este tipo de

compuestos contra HIV (De Clercq. 1989a), es en parte mediante la inhibición de la adsorción vírica.

De los cinco compuestos ensayados en este trabajo destacan ATA y azul de Evans como los compuestos más efectivos como inhibidores de la adsorción del vPPA a células Vero. A 5 $\mu\text{g/ml}$ se detecta una inhibición de 10-30% que alcanza 65-70% a 100-300 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. La fucsina ácida y el ácido glicirrónico presentan una inhibición de 50% cuando se ensayan a altas concentraciones de los compuestos como 3.000 $\mu\text{g/ml}$.

La potencia y selectividad de los compuestos citados en primer lugar se consideran más altas que aquellas citadas previamente para la suramina ($\text{CE}_{50} = 25 \mu\text{g/ml}$, $\text{IS} = 18$) (Sola y cols. 1986b).

Todos los compuestos, junto con la acción inhibidora de la adsorción del vPPA, también inhiben la multiplicación vírica cuando se añaden después del periodo de adsorción del virus. ATA y azul de Evans inhiben 5 logs, cuando la reducción del rendimiento de virus se ensaya por el método de formación de placas ya descrito anteriormente. Con referencia al azul de Evans se ha descrito que inhibe la citopatogenicidad del virus linfotrópico tipo III para células T humanas (HTLV-III) y del virus asociado a linfadenopatías (LAV). (Balzarini y cols. 1986).

El ácido glicirrónico inhibe la multiplicación vírica y el efecto citopático de los virus vaccinia, HSV-1, de la enfermedad de Newcastle (Pompei y cols. 1979) y también los efectos citopáticos de HIV con inhibición de la expresión del antígeno específico (Ito y cols. 1989). El mecanismo del efecto inhibitor del ácido glicirrónico sobre HIV es debido en parte a una reducción en la protein-quinasa C que interfiere con la unión virus-célula (Ito y cols. 1989). También se ha encontrado activo el ácido glicirrónico sobre el virus de la

hepatitis A (Crance y cols. 1990) y el virus varicela-zoster (Baba y Shigeta. 1987).

De todos los compuestos aniónicos ensayados la fucsina ácida y el ácido glicirrónico son los menos citotóxicos para las células Vero con una CC₅₀ de 2.000 y 2.500 respectivamente, a cuyas concentraciones la adsorción del vPPA resulta inhibida. La fucsina ácida no interfiere con la adsorción del HIV a 125 μ M, concentración que bloquea completamente la replicación de este virus (Baba y cols. 1988c). Nosotros no hemos detectado efecto tan drástico sobre la replicación del vPPA, pero sí hemos establecido la existencia de la inhibición de la adsorción vírica, cuando se ensaya a alta concentración. Entre todos estos compuestos de este grupo el ATA es el inhibidor de la multiplicación vírica más eficaz. Se han descrito diversos modos de acción para este compuesto tales como, inhibición de la fijación del ácido ribonucleico mensajero a los ribosomas (Grollman y Stewart. 1968); prevención de la iniciación de la síntesis de proteínas (Stewart y cols. 1971; Siegelman y Apirion. 1971; Blumenthal y Launders. 1973; Huang y Grollman. 1972); también ha sido descrito como inhibidor de la DNA polimerasa-RNA dependiente asociada a los virus de la leucemia murina de Rauscher (Liao y cols. 1971); mieloblastosis aviar (Leis y Hurwithz. 1972); y que interfiere con la capacidad de la DNA polimerasa-RNA dependiente de la leucemia murina de Moloney para unirse a la molécula de iniciación del DNA (Givens y Hanly. 1976). El ATA también inhibe la multiplicación de HIV tipo 1 impidiendo la fijación del virus mediante una interacción específica con los receptores celulares CD4 (Schols y cols. 1989). Nosotros hemos observado con vPPA marcado radiactivamente con (³⁵S)-metionina, que el ATA inhibe la adsorción del vPPA pero no tan específicamente como con el HIV.

En los experimentos con el vPPA, el ATA ha mostrado que inhibe diferentes fases de la multiplicación del virus: primeramente la adsorción vírica, y después cuando el compuesto se añade tras el periodo de adsorción. Existe una inhibición total de la citopatogenicidad del virus producida por la acción del ATA, aún cuando es posible detectar virus en el interior de las células en cantidades capaces de producir dichos efectos. Esto sugiere que la última etapa de la multiplicación vírica, en la cual el virus está en contacto con las estructuras de la membrana celular, es el momento cuando se producen los efectos citopáticos.

