



Trabajo Fin de Grado

Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

PRO-NUCLEOTIDOS (PROTIDES) EN LA TERAPIA ANTITUMORAL Y ANTIVIRAL

Beatriz Martínez Molero



Trabajo Fin de Grado

Revisión Bibliográfica

Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Grado en Farmacia

Pro-Nucleótidos (ProTides) en la terapia antitumoral y antiviral

Beatriz Martínez Molero

Tutora: Margarita Luisa Vega Holm

Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica

Sevilla, 9 de junio de 2023

RESUMEN

Los análogos de los nucleósidos han formado parte de la terapéutica antitumoral y antiviral durante años. Pero las limitaciones que presentan tanto a nivel de biodisponibilidad como las resistencias que se crean frente a estos fármacos han supuesto una tendencia creciente en el desarrollo de profármacos que aumenten los niveles de metabolito activo de los análogos de los nucleósidos a nivel intracelular. Dentro de las posibilidades que aparecen en clínica, destacan los ProTides. Esta tecnología se basa en el enmascaramiento de los grupos OH del fosfato de los NA con un grupo arilo y un éster de fosforamidato.

A raíz del descubrimiento de la tecnología ProTide, se han investigado una serie de candidatos y se han aprobado tres fármacos, tenofovir alafenamida como antirretroviral usado para el tratamiento del VHB y el VIH, Sofosbuvir frente al VHC y el más reciente de todos, Remdesivir, un fármaco en estudio frente al Ébola que ha sido aprobado para el tratamiento contra el SARS-CoV-2. Estos fármacos son solo el inicio del estudio de los ProTides, se desarrollan nuevos candidatos como la estampidina y timectacina como agentes anti-VIH, y el GS-6620 contra el VHC, aunque este último no ha progresado en fases más avanzadas.

Siguiendo el ejemplo de los ProTides antivirales, se intenta aplicar esta tecnología para otras patologías importantes como algunos tipos de tumores donde disminuyen los efectos secundarios y vencen resistencias que aparecen con la terapia estándar antitumoral. Destacan NUC-7738 en pacientes con melanomas resistentes, NUC-1031 como alternativa en pacientes resistentes a gemcitabina o NUC-3373 en tumores colorrectales y neoplasias gastrointestinales.

Al tratarse de una tecnología relativamente nueva, se han estudiado como candidatos ante otras patologías virales que aún no tienen otras alternativas como los *Flavivirus* y se observa la importancia del uso de estos ProTides en afecciones cuya terapia es aún desconocida.

En esta revisión bibliográfica se ha descrito como la tecnología ProTide ha supuesto un avance en el tratamiento clínico de enfermedades víricas y tumorales, proporcionando una buena alternativa a la terapia clásica actual y enviando un mensaje esperanzador a la población sobre la posibilidad de tratamiento para enfermedades importantes que no contaban con otras alternativas.

Palabras clave: análogo de nucleósido, antitumorales, antivirales, ProTide, fosforamidato.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 4 |
| 1.1. Virus emergentes y reemergentes..... | 4 |
| 1.2. Virus del Ébola..... | 5 |
| 1.3. Flavivirus..... | 6 |
| 1.4. Coronavirus..... | 6 |
| 1.5. Virus de la inmunodeficiencia humana..... | 7 |
| 1.6. Virus causantes de hepatitis..... | 8 |
| 1.7. Desarrollo de moléculas antivirales..... | 9 |
| 1.8. Cáncer..... | 10 |
| 2. OBJETIVOS..... | 12 |
| 3. METODOLOGÍA..... | 13 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 14 |
| 4.1. Análogos de los nucleósidos..... | 14 |
| 4.1.1. Historia del desarrollo y diseño de los análogos de nucleósidos..... | 16 |
| 4.1.2. Principales problemas de los análogos de los nucleósidos..... | 19 |
| 4.1.3. Soluciones posibles a los problemas en los análogos de los nucleósidos..... | 20 |
| 4.2.1. Etapas del desarrollo de la tecnología ProTide..... | 23 |
| 4.2.2. Metabolismo y diseño de ProTides..... | 26 |
| 4.3. ProTides aprobados por organismos de salud internacionales..... | 27 |
| 4.3.1. Tenofovir alafenamida (GS-7340)..... | 27 |
| 4.3.2. Sofosbuvir (GS-7977)..... | 27 |
| 4.3.3. Remdesivir (GS-5734)..... | 28 |
| 4.4. ProTides en ensayos clínicos..... | 29 |
| 4.5. ProTides en investigación dirigidos a los Flavivirus..... | 33 |
| 4. CONCLUSIONES..... | 35 |
| 5. BIBLIOGRAFÍA..... | 36 |

1.INTRODUCCIÓN

1.1. Virus emergentes y reemergentes

A lo largo de los últimos años, han surgido o resurgido una gran cantidad de virus con potencial epidémico o pandémico (Figura 1), entre ellos el virus del Ébola (EBOV), Síndrome Respiratorio de Medio Oriente (MERS-CoV) o el Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 1 y 2 (SARS y SARS-CoV-2) (Geraghty et al., 2021). Estas infecciones no solo producen un problema de salud a nivel mundial, sino que además tiene efectos sociales, políticos y económicos.

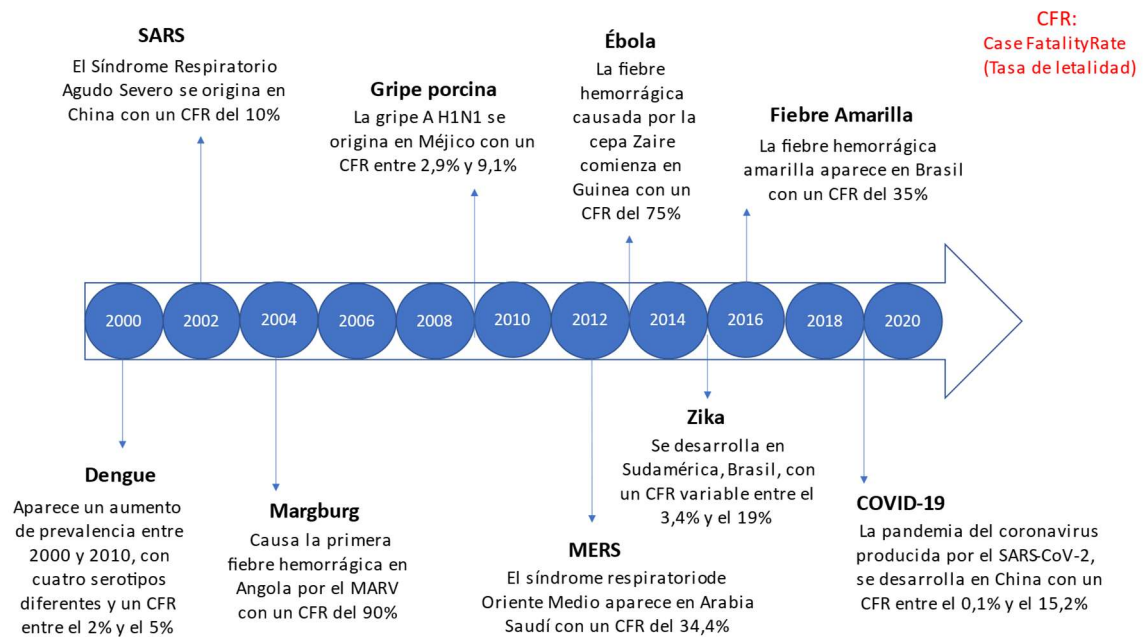


Figura 1. Adaptación de la línea temporal de virus emergentes del siglo XXI (Trovato et al., 2020).

Aparece una constante preocupación por las enfermedades infecciosas ya que últimamente surge una sensación de descontrol frente a estas patologías. Las principales causas son rápida extensión, como por ejemplo en el SARS-Cov-2, las elevadas tasas de letalidad, como por ejemplo el Ébola, y la dificultad en el desarrollo de vacunas y tratamientos que pueden hacerles frente, como por ejemplo el VHC o el VIH. Cuando se revisan las similitudes entre estas enfermedades se llega a la conclusión de que el aumento de los patógenos zoonóticos se relaciona con modificaciones ambientales y con una diferente interacción entre los humanos con la población silvestre (Cunningham et al., 2017).

Algunos factores han contribuido en la aparición y propagación de estos patógenos sobre las poblaciones, entre ellos la globalización, los viajes intercontinentales y el cambio climático. Aparece un aumento en las relaciones entre los humanos y posibles reservorios para estos

patógenos emergentes, además, por el aumento de la esperanza de vida se desarrolla una población más susceptible.

Debido a la aparición de uno de estos últimos grandes virus, el SARS-CoV-2, se busca entre los científicos un nivel de intervención rápido para poder frenar estas infecciones emergentes. El desarrollo de vacunas es la estrategia más eficaz para disminuir la probabilidad de acabar en una epidemia o pandemia, pero cuando aparece un escenario pandémico se necesita una actuación rápida para evitar un progreso que ponga en riesgo la salud de la población. Por ello surge la necesidad de encontrar fármacos que frenen la progresión de estos virus con potencial pandémico (Trovato et al., 2020).

1.2. Virus del Ébola

La enfermedad del Ébola, también conocido como la fiebre hemorrágica es una enfermedad grave letal causada por un virus de ARN de gran importancia África, el virus del Ébola (EBOV) de la familia *Ebolavirus*. El primer brote que apareció fue en el Congo en 1976 y desde entonces ha ido provocando varios brotes hasta la actualidad. Uno de los brotes más importantes de Ébola de la historia ocurre entre el año 2013 y 2016, surge en África occidental, en el sudeste de Guinea. El virus se extendió rápidamente de las zonas rurales a las zonas urbanas por las fronteras y se convierte en una epidemia mundial (Jacob et al., 2020).

El virus se adquiere a través del contacto con animales portadores del virus que suelen ser murciélagos, monos o chimpancés. La transmisión también puede darse por el contacto directo de las mucosas con la sangre, las secreciones o fluidos corporales de pacientes infectados. El paciente sufre una disminución de la respuesta inmune contra la infección por la muerte celular y, además, aparece una sobreestimulación de la vía extrínseca de la coagulación que produce la coagulación de la sangre del paciente o coagulopatía (Baseler et al., 2017).

En cuanto a los síntomas aparecen varias fases, comienzan síntomas inespecíficos como una gripe con fiebres altas o náuseas. La fase clave es la siguiente, donde el paciente sufre los síntomas graves como fiebre persistente o fatiga extrema. En la última se desarrollan problemas epidérmicos, respiratorios y vasculares, se produce la muerte por shock hipovolémico y la insuficiencia multiorgánica (Sivanandy et al., 2022).

Actualmente hay dos vacunas aceptadas contra el Ébola, la rVSV-EBOV aprobada en 2019 por la FDA en mayores de 18 años y es de dosis única, solo protege frente al ebolavirus Zaire que es el que ha causado los grandes brotes mortales. Además, aparece otra vacuna, la Zabdeno/Mvabea aprobada en mayores de 1 año de edad que ofrece protección con una dosis de refuerzo tras la dosis inicial (Tomori y Kolawole, 2021).

1.3. Flavivirus

El género *Flavivirus* forma parte de la familia *Flaviviridae*, son virus de ARN monocatenario que provocan a nivel mundial crisis endémicas y epidémicas graves, ya que tienen la opción de provocar focos en zonas no endémicas. Solo hay vacunas en algunos flavivirus como el virus de la fiebre amarilla o el dengue, pero el problema principal recae en que no hay antivirales dirigidos a este género.

A nivel patológico se clasifican en dos grupos, enfermedades sistémicas que producen hemorragia como el virus del dengue (DENV1-4) y la fiebre amarilla (YFV), y enfermedades que producen alteraciones neurológicas como el virus del Zika (ZIKV) y el virus del Nilo Occidental (WNV). El dengue es endémico en más de 100 países, entre sus complicaciones aparecen la fiebre hemorrágica del dengue o el síndrome por shock del dengue. El Zika es un virus que no se consideraba importante hasta que el 2007 provoca una epidemia, desde ahí se declara como emergencia sanitaria en todo el mundo ya que se relaciona con episodios de enfermedades neurológicas graves. Aparecen unos 4 millones de infectados por el virus del Zika en América en el 2016 y se propaga rápidamente por el sudeste asiático y por África (Chong et al., 2019).

Los virus de este género se transmiten por vectores, los mosquitos, y además se puede adquirir por transmisión vertical por artrópodos, por lo que permanece a largo plazo y puede reaparecer. Al transmitirse por vectores, el aumento de las poblaciones y las migraciones han ayudado a la propagación de estas enfermedades (Van Leur et al, 2021).

1.4. Coronavirus

Los coronavirus (CoV) son un tipo de virus perteneciente a la familia *Coronaviridae*, son virus cuyo material genético se organiza en forma de ARN monocatenario y poseen los genomas de ARN más grandes actualmente conocidos. Estos virus se subdividen en 4 géneros, α -coronavirus, β -coronavirus, γ -coronavirus y δ -coronavirus de los cuales tan solo el género alfa y beta son capaces de infectar a los mamíferos. Se descubren en la época de los 1960 y se pensaba que producían cuadros leves respiratorios.

Con la epidemia producida en 2002 del SARS y un brote que aparece de MERS en 2012 se empezó a cambiar la concepción sobre estos virus, pero no es hasta 2019, con la aparición del SARS-CoV-2, cuando finalmente saltan las alarmas entorno a esta familia (Santoro y Carafolí, 2021).

El SARS-CoV-2 ha causado la mayor pandemia infecciosa del siglo XXI, con más de 100 millones de casos y dos millones de muertes en todo el mundo en febrero de 2021. La mayoría de los

pacientes presentan fiebre, tos, trastornos gastrointestinales, disnea, dolor de cabeza y dolores musculares. Destacan dos síntomas específicos, la anosmia o pérdida del olfato y la ageusia o pérdida del gusto. Las complicaciones clínicas graves aparecen en el 31,5% de los pacientes presentan neumonía bilateral o infiltración pulmonar.

Es una infección que presenta mayor prevalencia en pacientes de elevada edad procedentes de residencias o centros sociosanitarios (Figura 2), siendo el paciente tipo con mayor tasa de mortalidad el que además presenta comorbilidades cardíacas, respiratorias y metabólicas (Vila-Córcoles et al., 2021).

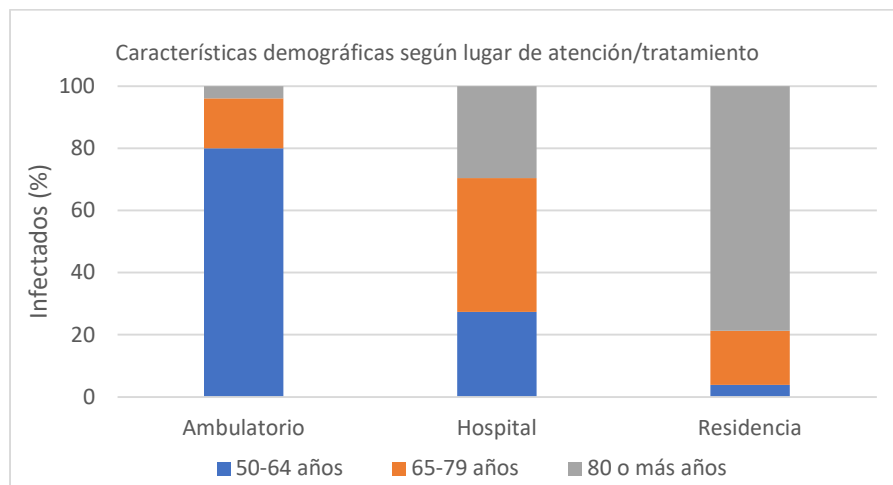


Figura 2. Adaptación de tabla sobre características demográficas y clínicas de 536 casos confirmados de COVID-19 según lugar de atención/tratamiento (ambulatorio/urgencias, hospital, residencia/sociosanitario) en personas ≥ 50 años del área de Tarragona, entre marzo y junio de 2020. (Vila-Córcoles et al., 2021)

1.5. Virus de la inmunodeficiencia humana.

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es una infección letal que afecta al ser humano, a medida que progresa produce el deterioro del sistema inmune, los pacientes se vuelven susceptibles a la aparición de otras infecciones. Por el progresivo deterioro de la inmunidad en el paciente es de vital importancia un diagnóstico temprano.

Es una enfermedad que se transmite principalmente por vía sexual, aunque también puede darse por el contacto con la sangre o fluidos de una persona infectada o por vía vertical de madre a hijo. Aparece un riesgo alto de infección en pacientes drogodependientes al compartir jeringuillas y en las transfusiones de sangre o trasplante de órganos en países no controlado. Pacientes que padecen infecciones de transmisión sexual (ITS) tienen mayor probabilidad de padecer VIH (Morán Arribas et al., 2018).

Debido a la terapia antirretroviral (TAR) se ha producido un cambio en el paciente tipo con infección por VIH, volviéndose una enfermedad con mayor tendencia a la cronicidad. Esto ha

producido un aumento de la esperanza de vida en pacientes infectados lo que favorece a la aparición de otras comorbilidades, tumores o aumento de la fragilidad en los pacientes de edad avanzada (Del Amo y Pérez-Molina, 2018). Según la OMS (Organización mundial de la salud) esta infección causó 1,2 millones de muertes en el año 2014.

1.6. Virus causantes de hepatitis

La hepatitis derivada de un proceso viral es uno de los grandes problemas actuales, la mayoría de las muertes asociadas a hepatitis viral se producen por una infección del virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis C (VHC) pero existen otros virus que causan hepatitis como el virus de la hepatitis A (VHA), el virus de la hepatitis D o delta (VHD) y el virus de la hepatitis E (VHE). Son cinco virus no relacionados biológicamente, pero todos ellos se caracterizan por causar hepatitis viral.

El VHB es un virus cuyo material genético se organiza en forma de doble cadena de ADN con envuelta y pertenece al género de los *Aortohepadnavirus*. Es un virus cuya infección se asocia inversamente proporcional a la edad, produce hepatitis aguda en el 90% de los lactantes. En cuanto a la transmisión, es un virus que solo produce infección en humanos y se puede transmitir por vía sexual, sanguínea o vertical, es decir, de madre a hijo. Según el genotipo que aparece se relaciona con una zona geográfica u otra, por ejemplo, en la cuenca del Mediterráneo predomina el genotipo D (Lanini et al., 2019).

La hepatitis B crónica se caracteriza por brotes espontáneos, no se conocen las razones de la aparición de estos brotes, pero se sospecha que está relacionado con el estado inmune del paciente, por ello se producen con más frecuencia en pacientes sometidos a terapia inmunosupresora o que presentan un estado de inmunosupresión, por ejemplo, en pacientes que presentan una infección por VIH. La prevalencia de ambas infecciones juntas es alta al compartir mecanismos de transmisión, al analizar la coinfección se descubre un aumento del riesgo de enfermedad hepática progresiva que suele desencadenar en un cáncer hepático (Maldonado-Rodríguez et al., 2015). Según la OMS, causa 780.000 muertes cada año y en el 2014 se infectaron unas 240 millones de personas por el VHB (De Clerq y Li, 2016).

El virus de la hepatitis C (VHC) pertenece a la familia *Flaviviridae*, tiene un material genético en forma de ARN. El VHC, al igual que el VHB, se transmite entre humanos por el contacto directo por vía sanguínea o por vía vertical. También destaca el contagio por uso de agujas contaminadas en personas con antecedentes de drogadicción y se observa un mayor riesgo de contagio por relaciones sexuales donde destacan pacientes hombres VIH positivos que practican sexo con otros hombres.

El perfil de paciente con VHC corresponde a adultos jóvenes con antecedentes de drogas por vía intravenosa. Es una enfermedad que se caracteriza porque una vez curada no proporciona una resistencia a la infección, por lo que si un paciente es adicto existe una gran probabilidad de que ocurra una reinfección. Esto ocurre porque la persona que sufre de infección por VHC genera anticuerpos específicos para un genotipo en específico por lo que no les confiere inmunidad plena (Dearborn y Marcotrigiano, 2020). Según la OMS causa unas 500.000 muertes cada año y en 2014 convivían con el virus entre 130 y 150 millones de personas (De Clerq y Li, 2016).

1.7. Desarrollo de moléculas antivirales

El aumento de las enfermedades víricas se debe entre otros factores al crecimiento de las poblaciones a nivel de densidad, los viajes entre continentes que favorecen la dispersión de los virus y el cambio climático (Bricaire y Bossi, 2006).

Para afrontar estas posibles epidemias la comunidad científica se centró en el desarrollo de vacunas específicas para los diferentes virus. Pero el desarrollo de vacunas requiere una gran inversión de tiempo, y aunque en ocasiones excepcionales se ha conseguido un abordaje rápido en el diseño de vacunas, como por ejemplo en la pandemia del COVID-19, en los últimos años ha aparecido una tendencia creciente en el uso de medicamentos aprobados para virus ya conocidos frente a los virus emergentes. Este proceso se conoce como reposicionamiento de fármacos, se prueban fármacos inicialmente creados con otro objetivo para un uso diferente en clínica, es una técnica de creciente interés en los últimos años ya que ha supuesto una disminución de los costes de investigación y un ahorro de tiempo de desarrollo, las moléculas usadas ya se encuentran en el mercado con sus respectivos estudios de seguridad y biodisponibilidad. Consiste en una nueva indicación para un fármaco ya existente aprobado por algún organismo como la FDA (Food and Drug Administration) o la EMA (European Medicines Agency) (Jourdan et al., 2020).

Los antivirales de acción directa (DAA) son moléculas dirigidas a las proteínas del virus, en cambio los antivirales dirigidos al huésped (HDA) se centran en diferentes proteínas del hospedador que el virus utiliza para proliferar. Esta segunda estrategia es muy importante ya que virus de las mismas familias suelen usar el mismo tipo de proteína del huésped para desarrollarse, por ello si se ataca a estas dianas se puede frenar un posible brote epidémico de un virus no conocido (Chitalia y Munawar, 2020).

En cuanto a las estrategias dirigidas al huésped cabe destacar que presentan un amplio rango de objetivos o posibles dianas, tales como inhibición de las cinasas o activación de la respuesta inmune del huésped. Los antivirales de amplio espectro dirigidos al huésped tienen algunos

inconvenientes como la toxicidad que se genera en el organismo hospedador. En cambio, tiene muchos puntos a favor ya que las estructuras a las que se suele dirigir son estructuras conocidas y que a menudo se repiten en los diferentes virus.

Por otro lado, las estrategias dirigidas al virus presentan algunas complejidades como las diferencias estructurales entre los diferentes virus y las secuencias de sus proteínas, esto se convierte en una gran dificultad a la hora de diseñar fármacos de amplio espectro. Una característica que todos los virus tienen en común es que replican su material genético por ARN o ADN polimerasas. Partiendo de esta premisa se desarrollan los análogos de los nucleósidos (Geraghty et al., 2021).

En 2020, los antivirales dirigidos al huésped solo representan un 11% de los antivirales aprobados y la mitad de ellos son productos biológicos (Figura 3). El 89% restante son moléculas pequeñas de acción directa frente a las proteínas del virus.

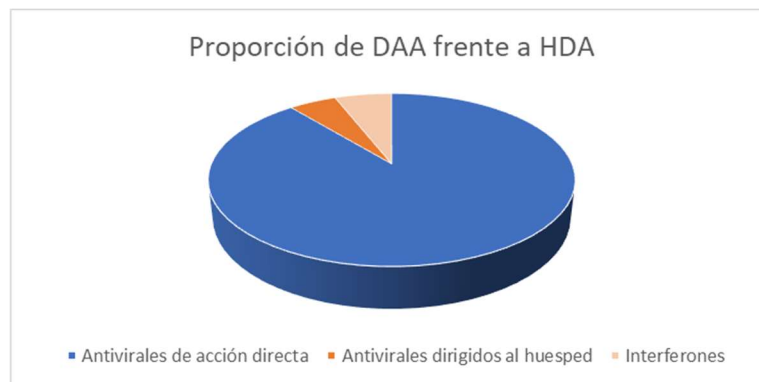


Figura 3. Gráfico adaptado que relaciona la proporción de las moléculas antivirales de acción directa frente a los antivirales dirigidos al huésped, dentro de los cuales se encuentran los interferones (Chitalia y Munawer, 2020).

Por todo ello, existe una tendencia creciente al desarrollo de fármacos antivirales de acción directa dirigidos al virus, entre ellos se destacan los análogos de nucleósidos. Idealmente son fármacos que imitan las estructuras de los nucleósidos naturales, esto les permite ser reconocidos por enzimas virales y actúan sobre el ciclo de replicación de ADN o ARN, compiten con el sustrato natural y modifican la replicación del material genético o producen la terminación la cadena (De Clerq y Neyts, 2009).

1.8. Cáncer

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de las células, que invaden tejidos y órganos adyacentes o se propagan por el organismo a través del sistema circulatorio o linfático. Muchos tumores muestran características epigenéticas desreguladas, aparecen alteraciones genéticas que pueden conducir a reactivación de genes que producen gran parte de los tumores (Cao y Yan, 2020).

Europa, al ser un foco importante de cáncer en el mundo, es una buena representación a nivel estadístico de la incidencia de cáncer mundial. Revela que, en 2020, hay 4 millones de casos nuevos de cáncer y casi 2 millones de muertes relacionadas con esta enfermedad. Los más comunes son el cáncer de mama, colorrectal, de pulmón y de próstata ya que entre ellos representan la mitad de la carga de cáncer en Europa. Aunque el cáncer de mama es el que más casos nuevos presenta en 2020, el cáncer de pulmón tiene mayor número de muertes asociadas seguido del cáncer colorrectal. El cáncer supone más muertes en menores de 65 años que cualquier otra enfermedad en los países que forman parte de la Unión Europea (Dyba et al, 2021).