En efecto, la liberación del vPPA de las células también resulta inhibida. Esta posibilidad ha sido ensayada mediante titulaciones separadas del virus remanente dentro de las células y el liberado al medio. El valor de la relación entre virus intracelular y liberado aumenta cuando el ATA está presente en el medio de cultivo (resultados no presentados).

Son necesarios más experimentos para comprender el mecanismo por el cual el vPPA puede resultar inhibido en su replicación, por el ATA aunque parecen ser inhibidos varios pasos de la multiplicación vírica, como se desprende de los ensayos realizados.

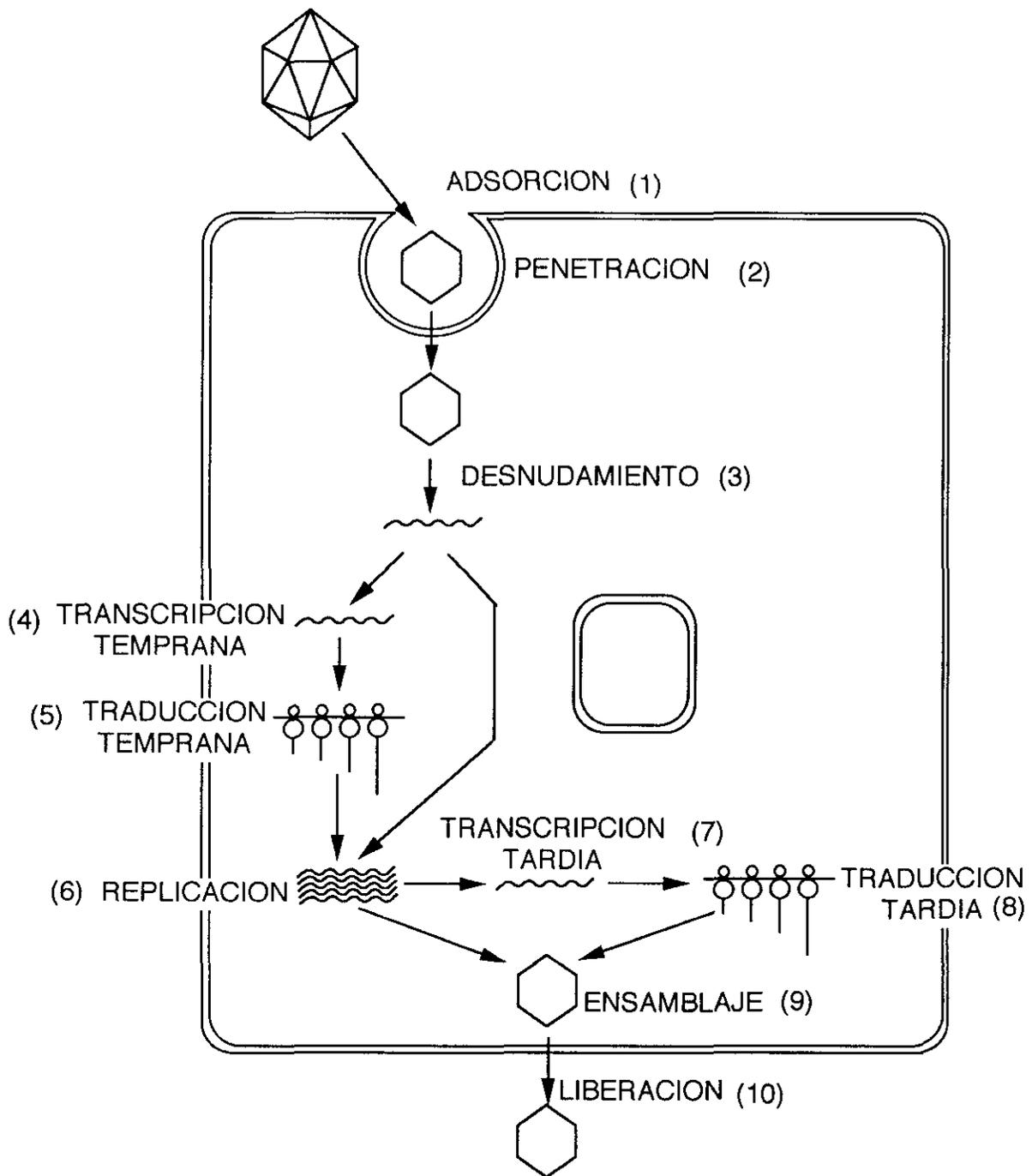
Comparando globalmente los cinco grupos de compuestos que han sido estudiados en este trabajo, los análogos de nucleósidos presentan índices selectivos más altos, y algunos de ellos francamente elevados, resultando superiores los del subgrupo de análogos de adenosina con respecto a los de fosfonilmetoxialquil purinas y -pirimidinas. Frecuentemente la alta actividad antivírica va asociada a elevada toxicidad y uno de los fines más perseguidos es disociar lo más posible estos dos parámetros para la obtención de fármacos muy activos y escasamente tóxicos. Los análogos de adenosina utilizados, frente a otros virus diferentes al vPPA, presentan un mecanismo de

acción que consiste en la interferencia con la transcripción temprana y la implicación en la inhibición de la SAH hidrolasa. Podemos sugerir que frente al vPPA actúan de una forma análoga.

Los compuestos aniónicos han producido resultados esperanzadores ya que se ha llegado a valores de IS de 500, inferiores a los alcanzados en los anteriormente reseñados, pero bastante significativos. Al mismo tiempo la citotoxicidad inducida ha sido escasa, todo lo cual indica que la actividad de estos compuestos es importante. El probable mecanismo de acción es diferente al de los compuestos anteriores y se sugiere pudiese consistir en una interferencia en la penetración del vPPA y también una alteración en la fase de transcripción vírica.

Finalmente el grupo de los polisacáridos cuyo mecanismo de acción es la interferencia con la adsorción del virus a las células, son activos a menor nivel que los anteriores grupos de compuestos pero presentan en el mejor de los casos un IS de 120 moderadamente significativo, y la citotoxicidad es escasa, quizá debido a que no actúan en el interior de la célula de forma importante y ésta resulta menos alterada en su metabolismo.

En la figura 57 se exponen diversos mecanismos de acción sobre el vPPA correspondientes a diferentes compuestos, incluidos los ensayados en este trabajo, especificando las fases afectadas de la multiplicación del virus.



- (1) Polisacáridos sulfatados
Compuestos aniónicos
- (2) Cloroquina, dansilcadaverina, amantadina, CINH4, metilamina
- (4) Ribavirina, (S)-DHPA, (RS)-AHPA, Cc3Ado
Análogos de adenosina*
- (6) Acido fosfonoacético, acido fosfonofórmico, iododeoxiuridina, (S)-HPMPA, PMEA
(Fosfonilmetoxialquilpurinas y fosfonilmetoxialquilpirimidinas)*

Figura 57. Mecanismo de acción de diversos antivíricos frente al vPPA.
Para los indicados con *, se sugiere su modo de acción.

5. RESUMEN

Se han ensayado cinco grupos de compuestos en su acción inhibidora de la multiplicación del vPPA, que son: **derivados de D-penicilamina, análogos de amantadina, polisacáridos sulfatados**, un cuarto grupo subdividido en **derivados de fosfonilmetoxialquilpurinas y pirimidinas**, y **análogos de adenosina** y por último **compuestos aniónicos**.

El primer grupo presenta cuarenta y cuatro **derivados de D-penicilamina** incluyendo ésta última en su capacidad inhibidora de la multiplicación del vPPA. Los resultados obtenidos indican que son compuestos de *baja citotoxicidad*. La D-penicilamina presenta un índice selectivo (IS) de 45. Sin embargo, ninguno de sus derivados de nueva síntesis le superan en efectividad, sólo el compuesto RH-370 alcanza un valor similar, IS= 40. En general se han mostrado *no efectivos*. Con estos resultados no se ha considerado oportuno profundizar más en el estudio de este grupo de compuestos.

El segundo grupo de los **análogos de amantadina** con nueve compuestos muestran *citotoxicidad baja*. *El índice selectivo es moderadamente positivo* con valores comprendidos entre 8 y >30. Los tres compuestos AT con valores de IS superiores a 20 resultan los más activos.

El tercer grupo, con seis **polisacáridos sulfatados: carragenina lambda, carragenina kappa, pentosan polisulfato, fucoidina, dextran sulfato y heparina**, presentan una *citotoxicidad muy baja*. *La carragenina lambda, es la más eficaz* con un IS=120. Le sigue en actividad el pentosan polisulfato con 30, carragenina kappa con 13.3 y fucoidina con 10. El dextran sulfato y la heparina resultan casi inactivos. Los estudios

realizados con viriones marcados radiactivamente con (³⁵S)-metionina, sugieren que *todos los polisacáridos sulfatados inhiben la adsorción del virus a la célula. Las carrageninas lambda y kappa* presentan, además, capacidad inhibidora cuando actúan inmediatamente *después del periodo de adsorción*.