Durante siglos, su naturaleza y causa eran desconocidas y no existía un tratamiento eficaz. A medida que han pasado los años y la investigación científica, los conocimientos sobre esta enfermedad se han actualizado y se han encontrado avances tanto en el diagnóstico como en el tratamiento. El estilo de vida es un factor fundamental en la prevalencia del cáncer, entre los principales factores que aumentan el riesgo de desarrollar cáncer aparece el consumo de tabaco, una alimentación no saludable, el sedentarismo, el consumo de alcohol o la exposición a ciertas sustancias carcinogénicas como productos químicos, la contaminación en el aire o la exposición al sol. La mayoría de estos factores son modificables, por lo que cambiando el estilo de vida a uno saludable reducimos el riesgo de sufrir esta enfermedad en un futuro (Lewandowska et al., 2019).

Entre las diferentes líneas de tratamiento antitumoral, dentro de la quimioterapia destaca el uso de los análogos de los nucleósidos para el tratamiento de tumores malignos de origen diverso, ya que actúan sobre enzimas presentes en la replicación y traducción del ADN, que en las células tumorales aparecen sobreexpresadas. Entre los fármacos de referencia aparecen la citarabina para el tratamiento de leucemia mieloide aguda o la gemcitabina para el cáncer de pulmón y páncreas. (Muggia et al, 2012)

A continuación, se va a describir la evolución en el desarrollo de estos análogos de los nucleósidos, desde su descubrimiento hasta sus modificaciones principales para mejorar sus características de biodisponibilidad, donde destaca la tecnología Protide, basada en el uso de profármacos de estos análogos de nucleósidos para mejorar su perfil farmacocinético y disminuir los efectos secundarios.

2. OBJETIVOS

1. Reflexionar sobre la preocupación actual acerca de las enfermedades emergentes, tales como brotes infecciosos o procesos tumorales, y la necesidad de terapias novedosas dirigidas específicamente hacia estas patologías.
2. Exponer los análogos de nucleósidos como línea preferente en el tratamiento de algunas enfermedades con gran relevancia actualmente, desde su descubrimiento a su evolución en las últimas décadas.
3. Establecer los problemas principales del uso de fármacos análogos de los nucleósidos para el tratamiento antiviral y antitumoral y buscar posibles soluciones.
4. Estudiar el desarrollo de la tecnología ProTide para favorecer las características farmacocinéticas de los análogos de los nucleósidos.
5. Buscar nuevos fármacos aprobados recientemente o en ensayos clínicos basados en la tecnología ProTide.
6. Valorar el posible uso de esta tecnología aplicada a otras infecciones que hoy en día se están considerando, donde los ProTides se postulan como candidatos a futuros fármacos.

3. METODOLOGÍA

Este trabajo es una revisión bibliográfica de la tecnología ProTide para el desarrollo de nuevos profármacos útiles en el tratamiento de enfermedades tales como virus emergentes con potencial epidémico o algunos tipos de cáncer cuyos tratamientos ya están empezando a presentar resistencias en los pacientes.

La búsqueda de información se ha basado en dos bases de datos científicas principalmente. Para la introducción, al ser de carácter más teórico, se ha usado la base de datos Pubmed, donde se ha introducido los criterios de búsqueda en inglés. Entre los criterios de búsqueda aparecen palabras clave tales como “Emergent viruses XXI”, “Viral diseases”, “Antiviral developement”, “RNA virus”, “DNA virus”, “Antiviral treatment”, “HIV”, “Flaviviruses etiology”, “Potential pandemic viruses”, “Direct acción antiviral”, “Cancer”, “Antitumoral agents”, “Ebola virus disease”, “Types of hepatitis”, “Cancer epidemiology”, “Hepatitis C treatments”, “SARS epidemic”. Para obtener información sobre el SARS-CoV-2 se han usado los filtros predefinidos de la base de datos Pubmed con las categorías de “COVID-19” filtrando por “Etiology and Broad” introduciendo palabras claves tales como “Coronavirus infection”, “Risk factors COVID-19”, “distribution coronavirus”, “COVID prevalence”.

Además, se ha utilizado la herramienta SciFinder para la búsqueda de los resultados ya que permite obtener información específica del área de química, en la cual se han introducido los criterios de búsqueda en inglés como “Antiviral ProTides”, “nucleoside analogs developement”, “clinical ProTides”, “phosphoramidates”, “phosphoramidates essays”, “pronucleotide structure”, “remdesivir treatment”, “sofosbuvir VHC”, “antiviral protides”, “antitumoral protides”.

Uno de los criterios usados en la búsqueda bibliográfica ha sido filtrar desde 2013 hasta la actualidad, aunque algunas de las referencias que se han seleccionado son de fechas anteriores por su relevancia en el campo estudiado.

Todas las moléculas químicas que aparecen en el texto son de elaboración propia desarrolladas a partir del programa ChemDraw.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análogos de los nucleósidos

Un nucleósido es una molécula compuesta por una pentosa, que puede ser ribosa o desoxirribosa, y una base nitrogenada, cuando presentan restos fosfato se conoce como nucleótido (Figura 4). Ambas moléculas presentan un papel fundamental en la replicación y la transcripción de la información genética y es por ello que se han usado durante muchos años en tratamientos antitumorales, antiparasitarios, antibacterianos y antivirales (Yates y Seley-Radtke, 2019).

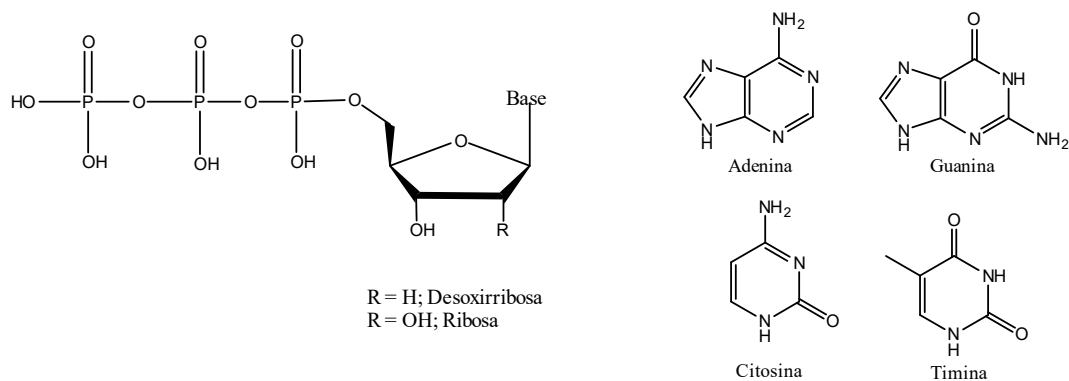


Figura 4. Estructura general de los nucleósidos naturales y sus posibles bases nitrogenadas, basado en "An Introduction to Medicinal Chemistry", (Graham, 2005)

Los análogos de los nucleósidos (NA) son moléculas sintéticas similares a los nucleósidos naturales que se introducen en la clínica para el tratamiento de diferentes enfermedades como el cáncer o infecciones víricas como el virus del herpes simple (VSH), VIH, VHC o VHB. (Mehellou et al., 2018).

Estructuralmente hablando, consisten en una nucleobase derivada de la purina o la pirimidina que se une a un azúcar y en el caso de los análogos de nucleótidos, además está unido un grupo fosfato al azúcar. Al ser una molécula formada por tres grandes bloques diferenciados aparece una gran variabilidad al tener un amplio abanico de modificaciones (Figura 5).

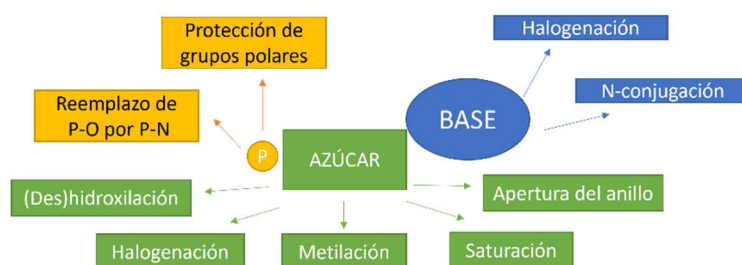


Figura 5. Posibles modificaciones en los NA, elaboración propia basada en (Jordheim et al., 2013)

Al ser análogos de los nucleósidos naturales siguen su mismo metabolismo, entran en el interior de la célula por transportadores de nucleósidos, además de transportadores de péptidos y aniones o cationes orgánicos (Figura 6). En el interior de la célula se fosforilan y forman los derivados trifosfato. En algunos virus las primeras fosforilaciones las hacen enzimas del propio virus como en los herpesvirus donde se realiza por una timidina quinasa del virus, lo que le confiere mayor selectividad. Por último, los nucleótidos ya fosforilados inhiben enzimas o se incorporan al ADN.

Algunas enzimas presentes en el catabolismo son capaces de disminuir la cantidad de metabolito activo, entre ellas se encuentran las desaminasas y las 5'-nucleotidasas, por ejemplo, las enzimas desaminasas escinden el grupo amino de la molécula (Jordheim et al., 2013).

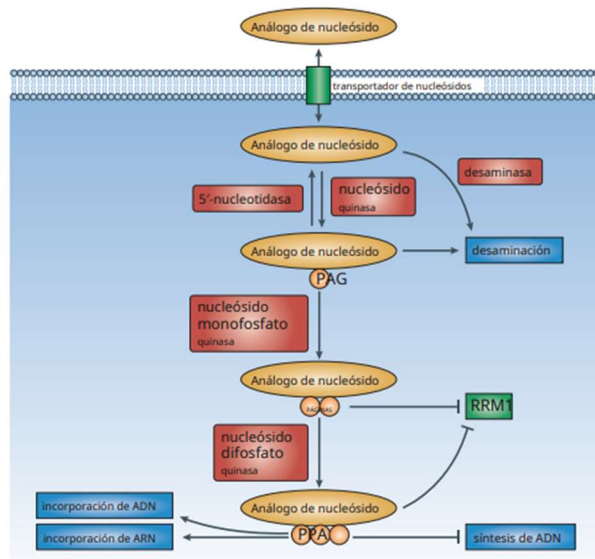


Figura 6. Absorción celular de los análogos de los nucleósidos (Jordheim et al., 2013)

Los análogos de los nucleósidos, además de introducirse en el ADN o ARN, son capaces de inhibir enzimas intracelulares relacionadas con los procesos de división y replicación celular, en la síntesis o reparación del material genético y es por ello que son usados en la terapia antitumoral, inhiben polimerasas humanas y virales, ribonucleótidos reductasas (RRM), la timidilato sintasa o la orotidina-5-monofosfato descarboxilasa (ODCasa).

Esta última enzima tiene una función importante, forma parte del proceso de síntesis de novo de nucleótidos de pirimidina por lo que en las células tumorales aparece sobreexpresada, esto la convierte en una diana muy interesante para el tratamiento antitumoral, en clínica destacan los análogos de UMP (uridina-5-monofosfato) (Slusarsczyk et al, 2018).

4.1.1. Historia del desarrollo y diseño de los análogos de nucleósidos.

En 1959 se descubre la primera molécula antiviral, análogo de la timidina (**1**), la idoxuridina (**2**) la cual se usa principalmente para el tratamiento de queratitis ocular producida por los herpes virus de administración tópica. Es un fármaco de primera generación, poco selectivo y se usa por vía tópica ya que por vía oral presenta efectos secundarios (Figura 7). El aciclovir (**3**) fue el primer análogo de los nucleósidos de segunda generación, actúa frente a la timidina quinasa de los virus sensibles, enzima que convierte al aciclovir en el metabolito activo. Al ser un inhibidor selectivo se usa por vía oral. Este descubrimiento supuso un nuevo enfoque en el tratamiento de las infecciones provocadas por virus (De Clerq y Field, 2006).

En el campo antitumoral, el primer análogo de nucleósido aprobado fue la citarabina (**4**) en el 1969, fue aprobado por la FDA para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda. En el 2013 aparecen 6 análogos aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer ya que se consideran fármacos citotóxicos capaz de reducir la progresión de las células tumorales (Jordheim et al., 2013).

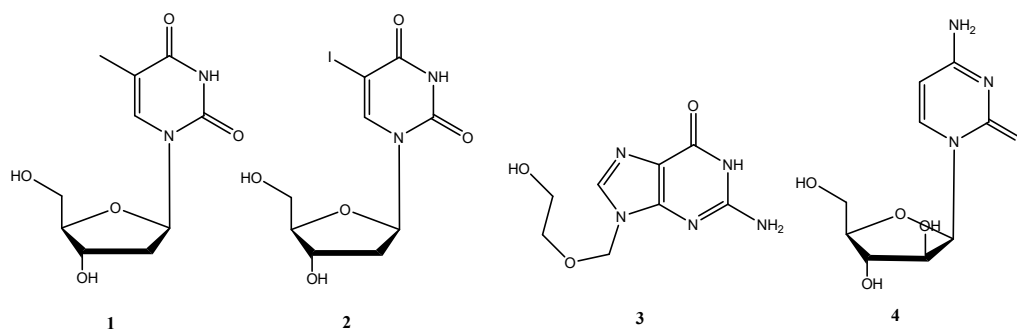


Figura 7. Nucleósidos naturales y sus análogos siendo Timidina (1), Idoxuridina (2), Aciclovir (3) y Citarabina (4).