Dentro del cuarto grupo los diversos derivados de **fosfonilmetoxialquil purinas y de fosfonilmetoxialquilpirimidinas** relacionadas con (S)-9-(3-hidroxi-2-fosfonilmetoxipropil) adenina [(S)-HPMPA] y 9-(2-fosfonilmetoxietil) adenina (PMEA) evaluados son *los inhibidores más potentes* de la reducción del título total de virus producido. El fosfonato cíclico de (S)-HPMPA [(S)-HPMPAc] presenta un CE₅₀ de 0.2 µg/ml y un índice selectivo de 2.500; el 2,6-diamino purina análogo de (S)-HPMPA [(S)-HPMPDAP] un CE₅₀ de 0.5 µg/ml y un índice selectivo de 1.400 y los análogos de citosina [(S)-HPMPC] y guanina [(RS)-HPMPG] un CE₅₀ de 1 µg/ml y un índice selectivo de 600-700.

También dentro del cuarto grupo, los quince **análogos de adenosina**, inhibidores de la (S)-adenosil homocisteína hidrolasa (SAH)-hidrolasa, han resultado todos inhibidores de la multiplicación del vPPA : **Neplanocin A, 3-deazaneplanocin A, 6-β'-fluoroaristeromicina, MDL; DHCA, DHCDA, compuesto 3, compuesto 4, adenosina 2',3'-dialdehido, adenosina N'-oxido y los compuestos 4'-sustituidos de DHCaA**. Presentan una *citotoxicidad moderada y son los compuestos más activos a concentraciones muy bajas*. El índice selectivo de estos inhibidores varían de 15 a 3.000. Los mayores índices selectivos corresponden a 3-deazaneplanocin A, seguido de los compuestos 4, 4'β'-vinil-DHCaA y 6β'-fluoroaristeromicina.

El quinto grupo reúne cinco **sustancias aniónicas: azul de Evans, ácido glicirricóico, ácido taurolitocólico, ácido aurintricarboxílico, y**

fucsina ácida. *El ácido aurintricarboxílico resulta el más eficaz con un IS de 500, pudiendo considerarse el inhibidor más potente y específico, dentro de este grupo de compuestos, seguido por el azul de Evans con 40, fucsina ácida con 20, ácido taurolitocólico con 12 y ácido glicirrónico con 5. Todos los compuestos inhiben en algún grado la adsorción del virus a las células, aunque también se ha encontrado inhibición cuando se añaden después del periodo de adsorción lo que indica que está implicado más de un mecanismo de acción en la inhibición de la multiplicación vírica.*

En el análisis de la síntesis de proteínas mediante geles de SDS-poliacrilamida observamos que el pretratamiento con el *ácido aurintricarboxílico* de las células durante 1 hora antes de la infección y a dosis altas (200 $\mu\text{g/ml}$), no inhibe la síntesis de proteínas víricas. Sin embargo el post-tratamiento a *dosis bajas* (10 $\mu\text{g/ml}$) induce *inhibición parcial de la mayoría de las proteínas víricas*, siendo *total a dosis altas* (100 $\mu\text{g/ml}$) en el caso de las de alto peso molecular, y parcial para las de bajo peso molecular.

6. CONCLUSIONES

1.- De los 93 compuestos ensayados como antivíricos frente al vPPA, los análogos de nucleósidos son los más activos, seguidos de los compuestos aniónicos, polisacáridos sulfatados, análogos de amantadina y D-penicilaminas sintéticas.

2.- Los ensayos de adsorción del virus purificado y marcado radiactivamente con (^{35}S)-metionina demuestran que los compuestos aniónicos actúan interfiriendo la adsorción del virus a la célula.

3.- Las grandes concentraciones de compuesto que se necesitan para que sean efectivos los polisacáridos sulfatados nos indica que el mecanismo por el que inhiben la adsorción no está relacionado con receptores específicos celulares.

4.- Entre los polisacáridos, la carragenina λ y κ parecen actuar inhibiendo, además de la adsorción, una fase temprana de la multiplicación vírica.

5.- Entre los fosfonilmetoxialquilpurinas y pirimidinas son más activas las primeras y de entre ellas los cuatro análogos de (S)-HPMPA con índices selectivos comprendidos entre 2.500 y 600. Se sugiere que su mecanismo de acción sea la inhibición de la replicación de DNA vírico como ha sido demostrado para el (S)-HPMPA.

6.- Entre los derivados de adenosina se encuentran los compuestos con índices selectivos más elevados: 3.000 para el 3-deazaneplanocin A, 2.500

para el compuesto 4, 2000 para el 4' β -vinil-DHCaA, 1.250 para el 6- β -fluoroaristeromicina, 666,6 para el compuesto 3 y MDL, 400 para la adenosina 2'3'-dialdehido y 4' β -metil-DHCaA y 66 para el neplanocin A.

7.- Los derivados de adenosina actúan a concentraciones muy bajas, en general por debajo de 1 $\mu\text{g/ml}$. Se sugiere que el mecanismo de acción de estos compuestos sea la inhibición de la (S)-adenosil homocisteína hidrolasa, enzima implicada en la metilación de los RNAs mensajeros víricos, según lo demostrado para dichos compuestos en otros virus DNA.

8.- De los compuestos aniónicos el ácido aurintricarboxílico es el más activo, se ha encontrado que inhibe diferentes pasos de la multiplicación del vPPA: adsorción, una fase temprana de la multiplicación y liberación del virus al medio.

9.- El compuesto más activo a bajas concentraciones frente al vPPA es la 6- β -fluoroaristeromicina con un CE_{50} de 0,008 $\mu\text{g/ml}$. Los menos tóxicos son los polisacáridos sulfatados con un CC_{50} de 3.000 $\mu\text{g/ml}$. Los compuestos que producen mayor inhibición en producción total de virus son el (S)-HPMPAc y (S)-HPMPC con un valor de $>4,5 \log_{10}$.

10.- Se han encontrado cinco compuestos con un IS muy elevado que corresponden al 3-deazaneplanocin A con $\text{IS}=3.000$; (S)-HPMPAc y compuesto 4 con $\text{IS}= 2.500$; 4' β -vinil-DHCaA con $\text{IS}=2.000$ y 6 β -fluoroaristeromicina con $\text{IS}=1.250$.

11.- El hallazgo de compuestos con gran poder inhibitor de la multiplicación del vPPA *in vitro*, como los anteriormente mencionados, hace muy interesante iniciar estudios de experimentación con animales *in vivo* con el fin de confirmar su potencial como antivíricos y abre nuevos horizontes en la lucha contra la peste porcina africana mediante la utilización de la quimioterapia.

7. BIBLIOGRAFIA

Alcamí, A., Carrascosa, A.L. and Viñuela, E. (1989a). The entry of African swine fever virus into Vero cells. *Virology*. **171**, 68-75.

Alcamí, A., Carrascosa, A.L. and Viñuela, E. (1989b). Saturable binding sites mediate the entry of African swine fever virus into Vero cells. *Virology*. **168**, 393-398.

Andrei, G. and De Clercq, E. (1990). Inhibitory effect of selected antiviral compounds on arenavirus replication *in vitro*. *Antiviral Res.* **14**, 287-300.

Arzuza, O., García-Villalón, D., Tabarés, E., Gil-Fernández, C. and De Clercq, E. (1988). Inhibition of African swine fever virus DNA synthesis by (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl) adenine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**, 27-32.

Baba, M. and Shigeta, S. (1987). Antiviral activity of glycyrrhizin against varicella-zoster virus *in vitro*. *Antiviral Res.* **7**, 99-107.

Baba, M., Schols, D., Pauwels, R., Balzarini, S. and De Clercq, E. (1988a). Fuchsin acid selectively inhibits human immunodeficiency virus (HIV) replication *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 1404-1411.

Baba, M., Snoeck, R., Pauwels, R. and De Clercq, E. (1988b). Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus and human immunodeficiency virus. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **32**, 1742-1745.

Baba, M., Pauwels, R., Balzarini, J., Arnout, J., Desmyter, J. and De Clercq, E. (1988c). Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6132-6136.

Balzarini, J., Mitsuya, H., De Clercq, E. and Broder, J. (1986). Aurintricarboxylic acid and Evans blue represent two different classes of anionic compounds which selectively inhibit the cytopathogenicity of human T-cell lymphotropic virus type III lymphadenopathy-associated virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136**, 64-71.

Barros, M.F., Cunha, C.V. and Costa, J.V. (1986). Single-stranded deoxyribonucleic acid nuclease induced by African swine fever virus and associated to the virion. *Virology.* **155**, 183-191.

Blumenthal, T. and Lauders, T.A. (1973). The inhibition of nucleic acid-binding proteins by aurintricarboxylic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**, 680-688.

Breese, S.S. and De Boer, C.J. (1966). Electron microscope observation of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology.* **28**, 420-428.

Breese, S.S. and De Boer, C.J. (1967). Chemical structure of African swine fever virus by electron microscopy. *J. Gen. Virol.* **1**, 251-252.

Carrascosa, A.L., Kuznar, J., Ortín, J. and Viñuela, E. (1978). Structural and non structural proteins of ASFV. *Abstr. 4th Int. Cong. Virol. The Hague.* 546.

Crance, J.M., Biziagos, E., Passagot, J., Cuyck-Grandre, H. van and Deloince, R. (1990). Inhibition of hepatitis A virus replication *in vitro* by antiviral compounds. *J. Med. Virol.* **31**, 155-160.

Chandra, P. and Sarin, P.S. (1986). Selective inhibition of replication of the AIDS-associated virus HTLV-III/LAV by synthetic D-penicillamine. *Arzneim.-Forsch. Drug. Res.* **2**, 184-186.