Siguiendo estos ejemplos, se busca variabilidad de compuestos entre los análogos de nucleósidos haciendo modificaciones en la estructura de los nucleósidos naturales en dos puntos, modificando la nucleobase o modificando el azúcar.

Modificación de la nucleobase, análogos con un fragmento heterocíclico modificado

Partiendo de la idoxiuridina (**2**), al introducir un nitrógeno en el heterociclo tanto en posición 5 como en posición 6 se observa un cambio en la actividad biológica. Las 2' desoxiuridinas 5' sustituidas (**5**) (Figura 8) son activas frente a virus de ADN del herpes simple y la varicela zoster (Pastuch-Gawolek et al., 2019).

Entre los compuestos estudiados destaca la ribavirina (**6**) (Figura 8), es un fármaco de amplio espectro que muestra actividad frente a varios virus de ARN como el VHC, la gripe A o el virus

respiratorio sincitial. Es un isómero de la guanosina (**7**), el único análogo de nucleósido aprobado para el tratamiento de la gripe o virus de la influenza.

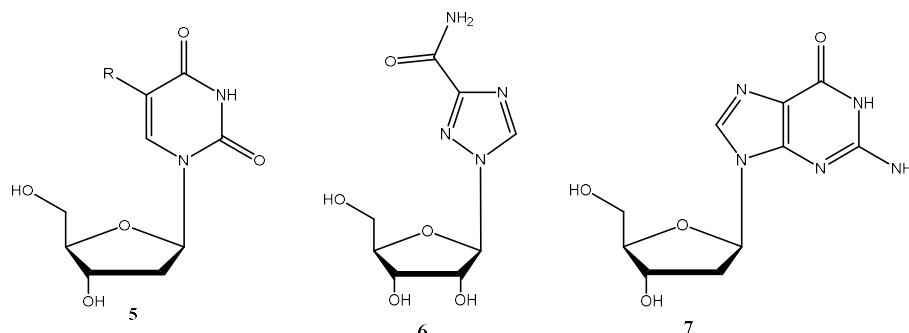


Figura 8. Diseño de análogos de nucleósidos por modificaciones en la nucleobase. 2'-desoxiuridina-5'-sustituidas (5), Ribavirina (6), Guanosina (7)

Modificación en el azúcar

1) Modificaciones en los sustituyentes del carbono 4'.

El primer análogo activo contra el VIH es la zidovudina (**8**), cuya diana es la transcriptasa inversa del VIH. En 2018 se descubre que los análogos 4'-sustituidos son activos frente a virus de ADN como el VHB y frente a virus de ARN como el VIH, propiedad que aparece en los derivados que poseen un grupo azido o un grupo ciano en la posición 4' (Figura 9). Algunos ejemplos son el festinavir (**9**), análogo de la timidina, o el islatravir (**10**), análogo de la adenosina (Mehellou et al., 2018).

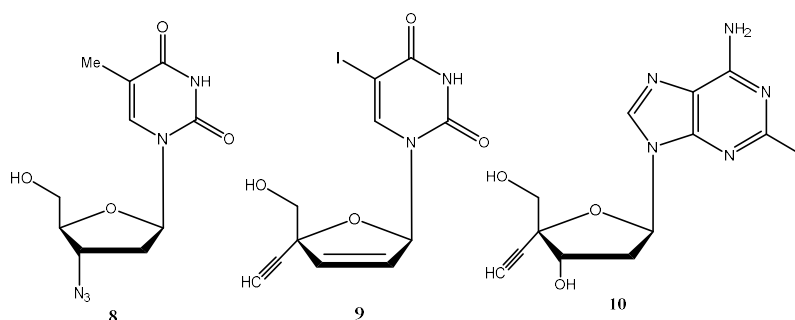


Figura 9. Diseño de análogos por modificaciones en el carbono 4, Zidovudina (8), Festinavir (9) e Islatravir (10)'.

1) Modificaciones en los sustituyentes del carbono 1' y 2'.

La gemcitabina (**11**) o 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina es el análogo con sustituyentes en el carbono 2' más conocido de todos, es un fármaco aprobado frente a muchos tipos de tumores como el cáncer de ovario, páncreas, mama o pulmón, pero estos últimos años se ha observado su capacidad anti-VIH, VHC o virus de la gripe A, (Figura 10) (Kataev y Garifullin, 2021).

2) 2',3'-didesoxinucleósidos

Aquí aparecen los análogos de nucleósidos que inhiben a la transcriptasa inversa del VIH y por tanto se usan en el tratamiento antiviral contra este virus (Figura 10). A este grupo de fármacos se les conoce como inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa (INTI) o fármacos antirretrovirales. Se observa que, a diferencia de otros casos, la actividad anti VIH y anti VHB es mucho mayor cuando se usa el enantiómero L, a partir de ahí se sintetiza la lamivudina (**12**), un L-nucleósido al igual que la emtricitabina (**13**), ambos superaban la actividad antiviral de sus D-enantiómeros (De Clerq y Li, 2016).

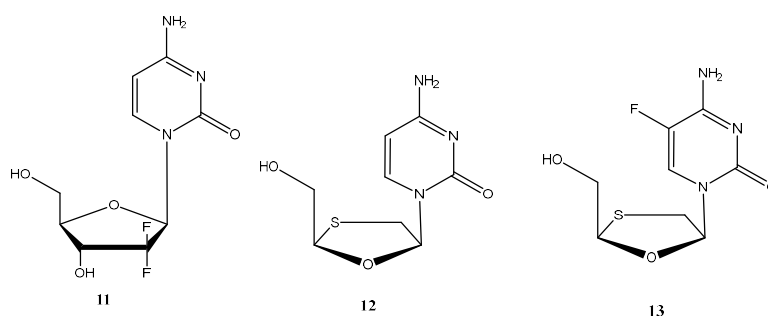


Figura 10. Diseño de análogos por modificaciones en el carbono 2', Gemcitabina (**11**).
Diseño de análogos con actividad anti-VIH Lamivudina (**12**) y Emtricitabina (**13**).

3) Análogos carbocíclicos

Los análogos carbocíclicos (Figura 11) son moléculas más lipófilas y permeables, además presentan un enlace glucosídico que no es inestable, por lo que no se puede romper por las glucosido hidrolasas y aumenta su vida media en el organismo.

Abacavir (**14**) es un análogo carbocíclico de la adenosina, es un análogo del carbovir (**15**) aprobado por la FDA frente al VIH ya que inhiben la transcriptasa inversa del virus. Entecavir (**16**) es un análogo de la 2'-desoxiguanosina donde aparece un doble enlace exocíclico en vez del oxígeno en la ribofuranosa. Este doble enlace le proporciona una gran actividad anti VHB debido a que se une al bolsillo hidrófobo de la ADN polimerasa del virus de la hepatitis B (Seley-Radtke y Yates, 2018).

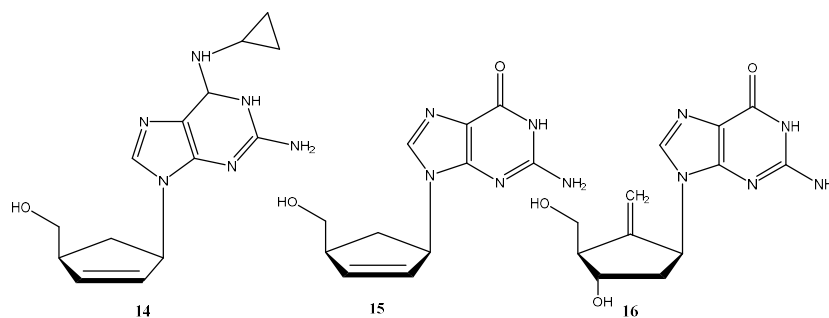


Figura 11. Diseño de análogos basado en derivados carbocíclicos Abacavir (14), Carbociclovir (15) y Entecavir (16).

4.1.2. Principales problemas de los análogos de los nucleósidos

A partir del descubrimiento de la idoxuridina (**2**) en 1959, se siguió investigando sobre los análogos de los nucleósidos como antivirales, moléculas muy interesantes pero que presentan el mismo problema principal, son estructuralmente diferentes a los nucleósidos naturales, esto se traduce en que todos necesitan una fosforilación previa por quinasas celulares. Al tener una estructura diferente a los nucleósidos naturales esta fosforilación no siempre resulta efectiva, no se forma el metabolito trifosfato y por tanto el fármaco no es activo (Mehellou et al., 2018).

La especie finalmente activa es la trifosforilada, se observa que la mayoría de estos análogos de nucleósidos son inactivos debido a que la primera fosforilación no se realizaba tal y como se esperaba, por lo que lo consideran un paso limitante y se comienzan a probar los análogos monofosfatados (Alanazi et al., 2018).

Otro de los problemas principales era que los análogos de los nucleósidos suelen presentar baja biodisponibilidad oral ya que suelen ser moléculas muy polares y esto dificulta su absorción a nivel intestinal. Siguiendo con el ejemplo del aciclovir (**3**), requiere unas dosis muy altas y una administración continuada para mantener las concentraciones necesarias para que se produzca la inhibición del virus. El único problema que presenta no es solo su baja biodisponibilidad tras su administración oral, sino que además es un fármaco poco soluble en agua (De Clerq y Field, 2006).

Por todo ello, los análogos de los nucleósidos siempre han sido moléculas muy interesantes en clínica, pero con una baja farmacocinética. Debido a la baja fosforilación que estos análogos sufrían, se pensó en administrar los nucleósidos ya fosforilados. Pero los análogos monofosfato tenían dos problemas principales, poca estabilidad in vivo por la desfosforilación en la circulación sanguínea y una dificultad en la entrada al interior de la célula, esto hace imposible su administración por vía oral.

4.1.3. Soluciones posibles a los problemas en los análogos de los nucleósidos

Para que se produzca la actividad farmacológica es importante la fosforilación de los nucleósidos antivirales y antitumorales para formar sus derivados activos di- y trifosforilados. Sufren varias fosforilaciones hasta conseguir el derivado activo, pero la primera fosforilación que sufre el análogo por las quinasas celulares se conoce como el paso limitante, donde se pasa del nucleósido a su derivado 5'-O-monofosfato.

Para superar este paso se buscan formas de administrar los derivados 5'-O-monofosfato directamente en la célula, como el grupo monofosfato es un grupo muy susceptible a una hidrólisis rápida mediada por fosfatasa entre el fósforo y el oxígeno, se cambia el grupo monofosfato por un grupo monofosfonato (Figura 12), donde se reemplaza el oxígeno por un CH₂ mediante una modificación isostérica de Grimm para aumentar su estabilidad (Mehellou et al., 2018).

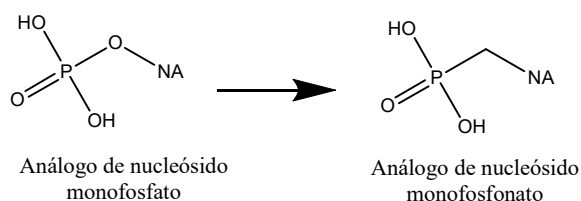


Figura 12. Estructura análogo de nucleósido monofosfato y monofosfonato, NA: análogo de nucleósido

Se observa una mejora de la estabilidad *in situ*, por lo que la vida media de los monofosfonatos aumenta respecto a los monofosfatos (Figura 13), esta estrategia se sigue para algunos antivirales actualmente aceptados como cidofovir (**17**) para el citomegalovirus, adefovir (**18**) para el VHB y tenofovir (**19**) para el VIH (Figura 13).

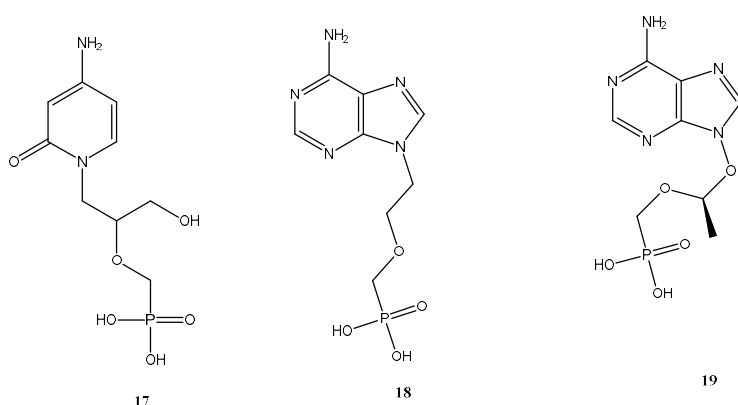


Figura 13. Primeros análogos monofosfonatos, Cidofovir (**17**), Adefovir (**18**) y Tenofovir (**19**)

Solucionado el problema de la inestabilidad metabólica entre el grupo fosfato y el azúcar, había que abordar la escasa absorción celular debido a la ionización del grupo fosfonato a pH fisiológico. La mayoría de estrategias se centran en el bloqueo de uno o dos oxígenos del grupo

monofosfonato para aumentar la lipofilia de la molécula creando profármacos, si se aumenta la lipofilia se facilita la difusión del fármaco por la membrana celular consiguiendo unos niveles mayores de fármaco intracelular y, por tanto, un aumento de la concentración de la molécula activa en la diana (Wagner et al., 2000).

Los pronucleótidos son análogos donde se enmascara la parte del fosfato con diferentes modificaciones químicas para mejorar las características farmacocinéticas, así aumenta la hidrofobicidad y favorece la entrada del fármaco a la célula. Sus características varían dependiendo del tipo de análogo de nucleósido y de la parte que se añade para formar el profármaco, pueden estar unidos por un enlace P-O (fosfoéster) o por un enlace P-N (fosforamidato).

Los fosfodiésteres son fármacos mono o disustituídos por grupos S-acil-2-tioetilo (SATE) unido al fosfato formando un profármaco (**20**, Figura 14). En la célula se hidroliza el resto SATE por esterasas y se libera el nucleósido monofosfato.

Los HepDirect (Estructura general **A**, Figura 14) son un tipo de pronucleótidos fosfato o fosfonato cuya misión principal es aumentar la cantidad de fármaco que llega al hígado, son ésteres de 1,3-propanol cíclicos con un anillo (un grupo arilo), esto les hace sensibles al metabolismo por una isoenzima del citocromo P450 que aparece específicamente en el hígado, se produce la apertura del anillo y posterior liberación del fosfato o fosfonato.

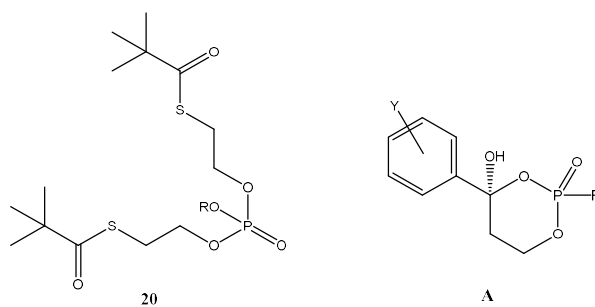


Figura 14. Profármacos de los análogos de los nucleósidos fosfodiésteres de SATE (**20**), HepDirect (**A**).

Los fosforamidatos y fosforodiamidatos son pronucleótidos donde la unión entre el P-O (fosfoéster que se libera por esterasas) se cambia por una unión P-N (fosforamidato que se libera por fosforamididasas). Cuando además presenta unido un grupo aromático por unión arilo se habla de tecnología ProTide (Jordheim et al., 2013).

Gracias a esta última tecnología, la de diseño de fármacos antivirales en forma de ProTides, se descubren dos de los profármacos antivirales más importantes en la actualidad (Figura 15), tenofovir alafenamida (**21**) y el sofosbuvir (**22**) (Mehellow et al., 2018).

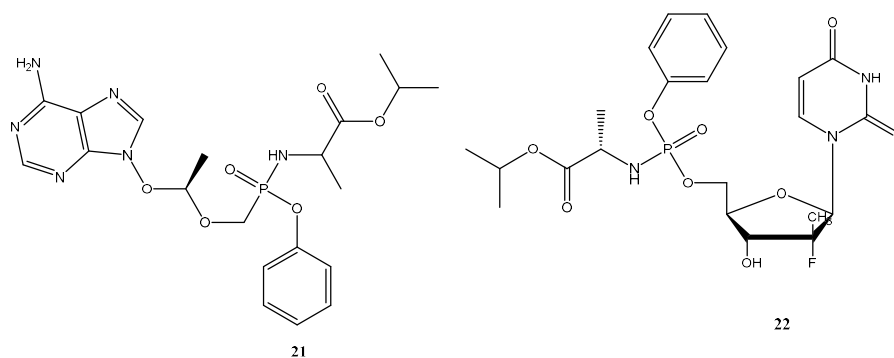


Figura 15. Estructuras de los nuevos ProTides aceptados por la FDA, Tenofovir alafenamida (21) y Sofosbuvir (22)

4.2. Tecnología ProTide

Para favorecer la administración de los grupos 5'-O-monofosfato y monofosfonato se piensa en el uso de profármacos que liberen los análogos con los grupos fosfato y fosfonato en el interior de la célula.

Partiendo de esta premisa se desarrolla la tecnología ProTide (Prodrug nucleoTide), la cual nace en el 1990 por McGuigan y consiste en el uso de profármacos para favorecer la administración intracelular de los derivados 5'-o-monofosfato y monofosfonato y mejorar la biodisponibilidad de estas moléculas antivirales, eludiendo la primera fosforilación de los nucleósidos que supone un paso limitante. Se basa en la protección de los grupos OH de los monofosfatos y los monofosfonatos en forma de ariloxifosforamidatos (Figura 16), es decir, se enmascara con un grupo aromático y un éster de un aminoácido unido por un enlace fosforamidato (P-N).

Tanto el grupo éster como el grupo aromático se esciden en el interior de la célula por la rotura del enlace mediante las esterasas o enzimas carboxipeptidasas (hint-1) y se liberan las especies monofosfato y monofosfonato (Alazani et al., 2018).

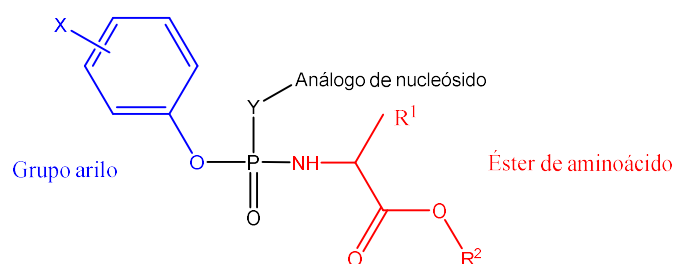


Figura 16. Estructura general de los ProTides adaptada de (Mehellou et al., 2018).

El éster de aminoácido y el grupo ariloxi forman dos grupos lipófilos que favorecen la absorción a nivel intracelular ya que aumentan la permeabilidad de la membrana, no es necesario disponer de los transportadores de los nucleósidos naturales ya que la molécula es mucho más permeable.

4.2.1. Etapas del desarrollo de la tecnología ProTide

Esta búsqueda de profármacos que sean más activos que sus antecesores se inicia con el diseño de ésteres de los grupos fosfato y fosfonato tomando como referencia la 3'-azido-3'-desoxitimidina o zidovudina (AZT), un análogo de nucleósido que actúa como fármaco antirretroviral al inhibir la transcriptasa inversa del VIH. (Papadopulos-Eleopulos et al., 1999)

Paso 1. Ésteres de fosfato con grupos alquilo y haloalquilo

Primero se intenta enmascarar el grupo fosfato del 9-β-D-arabinofuranosiladenina monofosfato (AraA) con triésteres de dialquilo (Tabla 1), estos fármacos presentan más estabilidad frente a las enzimas como la adenilato desaminasa pero no tenían una gran actividad in vivo. Cuando se aplica este enmascaramiento al monofosfato del AZT, fármaco usado contra el VIH, no presenta actividad in vitro, debido a que la molécula con los ésteres de dialquilo era tan estable que no se liberaba la especie activa de 5'-O-trifosfato de AZT. Se prueba un enmascaramiento con grupos haloalquilo para mejorar la escisión en el interior de la molécula, pero aun así no se observa una gran actividad antiviral.

Por tanto, en el AraA el enmascaramiento con grupos alquilo y haloalquilo produce un aumento de la actividad antiviral debido a que se produce un aumento de la lipofilia de la molécula y por tanto una mejor entrada al interior de la célula (Mehellow et al., 2018).

Paso 2. Alquiloxi y haloalquiloxi fosforamida

Comprobado que el aumento de la lipofilia con grupos alquilo y haloalquilo era eficaz, se procede con el diseño de profármacos en forma de fosforamidatos (Tabla 1). Se descubre que la proteasa de aspartato del VIH es capaz de escindir grupos fosforamidatos, por tanto, se sintetiza una selección de fosforamidatos alquiloxi de la AZT con aminoácidos esterificados con grupos metilos. Se observa que la cadena de L-alanina presenta mejor actividad, lo que posteriormente se refleja en que todos los ProTides en clínica o ensayo clínico presentan una parte de la L-alanina. Aparece una relación inversamente proporcional entre la actividad anti-VIH y el tamaño de la cadena lateral del aminoácido, cuanto menor es la cadena lateral del aminoácido mayor actividad farmacológica presenta la molécula (Cahard et al., 2004).

Por tanto, al enmascarar los grupos fosfato con aminoácidos esterificados en el extremo carboxilo con un grupo metilo o haloalquilo se observa un aumento de la actividad del fármaco.

Paso 3. Fosforodiamidatos

Como al introducir un aminoácido formando el fosforamidato se observó un aumento de la actividad anti VIH, se prueba enmascarando los oxígenos del grupo fosfato también con ésteres de aminoácidos (Tabla 1). Se usaron ésteres metílicos con cadenas laterales diferentes para enmascarar los oxígenos del grupo fosfato del AZT, pero en este caso no es la alanina la que mejores características presenta sino los aminoácidos con cadenas laterales aromáticas como la fenilalanina.

Paso 4. Sistemas derivados del ácido láctico

Era importante saber la importancia del grupo fosforamidato, por lo que se hacen derivados del ácido láctico y glicólico donde aparecen unidos al AZT por el oxígeno del grupo fosfato, en estos derivados se elimina el grupo fosforamidato (Tabla 1). No se observa un aumento significativo de la actividad, pero llegan a la conclusión de que la actividad se relacionaba con el tamaño de la cadena del alquilo del fosfato ya que una cadena muy larga daba como resultado menor actividad anti VIH. Aun así, no se siguió investigando sobre estos ya que presentaban una actividad bastante pobre (Mehellow et al., 2018).

Paso 5. Fosfatos de diarilo

Se busca el enmascaramiento del fosfato de AZT con dos grupos aromáticos, se esterifican dos grupos fenoles en la posición *para* y se observa una actividad anti VIH incluso mayor que el compuesto inicial, es la primera vez que se desarrolla un derivado más activo que la molécula de partida (Tabla 1). En varios estudios se confirma que al añadir un grupo atractor de electrones en posición *para* se observa un aumento de la actividad anti-VIH. Además, se observa que uno de los derivados era activo frente a líneas celulares que se habían mostrado resistentes al AZT por lo que se reafirma que estos derivados ejercen su acción, la liberación intracelular de los nucleótidos fosforilados (McGuigan et al., 1992).

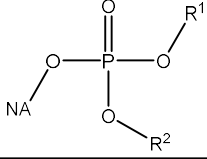
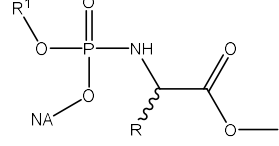
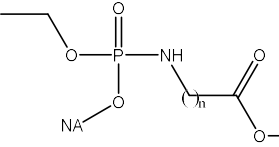
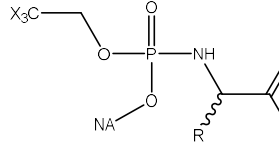
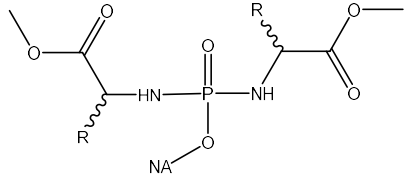
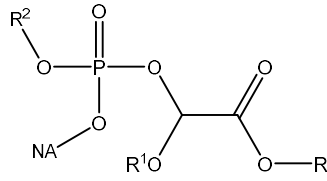
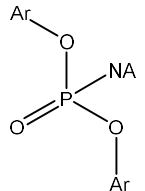
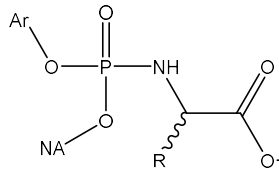
Paso 6. Ariloxifosforamidatos (ProTides)

Se basan en las dos mejoras principales en todo este proceso, los ésteres de aminoácidos con cadenas laterales cortas y los arilos sustituidos en la posición *para* (Tabla 1).

Se desarrollan los derivados del AZT con arilos sustituidos y con ésteres de aminoácidos y se observan una actividad anti VIH mayor comparado con el compuesto inicial. La combinación que más actividad muestra es un fenilo y la L-alanina como aminoácido con una CE_{50} de 0,8 μ M frente a la CE_{50} de 100 μ M que presenta el AZT. Se observa que tanto la L-alanina como el arilo en *para* no sustituido son los más potentes.