Dardiri, A.H., Bachrach, H.L. and Heller, E. (1971). Inhibition by rifampin of African swine fever virus replication in tissue culture. *Infect. Immunity.* **4**, 34-36.

De Clercq, E. and Cools, M. (1985). Antiviral potency of adenosine analogues: correlation with inhibition of (S)-adenosyl homocysteine hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **129**, 306-311.

De Clercq, E., Holy, A., Rosenberg, I., Sakuma, T., Balzarini, J. and Maugdal, P.C. (1986). A novel selective broad-spectrum anti-DNA virus agent. *Nature* **323**, 464-467.

De Clercq, E. (1987a). (S)-adenosyl homocysteine hydrolase inhibitors as broad spectrum antiviral agents. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 2567-2575.

De Clercq, E. (1989a). New acquisitions in the development of anti-HIV agents. *Antiviral Res.* **12**, 1-20.

De Clercq, E. (1989b). Activity of sulfated polysaccharides against the human immunodeficiency virus. En H. van der Goot, G. Domány, L. Pallas and H. Timmerman Eds. *Trends in Medicinal Chemistry* **88**, 729-742. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.

De Clercq, E., Sakuma, T., Baba, M., Pauwels, R., Balzarini, J., Rosemberg, I. and Holy, A. (1987b). Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purines and pyrimidines. *Antiviral Res.* **8**, 261-272.

De Tray, O.E. (1963). African swine fever. *Adv. Vet. Sci.* **8**, 299-333.

Enjuanes, L., Carrascosa, A.L., Viñuela, E. (1976). Isolation and properties of the DNA of ASFV. *J. Gen. Virol* **32**, 479-492.

Finter, N.B. (1969). Dye uptake methods for assessing viral cytopathogenicity and their application to interferon assays. *J. Gen. Virol.* **5**, 419-427.

Geraldes, A. and Valdeira, M.L. (1985). Effect of chloroquine on African swine fever virus. *J. Gen. Virol.* **66**, 1145-1148.

Gil Fernández, C., Páez, E., Vilas, P. and García Gancedo, A. (1979). Effect of disodium phosphonoacetate and iododeoxyuridine on

multiplication of African swine fever virus *in vitro*. *Chemotherapy* **25**, 162-169.

Gil Fernández, C., Pérez, S., Vilas, P., Pérez, C. De las Heras, F.G. and García Gancedo, A. (1987a). Antiviral activity of uridine 5'-diphosphate glucose analogues against some enveloped viruses in cell culture. *Antiviral Res.* **8**, 299-310.

Gil Fernández, C. and De Clercq, E. (1987b). Comparative efficacy of broad-spectrum antiviral agents as inhibitors of African swine fever virus replication *in vitro*. *Antiviral Res.* **7**, 151-160.

Gil Fernández, C. and García Villalón, D. (1988). A model virus-cell system to study the persistence of African swine fever virus. *Arch. Virol.* **100**, 161-169.

Givens, J.F. and Manly, K.F. (1976). Inhibition of RNA-directed DNA polymerase by aurintricarboxylic acid. *Nucleic Acid Res.* **3**, 405-415.

González, M.F., Alarcón, B. and Carrasco, L. (1987). Polysaccharides as antiviral agents: Antiviral activity of carrageenan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 1388-1393.

Grollman, A.P. and Stewart, M.L. (1968). Inhibition of the attachment of messenger ribonucleic acid to ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **61**, 719-725.

Guranowski, A., Montgomery, J.A., Cantoni, G.L. and Chiang, P.K. (1981). Adenosine analogues as substrates and inhibitors of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Biochemistry.* **20**, 110-115.

Haag, J., Larenaudie, B. and González, F.R. (1965). Peste porcine africaine. Action de la 5-iodo-2'-desoxyuridine sur la culture de virus *in vitro*. *Bull. Off. Int. Epiz.* **63**, 717-722.

Hasobe, M., McKee, J.G., Borcharding, D.R. and Borchardt, R.T. (1987). 9-(trans-2', trans-3', dihydroxycyclopentyl-4'-enyl) adenine and -3-deazaadenine: Analogs of neplanocin A which retain potent antiviral

activity but exhibit reduced cytotoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 1849-1851.

Herrman, E.C. Jo. (1961). Plaque inhibition test for detection of DNA containing viruses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **107**, 142-145.

Hess, W.R. (1981). African swine fever virus: a reassessment. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* **25**, 36-69.

Hirt, P., Hiller, G. and Wittek, R. (1986). Localization and fine structure of a vaccinia virus gene encoding an envelope antigen. *J. Virol.* **58**, 757-764.

Huang, M.T. and Grollman, A.P. (1972). Effects of aurintricarboxylic acid on ribosomes and the biosynthesis of globin in rabbit reticulocytes. *Mol. Pharmacol.* **8**, 111-127.

Ito, M., Baba, M., Sato, A., Pauwels, R., De Clercq, E. and Shigeta, S. (1987). Inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) *in vitro*. *Antiviral Res.* **7**, 361-367.

Ito, M., Sato, A., Hirabayashi, K., Tanabe, F., Shigeta, S., Baba, M., De Clercq, E., Nakasima, H. and Yamamoto, N. (1989). Mechanism of inhibitory effect of glycyrrhizin on replication of human immunodeficiency virus (HIV). *Antiviral Res.* **10**, 279-288.

Keller, B.T. and Borchardt, R.T. (1987). Adenosine dialdehyde: A potent inhibitor of vaccinia multiplication in mouse L929 cells. *Mol. Microbiol.* **31**, 485-492.

Kuznar, J., Salas, M.L. and Viñuela, E. (1980). DNA-dependent RNA polymerase in African swine fever virus. *Virology.* **101**, 169-175.

Kuznar, J., Salas, M.L. and Viñuela, E. (1981). Nucleoside triphosphate phosphohydrolase activities in African swine fever virus. *Arch. Virol.* **96**, 307-320.

Leis, J.P. and Hurwithz, J. (1972). RNA-dependent DNA polymerase activity of RNA tumor viruses. *J. Virol.* **9**, 130-142.

Liao, L.L., Hortwitz, S.B., Huang, M.T. and Grollman, A.P. (1975). Triphenylmethane dyes as inhibitors of reverse transcriptase, ribonucleic acid polymerase and protein synthesis: Structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* **18**, 117-120.

Lin, J.C., De Clercq, E. and Pagano, J.S. (1987). Novel acyclic adenosine analogs inhibit Epstein-Barr virus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 1431-1437.

Martín Hernández, A.M. y Tabarés, E. (1991). Expression and characterization of the thymidine kinase gene of African swine fever virus. *J. Virol.* **65**, 1046-1052.

Mathews, R.E.F. (1982). Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* **17**, 1-99.

Mitsuya, H., Looney, D.J., Kuno, S., Ueno, R., Wong-Staal, F. and Broder, S. (1988). Dextran-sulfate suppression of viruses in the HIV family. Inhibition of virion binding to CD4⁺ cells. *Science* **240**, 646-649.

Montgomery, R.E. (1921). On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya colony). *J. comp. Path. Ther.* **34**, 159-191.

Montgomery, J.A. (1989). Approaches to antiviral chemotherapy. *Antiviral Res.* **12**, 113-132.

Moreno, M.A., Carrascosa, A.L., Ortín, J. and Viñuela, E. (1978). Inhibition of African swine fever virus replication by phosphonoacetic acid. *J. Gen. Virol.* **93**, 253-258.

Moura Nunes, J.F., Vigarío, J.D. and Terrinha, A.M. (1975). Ultrastructure study of African swine fever virus replication in cultures on swine bone marrow cells. *Arch. Virol.* **49**, 59-66.

Ortín, J. and Viñuela, E. (1977). Requirements of cell nucleus for African swine fever virus replication in Vero cells. *J. Virol.* **21**, 902-905.

Ortín, J., Enjuanes, L. and Viñuela, E. (1979). Cross-links in African swine fever virus DNA. *J. Virol.* **31**, 579-588.

Páez, E., García, F. and Gil-Fernández, C. (1990). Interferon cures cells lytically and persistently infected with African swine fever virus *in vitro*. *Arch. Virol.* **112**, 115-127.

Polatnick, J. and Hess, W. (1970). Altered thymidine kinase activity in culture cells inoculated with African swine fever virus. *Amer. J. Vet. Res.* **31**, 1609-1613.

Polatnick, J. and Hess, W. (1972). Increased deoxyribonucleic acid polymerase activity in African swine fever virus-infected cells. *Arch. ges. Virusforsch.* **38**, 383-385.

Polatnick, J., Pan, I.C, and Grovell, H. (1974). Protein kinase in African swine fever virus. *Arch. ges. Viruforsch.* **44**, 156-159.

Pompei, R., Florc, O., Marccialis, M.A., Pani, A. and Loddo, B. (1971). Glycyrrhizic acid inhibits virus growth and inactivates virus particles. *Nature* **281**, 689-690.

Prusoff, W.H. (1959). Synthesis and biological activities of iodo deoxyuridine, an analog of thymidine. *Biochem. Biophys. Acta.* **32**, 209-250.