Por ello, en diferentes análogos de nucleósidos se prueban ésteres de grupos arilo y al combinarlo con el grupo fosforamidato se observa un aumento de la liberación de los derivados 5'-O-monofosfato en el interior de la célula. Desde ese momento, al enmascaramiento del fosfato con un grupo fosforamidato y un éster arílico se le conoce como tecnología ProTide y se ha convertido en una estrategia muy interesante para el diseño de profármacos de análogos de nucleósidos (Mehellow, 2016).

Tabla 1. Etapas de desarrollo de la Tecnología ProTide. Adaptación de (Mehellou et al, 2018)

| Etapas de desarrollo de la tecnología ProTide | |
|---|---|
| <p>1. <u>Ésteres de fosfato con grupos alquilo y haloalquilo</u></p>  <p>$R^1, R^2 = \text{Me, Et, Pr, } -\text{CH}_2\text{CCl}_3, -\text{CH}_2\text{CF}_3$</p> | <p>2. <u>Alquiloxi y haloalquiloxi fosforamida</u></p>  <p>$R = \text{H, Me, } -\text{CH}(\text{CH}_3)_2, -\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2, -\text{CH}(\text{CH}_3)\text{Et, Bn}$ $R^1 = \text{Me, Et, Pr, Bu, Hex}$</p>  <p>$n = 1-6$</p>  <p>$R = \text{H, Me, } ^t\text{Pr}$ $X = \text{H, F, Cl}$</p> |
| <p>3. <u>Fosforodiamidatos</u></p>  <p>$R = \text{H, Me, } ^t\text{Pr, } -\text{CH}_2\text{Ph, } -\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$</p> | <p>4. <u>Sistemas derivados del ácido láctico</u></p>  <p>$R = \text{Me, Et; } R^1 = \text{H, Me}$ $R^2 = \text{Me, nPr, nC}_{12}\text{H}_{25}$</p> |
| <p>5. <u>Fosfato de diarilo</u></p>  <p>$\text{Ar} = \text{Ph, } p\text{-X-Ph;}$ $(X = \text{grupo atractor de } e^-)$</p> | <p>6. <u>Ariloxifosforamidatos (ProTides)</u></p>  <p>$\text{Ar} = \text{Ph, Ph sustituido}$ $R = \text{H, Me, } -\text{CH}_2\text{iPr, } -\text{CH}_2\text{Ph..}$ $R^1 = \text{Me, Et, iPr, tBu, Bn...}$</p> |

4.2.2. Metabolismo y diseño de ProTides

Los ProTides se activan mediante metabolismo enzimático y normalmente sigue una serie de pasos establecidos (Figura 17). Primero se produce una rotura del enlace éster. Luego se produce una ciclación del carboxilato con eliminación del fenol y se forma un intermedio cíclico, (intermedio anhídrido mixto). Después ocurre una hidrólisis del intermedio resultante dando una estructura abierta. El último paso corresponde a la escisión del enlace P-N mediada por enzimas fosforamidasa y da como resultado el análogo de nucleósido monofosforilado que sigue su recorrido metabólico hasta formar la molécula trifosforilada farmacológicamente activa (Ballatore, 2021).

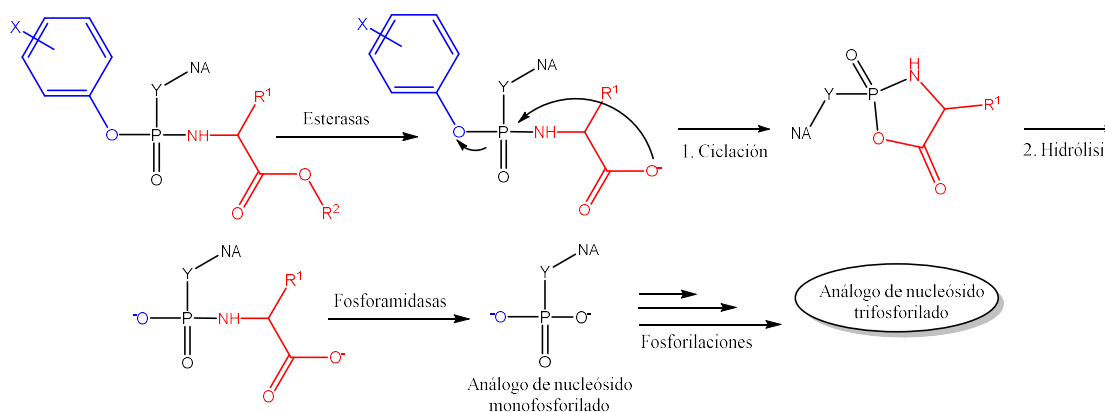


Figura 17. Esquema de bioactivación de los ProTides. Adaptación de (Mehellou, 2016)

El último paso de la bioactivación se produce a través de unas proteínas de unión a nucleótidos que forman parte de la triada de histidina humana (hHINT). Las HINT son enzimas con actividad fosforamidasa y acil-fosfatasa, en el organismo tienen gran importancia ya que regulan la vía de opioides y del dolor crónico, pero en química farmacéutica se aprovecha para la bioactivación de los ProTides a través de la escisión del resto aminoacídico para obtener el análogo de nucleósido monofosforilado libre (Strom et al., 2022).

Por todo ello, en el diseño de los ProTides aparecen 3 puntos clave (Figura 18), el resto carboxílico que forma el éster, la parte aminoacídica y el grupo ariloxi.

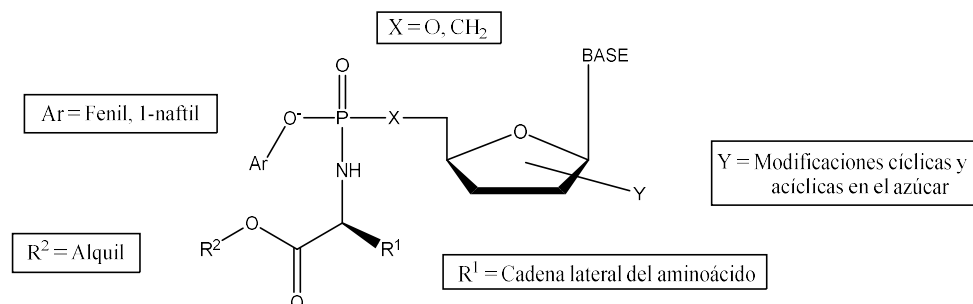


Figura 18. Esquema de principales modificaciones en el diseño de ProTides adaptado de (Slusarczyk et al., 2018b)

Se observa que el éster de aminoácido está relacionado con la actividad antiviral del profármaco debido a que le proporciona estabilidad a nivel extracelular y favorece su activación metabólica por las esterasas intracelulares. Por todo ello se realizan estudios que comparan la actividad y la estructura química para encontrar los profármacos deseados.

4.3. ProTides aprobados por organismos de salud internacionales

4.3.1. Tenofovir alafenamida (GS-7340)

El tenofovir (**19**) (Figura 13) se descubre en el 1993 como fármaco anti-VIH, al no presentar unas características farmacocinéticas ideales, se formula como éster para mejorar su biodisponibilidad y posteriormente como fumarato pasando a ser tenofovir disoproxil fumarato o TDF y se aprueba para el tratamiento del VIH y posteriormente para el tratamiento de infecciones de hepatitis B.

Tenofovir alafenamida (TAF) (**21**) (Figura 15) es un fármaco antiviral aprobado por la FDA en 2016 para el tratamiento de la hepatitis B, infección que aparece con frecuencia en personas inmunodeprimidas como por ejemplo en pacientes con VIH. También está aprobado por la FDA para el tratamiento del VIH en la terapia antirretroviral (TAR) y en combinación con otros fármacos como la emtricitabina se usa como profilaxis antes de la exposición al VIH.

Comparando el TAF con su antecesor TDF, destaca una potencia antiviral mayor además de concentraciones más altas a nivel intracelular y más bajas en el plasma, lo que indicaba más cantidad de fármaco en el lugar de acción y por tanto una mayor potencia.

Se descubre que la terapia con el TAF era más eficaz (40 o 100 mg al día durante 14 días) que la terapia con el TDF (300mg), dosis menores producían mejores resultados. Además, se observa que es capaz de controlar la infección por el VHB a dosis de 25mg diarios frente a los 300mg de TDF necesarios, se observan unos niveles del metabolito activo en el hígado más altos en el caso del profármaco TAF. En definitiva, según estudios en fase III se observa que el TAF es igual de potente que el TDF pero a dosis 30 veces menores por lo que disminuye el riesgo de toxicidad, el daño renal y la disminución de la densidad ósea (De Clercq, 2016).

4.3.2. Sofosbuvir (GS-7977)

La aplicación del enfoque ProTide al 2'-desoxi-2'- α -fluoro-2'- β -C-metiluridina produce nucleótidos con acción anti-VHC, entre ellos destaca sofosbuvir (**22**) (Figura 15), un profármaco que genera grandes niveles del metabolito activo trifosfato in vitro e in vivo, lo que se resume en una mayor actividad biológica a menores dosis. Por esto mismo, se selecciona como candidato clínico (Sofia et al., 2010).

Sofosbuvir fue aprobado en diciembre de 2013 por la FDA para el tratamiento del VHC, este profármaco inhibe la polimerasa NS5B del VHC que aparece en la replicación del virus. Se produce la terminación de la cadena y por tanto no se replica el virus. El que ejerce la acción, al igual que en la mayoría de análogos de nucleósidos, es el metabolito trifosforilado, que actúa inhibiendo la enzima. Los estudios definen que se absorbe y metaboliza rápidamente en el hígado y se excreta por vía renal. Presenta una vida media corta y tiene poca acumulación por lo que se recomienda una administración diaria de unos 200 mg o 400 mg asociado a otros tipos de fármacos como la ribavirina o el interferón pegilado. Es un fármaco eficaz en el tratamiento de diferentes genotipos del virus de la hepatitis C (Mehellou et al., 2018).

4.3.3. Remdesivir (GS-5734)

GS-5734, mejor conocido como Remdesivir (**23**), es un fármaco en fase II de ensayos clínicos para el tratamiento del virus del Ébola (Figura 19). Se han realizado ensayos con monos donde se observa que en los infectados con esta enfermedad letal es capaz de inhibir el 100% de la replicación del virus cuando se administran dosis de unos 10 mg/kg, disminuyendo además los síntomas de la enfermedad como la coagulopatía. Se metaboliza en los macrófagos, solo se ha usado en dos pacientes en 2015 y sobrevivieron a la infección, los estudios en fase I en humanos sanos no muestran reacciones adversas graves (Thornton et al., 2016).

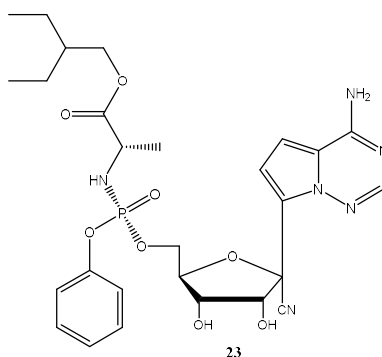


Figura 19. Estructura de Remdesivir (23)

Al poseer el grupo 1'-ciano, es un fármaco con gran selectividad hacia virus de ARN por lo que se encontró activo frente a otros virus como el virus respiratorio sincitial (VRS) o el virus de la hepatitis C, sobre todo se prueba en virus emergentes que suponen una alerta sanitaria como adenovirus o coronavirus (De Clercq, 2019). A partir de la pandemia Covid-19, se prueba frente al SARS-CoV-2 y se observa cierta eficacia, ya que ambos virus comparten su material genético en forma de ARN y aparecen algunas polimerasas conservadas.

Actualmente, se ha aprobado por la FDA para el tratamiento del SARS-CoV-2. Es un profármaco de análogo de nucleósido que actúa inhibiendo a la polimerasa dependiente de ARN (RdRp) que

aparece en los coronavirus y se encarga de la replicación y transcripción, cuando se incorpora al ARN se produce la adición de 3 nucleótidos más y se finaliza la síntesis. El que se incorpora al ARN es el metabolito activo trifosfato, que es el que bloquea la síntesis del coronavirus (Kokic et al., 2021).

4.4. ProTides en ensayos clínicos

Las estructuras de los siguientes ProTides que aparecen en ensayos clínicos en diferentes fases se muestran en una tabla al final de la descripción (Tabla 2)

Estampidina

La estampidina (**24**) fue uno de los primeros ProTides que aparecen en estudio, es un ProTide de la estavudina, un análogo de nucleósidos anti-VIH aprobado por la FDA. Se usa esta tecnología porque es un fármaco que tiene problemas en la primera fosforilación que se realiza por la timidina quinasa (Tabla 2). Además, en este ProTide aparece como grupo arilo un parabromofenol, posee un grupo atractor de electrones que favorece el metabolismo del protide por lo que el metabolito trifosfato activo se genera más rápido (Thornton et al., 2016).