Prusoff, W.H. (1967). Recent advances in chemotherapy of viral diseases. *Pharmacol. Rev.* **19**, 209-250.

Prusoff, W.H. and Ward, D.C. (1976). Nucleoside analogue with antiviral activity. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 1233-1239.

Salas, M.L., Kuznar, J. and Viñuela, E. (1981). Polyadenylation, methylation and capping of the RNA synthesized *in vitro* by African swine fever virus. *Virology* **113**, 484-491.

Salas, M.L., Kuznar, J. and Viñuela, E. (1983). Effect of rifamycin derivatives and coumermycin A1 on *in vitro* RNA synthesis by African swine fever virus. Arch. Virol. **77**, 77-80.

Salas, J. and Viñuela, E. (1986). Establishment of a Vero cell line persistently infected with African swine fever virus. J. Virol. **58**, 676-679.

Sanchez Botija, C. (1963). Reservorios del virus de la peste porcina africana. Investigación del virus de la peste porcina africana en los artrópodos mediante la prueba de hemadsorción. Bull. Off. Int. Epiz. **60**, 895-899.

Sánchez Botija, C., McAuslan, B.R., Tabarés, E., Wilkinson, P., Ordás, A., Friedman, A., Solana, A., Ferreira, C., Gonzalvo, F.R., Dalsgaard, C., Marcotegui, M.A., Becker, Y. and Schomai, J. (1977). Studies on African swine fever virus: purification and analysis of virions. Comm. Eur. Comm. EUR. 5620.

Sánchez Botija, C. (1982). Peste porcina africana. Nuevos desarrollos. Rev. Sci. Tech. Of. Int. Epiz. **1**, 991-1021.

Schols, D., Baba, M., Pauwels, R., Desmyter, J. and De Clercq, E. (1989). Specific interaction of aurintricarboxylic acid with the human immunodeficiency virus CD4 cell receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 3322-3326.

Siegelman, F. and Apirion, D. (1971). Aurintricarboxylic acid, a preferential inhibitor of initiation of protein synthesis. J. Bacteriol. **105**, 902-907.

Sola, A., Rodríguez, S., García Gancedo, A., Vilas, P. and Gil Fernández, C. (1986a). Inactivation and inhibition of African swine fever virus by monoolein, monolinolein and γ -linolenyl alcohol. Arch. Virol. **88**, 285-292.

Sola, A., Rodríguez, S., Gil Fernández, C., Alarcón, B., González, M.E. and Carrasco, L. (1986b). New agents active against African swine fever virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**, 284-288.

Stewart, M.L., Grollman, A.P. and Huang, M.T. (1971). Aurintricarboxylic acid: An inhibitor of initiation of protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **68**, 97-101.

Tabarés, E. and Sánchez Botija, C. (1979). Synthesis of DNA in cells infected with African swine fever virus. *Arch. Virol.* **61**, 49-59.

Tabarés, E., Marcotegui, M.A., Fernández, M. and Sánchez Botija, C. (1980). I. Analysis of viral structural proteins and antigenic properties. *Arch. Virol.* **66**, 107-117.

Ueno, R. and Kuno, S. (1977). Dextran sulfate, a potent anti-HIV agent in vitro having synergism with zidovudine. *Lancet* i. 1379.

Vaheri, A. (1964). Heparin and related polyonic substances as virus inhibitors. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.* **171**, 1-89.

Vigario, J.D., Terrinha, A.M. and Moura Nunes, J.F. (1974). Antigenic relationships among strains of African swine fever virus. *Arch. ges. Virusforsch.* **45**, 272-277.

Villinger, F., Genovesi, E.V., Gerstner, D.J., Whyard, T.C. and Knudsen, R.C. (1990). Inhibition of African swine fever virus in cultured swine monocytes by phosphonoacetic acid (PAA) and by phosphonoformic acid (PFA). *Arch. Virol.* **115**, 163-184.

Votruba, J., Bernaerts, R., Sakuma, T., De Clercq, E., Merta, A., Rosemberg, J. and Holy, A. (1987). Intracellular phosphorylation of broad spectrum anti-DNA virus agent (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl) adenine and inhibition of viral DNA synthesis. *Mol. Pharmacol.* **32**, 524-529.

Wardley, R.C., Andrade, C.M., Black, D.N., Castro Portugal, F.L., Enjuanes, L., Hess, W.R., Mebus, C., Ordás, A., Rutili, D.,

Sánchez Vizcaíno, J., Vigarío, J.D., Wilkinson, P.J., Moura Nunes, J.F. and Thompson, G. (1983). African swine fever virus. *Arch. Virol.* **76**, 73-90.

WuDunn, D. and Spear, P.G. (1989). Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* **63**, 52-58.

____oooOOOooo____