Estudios preclínicos demuestran que la estampidina es más activa que los inhibidores de la transcriptasa inversa que hay actualmente en clínica, sobre todo destaca la actividad frente a cepas resistentes a otros INTI y en células deficientes de timidina quinasa, ya que el análogo está fosforilado y no es necesaria la aparición de la timidina quinasa. Presenta un perfil farmacocinético favorable en modelos animales como ratones y ratas, al igual que un perfil de seguridad clínica en estos modelos animales muy prometedor, se toleran dosis orales diarias de 25 mg/kg en estudio clínico en fase I y los primeros efectos adversos graves aparecen con dosis de 500 mg/kg. Es un fármaco que estaría indicado en la terapia de profilaxis al VIH para disminuir la posibilidad de contraer la enfermedad en parejas serodiscordantes, donde uno de los miembros es seropositivo, o en personas sexualmente activas expuestas al virus, se usaría en el periodo de 3 días de posible transmisión del virus (Uckun et al, 2012).

Timectacina

Timectacina (**25**) es un ProTide de la brivudina, fármaco usado para el tratamiento del herpes zoster, este fármaco presenta mayor actividad antitumoral que su antecesor porque se dirige a las células con un aumento de la timidilato sintasa como las células tumorales, y presenta una gran actividad frente a tumores resistentes al 5-fluorouracilo con un aumento de la enzima (Tabla 2).

Aparece en estudios en fase I y II para el tratamiento del cáncer de colon, se observa un aumento de la supresión de p53 en tumores y una participación en algunas fases del ciclo celular frenando su replicación. Se toleran dosis de hasta 1250 mg/kg sin efectos secundarios graves. Los estudios iniciales muestran que las dosis son bien toleradas en los pacientes en fase I y que varios pacientes llegan a un estado estable de la enfermedad. Aunque se observan buenos resultados, no se han publicado más estudios sobre este fármaco (Thornton et al., 2016).

GS-6620

GS-6620 (**26**) un inhibidor de la proteína no estructural 5B (NS5B) de la ARN polimerasa dependiente de ARN que aparece en el virus de la hepatitis C, al formar parte de este grupo se minimizan las interacciones con otros fármacos y las resistencias (Tabla 2). Es un C nucleósido análogo de la adenosina y se descubre que es un gran inhibidor del VHC ya que no solo es potente, sino que también presenta gran selectividad. Su metabolito activo actúa como terminador de la cadena de ARN, se observa que presenta más selectividad frente a la polimerasa NS5B que a otras polimerasas del hospedador y una gran barrera frente a las resistencias. Este candidato ofrece efectos aditivos cuando se combina con una terapia contra el VHC in vitro (Feng et al., 2014).

Debido a su estructura CN en el carbono 1' y metilo en el carbono 2' presenta mayor selectividad hacia la polimerasa NS5B frente a las polimerasas del paciente. Un estudio clínico de fase I muestra una inhibición del virus, pero son necesarias grandes dosis de hasta 900mg dos veces día durante 5 días para que se observe la disminución de la carga viral. Se concluye en que es un buen candidato clínico, pero presenta una variabilidad alta entre individuos y una farmacocinética oral pobre, por lo que su eficacia clínica está limitada y no ha progresado (Cho et al., 2014).

NUC-7738

La cordicepina o 3-desoxiadenosina (3'-dA) es un NA extraído del hongo *Cordyceps* usado en la medicina tradicional China como inmunomodulador y antitumoral, cuyo metabolito activo es el trifosfato (Liu et al., 2022). A pesar de sus buenos resultados, tiene una vida media en el plasma bastante corta ya que sufre una gran degradación por la adenosina desaminasa (ADA) y tiene escasa captación por lo que se piensa en formularlo como ProTide.

Para ello se desarrolla el ProTide NUC-7738 (**27**) y se compara con el 3'-dA, se observa una potencia entre 7 y 40 veces mayor, es una molécula resistente a la ADA. No se observan efectos secundarios que aparecen en otros fármacos NA como la anemia, neutropenia o problemas

gastrointestinales por lo que se deduce que el tejido no tumoral no sufre gran afectación por el uso del fármaco (Tabla 2). La eficacia se compara frente a la 3'-dA midiendo las concentraciones inhibitorias máximas (IC_{50}) en diferentes líneas de células tumorales, presenta una IC_{50} de 18,8 μ M en comparación con 137,8 μ M del 3-dA. Se observan señales de actividad antitumoral sobre todo en pacientes con melanomas resistentes a otros tratamientos como la inmunoterapia. Actualmente se encuentra en estudios de fase I en humanos (Schwenzer et al., 2021).

NUC 1031 (Acelarina)

La gemcitabina es un quimioterápico usado en monoterapia o en combinación para el tratamiento de tumores en pacientes con cáncer de ovario, adenocarcinoma pancreático o cáncer del tracto biliar (Kapacee et al., 2020).

NUC-1031 (**28**) se está probando para cáncer de mama, ovario, colon, pulmón y páncreas que son resistentes al tratamiento con la gemcitabina, el tratamiento de referencia (Tabla 2). Es más lipófilo que la gemcitabina por lo que penetra en las células perfectamente por difusión pasiva y no requiere la entrada por transportadores de nucleósidos. Además, como se administra un profármaco del 5'-monofosfato, se evita la activación por algunas quinasas que no están presentes en algunos tipos de cáncer y se disminuye la cantidad de fármaco perdido por desaminación, por lo que aumentan los niveles de metabolito activo intracelular, unas 13 veces más que en el fármaco de referencia (Thornton et al., 2016).

El tratamiento estándar en pacientes con tumores en las vías biliares avanzado es la gemcitabina con el cisplatino. Se observa en estudios previos la seguridad en el uso del cisplatino con el NUC-1031 y se pone en funcionamiento NuTide 121, un estudio global donde se compara la efectividad de la terapia base de gemcitabina-cisplatino con NUC 1031-cisplatino. Debido a los datos de seguridad en fases previas, actualmente se encuentra en fase III, comenzó en el 2015 y se realiza en 120 lugares de todo el mundo como Norte América, Europa o Asia (McNamara et al., 2020).

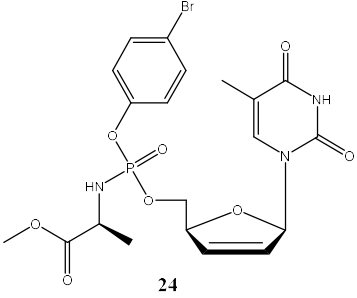
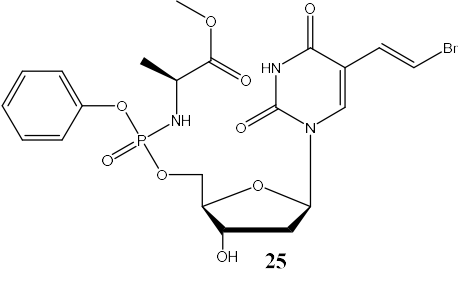
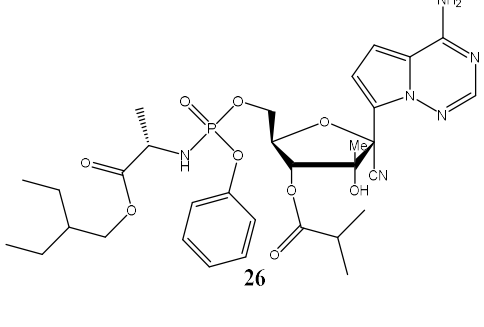
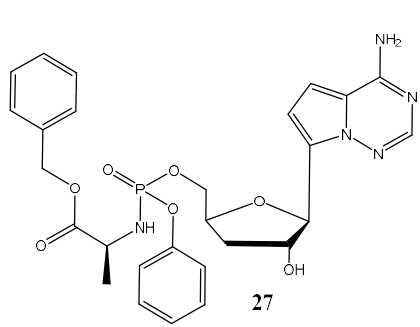
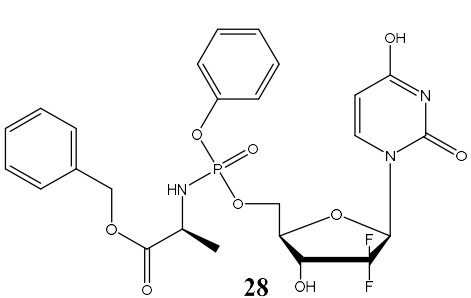
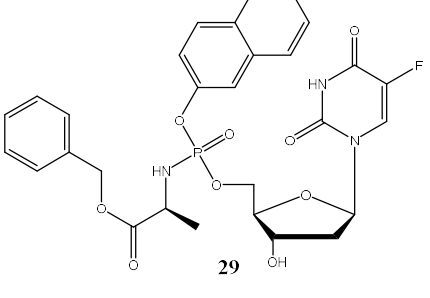
NUC 3373

Las fluoropirimidinas como el 5-fluorouracilo, son la base del tratamiento de muchos tumores, pero en específico el colonorrectal y otras neoplasias de tipo gastrointestinal. NUC 7737 (**29**) es un protide del 5'-fluoro-2'-desoxiuridina (FdU), es el metabolito que aparece justo antes del 5-fluorouracilo (Tabla 2). Se observa que es resistente a enzimas que inactivan al FdU como la timidina uridina fosforilasas y además permanece estable en suero en comparación con su antecesor el FdU. Este candidato produce el metabolito activo 363 veces más que el 5-

fluorouracilo y unido a su gran estabilidad química, se introduce en fase I de ensayos clínicos en el 2015 (Thornton et al., 2016).

Como se demuestra que NUC 3373 genera más metabolito activo, se sabe que se produce una inhibición de la timidilato sintasa mayor que con el compuesto de referencia lo que lleva a la detención del ciclo celular. Por todo ello se concluye que es un gran inhibidor de la timidilato sintasa que causa daño en el ADN y se observa que el NUC 7737 presenta un buen perfil de seguridad en los pacientes estudiados (Bré et al., 2023).

Tabla 2. Estructura de los principales ProTides en ensayos clínicos.

| Estampidina | Timetactina |
|---|--|
|  <p style="text-align: center;">24</p> |  <p style="text-align: center;">25</p> |
| GS- 6620 | NUC-7738 |
|  <p style="text-align: center;">26</p> |  <p style="text-align: center;">27</p> |
| NUC-1031 | NUC-3373 |
|  <p style="text-align: center;">28</p> |  <p style="text-align: center;">29</p> |

4.5. ProTides en investigación dirigidos a los Flavivirus

Para encontrar los ProTides con acción anti-Zika se buscan entre nucleótidos que inhiben la RdRP viral. Se usa como referencia Sofosbuvir porque se observa que presenta actividad frente a la familia Flavivirus por su similitud con el VHC.

Se prueban 13 ProTides contra el virus del Zika en células madre neuronales y se observa actividad interesante en los ProTides de 2'-C-eteniluridina (**30**) y 2'-C-metiluridina (**31**) (Figura 20). Se observa que los que más actividad presentan son los derivados de uracilo. Se observa una mayor supresión del efecto citopático que produce el virus del Zika en el derivado 2'-C-metiluridina frente al sofosbuvir. Todo esto se prueba en células madre neuronales, son células muy susceptibles a sufrir daño cuando se produce una infección por Zika debido a su etiopatología.

Se observa que la ARN polimerasa humana incorpora en menor medida los derivados 2'-C-metiluridina que los 2'-C-Metil derivados de otras bases por lo que puede sugerir mayor selectividad por las polimerasas de los Flavivirus frente a las polimerasas humanas, aunque actualmente no se conoce el mecanismo de esta selectividad (Bernatchez et al., 2019).

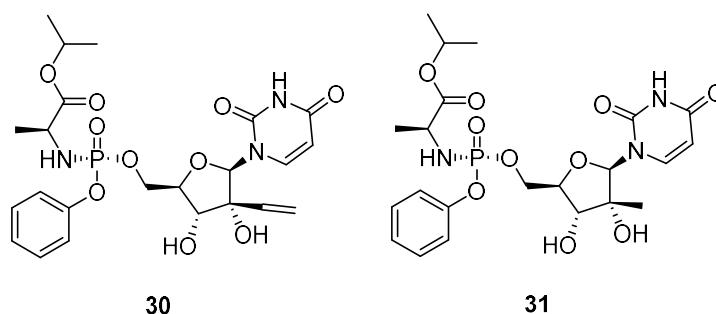


Figura 20. Estructura de los derivados 2'-C-eteniluridina (29) y 2'-C-metiluridina (30)

Se buscan otras estrategias para el diseño de ProTides contra los Flavivirus, se prueban ProTides diéster, son más lipófilos y permeables en comparación con los monoéster, pero para su activación es necesario una hidrólisis dependiente de esterasas, presentes principalmente en el hígado, esto se traduce en una disminución a nivel sistémico del metabolito activo que puede ser importante, como por ejemplo en la infección por Zika, donde se afectan principalmente células neuronales. Para evitar este paso de activación por la carboxiesterasa, se buscan ProTides que se activen químicamente y no enzimáticamente, el primer paso se activa químicamente y el segundo por las HINT-1 liberando el nucleósido monofosfato (Okon et al., 2017).

Un ejemplo sería la caracterización de la actividad frente al virus del Zika en dos ProTides diferentes; Protide UMN-1001 (**32**) y UMN-1002 (**33**). Este tipo de ProTides (Figura 21) son fosforamidatos de triptamina que tienen una activación química y no enzimática. Tienen actividad anti-DENV mejorada respecto al análogo de nucleósido inicial y, además, al ser ProTides, están disponibles por vía oral, son moléculas más lipófilas que penetran en la célula con facilidad por difusión y se hidrolizan por la HINT1. Se prueba también si inhiben la infección por zika in vivo, en ratones recién nacidos. Inhiben la replicación del virus tanto en líneas celulares como en modelos in vivo, se observa que UMN-1002 protege a los ratones recién nacidos de la infección por el Zika. Aunque a priori UMN-1002 es más tóxico, se observa que las dosis administradas de 1001 en los ratones para que presente actividad antiviral fueron letales (Matos de Souza et al., 2020).

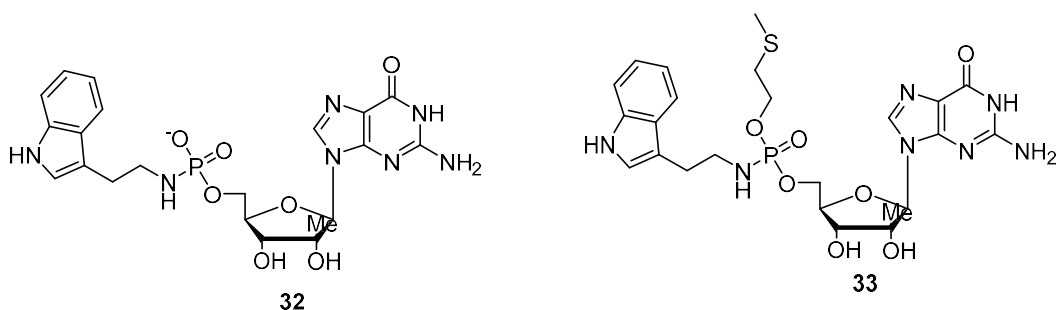


Figura 21. Estructura del UMN-1001 (**32**) y UMN-1002 (**33**)

Recientemente se informa que estos derivados (UMN-1001, **32**) no son activos in vitro en las células de infección por Zika (células neuronales), pero si se observa actividad con los ProTides ariloxifosforamidatos (Figura 20), ambos necesitan la activación por la HINT-1 por lo que no se considera la razón principal de la inactividad. Se cree que la diferencia de actividad se produce por la especificidad de sustrato de la HINT1, lo que mostraría mayor actividad para el ariloxi frente al derivado de la triptamina, pero son necesarios más estudios para conocer la diferencia de actividad de ambos candidatos (Matos de Souza et al., 2020).

Por la importancia de los ProTides en otras infecciones o enfermedades y los datos obtenidos en los últimos estudios sobre los ProTides con actividad frente a los Flavivirus, se debe continuar con estos estudios tanto a nivel preclínico con modelos animales como a nivel clínico con ensayos, ya que son fármacos que se postulan como relevantes candidatos para el tratamiento anti-DENV y anti-Zika en un futuro clínico.

4. CONCLUSIONES

Con el aumento de preocupación social relacionada con la salud estas últimas décadas, empujada por pandemias mortales o enfermedades sin un tratamiento óptimo, la comunidad científica se ha visto obligada a buscar nuevas alternativas terapéuticas para actuar frente a estos brotes infecciosos o procesos tumorales que están afectando a la sociedad.

En esta revisión bibliográfica se ha expuesto la importancia del uso de los análogos de los nucleósidos frente a estas patologías así como los grandes problemas de biodisponibilidad oral que presentan, unidos a su baja solubilidad y la facilidad de la aparición de resistencias, sugieren una búsqueda diferente en el abordaje de estas enfermedades.

En la búsqueda de profármacos que aumenten los niveles de metabolito activo intracelular de los análogos de nucleósidos, consiguiendo una mayor biodisponibilidad, destaca el uso de la tecnología ProTide. Esta tecnología, basada en el enmascaramiento de los grupos OH del fosfato de los NA con un éster arílico y un fosforamidato, ha sido una de las alternativas más prometedoras para tratar estas enfermedades ya que se observa un aumento de la actividad del fármaco con una disminución de dosis en la mayoría de los compuestos estudiados.

A partir de esta tecnología, se descubren tres fármacos antivirales aprobados por la FDA que presentan mejores características que sus análogos de partida, ya que producen menos efectos secundarios al necesitar una dosis menor. Gracias a ellos, se ha seguido investigando con otros fármacos en ensayo no solo para procesos virales sino para procesos tumorales, otra de las grandes preocupaciones sociales en la actualidad. Se ha demostrado que existen candidatos en ensayos clínicos de fases avanzadas que sugieren una mejora en el tratamiento antitumoral estándar, ya que al igual que los ProTides antivirales, ofrecen una actividad antitumoral elevada con una disminución de los efectos adversos y las resistencias. Dado el éxito del estudio de esta tecnología, se ha valorado su uso en otras infecciones como las producidas por Flavivirus y se ha observado la necesidad de seguir investigando acerca de esta tecnología.

Se concluye esta revisión destacando la importancia que ha tenido el descubrimiento de esta tecnología a nivel clínico ya que se ha producido un avance en el tratamiento de muchas enfermedades emergentes y podría suponer una nueva línea de estudio para ampliar los compuestos que aparecen actualmente en clínica, para mejorar el arsenal terapéutico actual.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Alanazi AS, James E, Mehellou Y. The ProTide Prodrug Technology: Where Next? *ACS Med Chem Lett.* 2018 Dec 20;10(1):2-5.
- Ballatore C. New Heights for ProTides? *J Med Chem.* 2021 Nov 25;64(22):16422-16424.
- Baseler L, Chertow DS, Johnson KM, Feldmann H, Morens DM. The Pathogenesis of Ebola Virus Disease. *Annu Rev Pathol.* 2017 Jan 24;12:387-418
- Bernatchez JA, Coste M, Beck S, Wells GA, Luna LA, Clark AE, Zhu Z, Hecht D, Rich JN, Sohl CD, Purse BW, Siqueira-Neto JL. Activity of Selected Nucleoside Analogue ProTides against Zika Virus in Human Neural Stem Cells. *Viruses.* 2019 Apr 20;11(4):365
- Bré J, Dickson AL, Read OJ, Zhang Y, McKissock FG, Mullen P, Tang P, Zickuhr GM, Czekster CM, Harrison DJ. The novel anti-cancer fluoropyrimidine NUC-3373 is a potent inhibitor of thymidylate synthase and an effective DNA-damaging agent. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2023 May;91(5):401-412.
- Bricaire F, Bossi P. Infections virales émergentes [Emerging viral diseases]. *Bull Acad Natl Med.* 2006 Mar;190(3):597-608; discussion 609, 625-7. French.
- Cahard D, McGuigan C, Balzarini J. Aryloxy phosphoramidate triesters as pro-tides. *Mini Rev Med Chem.* 2004 May;4(4):371-81.
- Cao J, Yan Q. Cancer Epigenetics, Tumor Immunity, and Immunotherapy. *Trends Cancer.* 2020 Jul;6(7):580-592.
- Chitalia VC, Munawar AH. A painful lesson from the COVID-19 pandemic: the need for broad-spectrum, host-directed antivirals. *J Transl Med.* 2020 Oct 15;18(1):390.
- Cho A, Zhang L, Xu J, Lee R, Butler T, Metobo S, Aktoudianakis V, Lew W, Ye H, Clarke M, Doerffler E, Byun D, Wang T, Babusis D, Carey AC, German P, Sauer D, Zhong W, Rossi S, Fenaux M, McHutchison JG, Perry J, Feng J, Ray AS, Kim CU. Discovery of the first C-nucleoside HCV polymerase inhibitor (GS-6620) with demonstrated antiviral response in HCV infected patients. *J Med Chem.* 2014 Mar 13;57(5):1812-25.
- Chong HY, Leow CY, Abdul Majeed AB, Leow CH. Flavivirus infection-A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. *Virus Res.* 2019 Dec;274:197770.
- Cunningham AA, Daszak P, Wood JLN. One Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2017 Jul 19;372(1725):20160167.
- Dearborn AD, Marcotrigiano J. Hepatitis C Virus Structure: Defined by What It Is Not. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2020 Jan 2;10(1):a036822.

- De Clercq E, Field HJ. Antiviral prodrugs - the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *Br J Pharmacol*. 2006 Jan;147(1):1-11.
- De Clercq E, Li G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin Microbiol Rev*. 2016 Jul;29(3):695-747.
- De Clercq E. New Nucleoside Analogues for the Treatment of Hemorrhagic Fever Virus Infections. *Chem Asian J*. 2019 Nov 18;14(22):3962-3968
- De Clercq E, Neyts J. Antiviral agents acting as DNA or RNA chain terminators. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;(189):53-84.
- De Clercq E. Tenofovir alafenamide (TAF) as the successor of tenofovir disoproxil fumarate (TDF). *Biochem Pharmacol*. 2016 Nov 1;119:1-7.
- Del Amo J, Pérez-Molina JA. Introducción. La infección por VIH en España: situación actual y propuestas frente a los nuevos desafíos. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2018 Sep;36 Suppl 1:1-2. English, Spanish.
- Dyba T, Randi G, Bray F, Martos C, Giusti F, Nicholson N, Gavin A, Flego M, Neamtiu L, Dimitrova N, Negrão Carvalho R, Ferlay J, Bettio M. The European cancer burden in 2020: Incidence and mortality estimates for 40 countries and 25 major cancers. *Eur J Cancer*. 2021 Nov;157:308-347.
- Feng JY, Cheng G, Perry J, Barauskas O, Xu Y, Fenaux M, Eng S, Tirunagari N, Peng B, Yu M, Tian Y, Lee YJ, Stepan G, Lagpacan LL, Jin D, Hung M, Ku KS, Han B, Kitrinis K, Perron M, Birkus G, Wong KA, Zhong W, Kim CU, Carey A, Cho A, Ray AS. Inhibition of hepatitis C virus replication by GS-6620, a potent C-nucleoside monophosphate prodrug. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(4):1930-42.
- Geraghty RJ, Aliota MT, Bonnac LF. Broad-Spectrum Antiviral Strategies and Nucleoside Analogues. *Viruses*. 2021 Apr 13;13(4):667.
- Graham L. An introduction to Medicinal Chemistry. 3rded Oxford: Oxford University Press; 2005.
- Jacob ST, Crozier I, Fischer WA 2nd, Hewlett A, Kraft CS, Vega MA, Soka MJ, Wahl V, Griffiths A, Bollinger L, Kuhn JH. Ebola virus disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2020 Feb 20;6(1):13.
- Jordheim LP, Durantel D, Zoulim F, Dumontet C. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Jun;12(6):447-64.
- Jourdan JP, Bureau R, Rochais C, Dallemagne P. Drug repositioning: a brief overview. *J Pharm Pharmacol*. 2020 Sep;72(9):1145-1151.

- Kapacee ZA, Knox JJ, Palmer D, Blagden SP, Lamarca A, Valle JW, McNamara MG. NUC-1031, use of ProTide technology to circumvent gemcitabine resistance: current status in clinical trials. *Med Oncol*. 2020 Jun 11;37(7):61.
- Kataev VE, Garifullin BF. Antiviral nucleoside analogs. *Chem Heterocycl Compd (N Y)*. 2021;57(4):326-341.
- Kokic G, Hillen HS, Tegunov D, Dienemann C, Seitz F, Schmitzova J, Farnung L, Siewert A, Höbartner C, Cramer P. Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir. *Nat Commun*. 2021 Jan 12;12(1):279.
- Lanini S, Ustianowski A, Pisapia R, Zumla A, Ippolito G. Viral Hepatitis: Etiology, Epidemiology, Transmission, Diagnostics, Treatment, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am*. 2019 Dec;33(4):1045-1062.
- Lewandowska AM, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B. Environmental risk factors for cancer - review paper. *Ann Agric Environ Med*. 2019 Mar 22;26(1):1-7.
- Liu Y, Guo ZJ, Zhou XW. Chinese Cordyceps: Bioactive Components, Antitumor Effects and Underlying Mechanism-A Review. *Molecules*. 2022 Oct 4;27(19):6576.
- Maldonado-Rodriguez A, Cevallos AM, Rojas-Montes O, Enriquez-Navarro K, Alvarez-Muñoz MT, Lira R. Occult hepatitis B virus co-infection in human immunodeficiency virus-positive patients: A review of prevalence, diagnosis and clinical significance. *World J Hepatol*. 2015 Feb 27;7(2):253-60.
- Martín Guerra JM, Martín Asenjo M, Monteagudo Nogueira B, Hinojosa Mena-Bernal C, Rodríguez Martín C. Reflexiones sobre el infradiagnóstico y la primoinfección por VIH [Reflections on underdiagnosis and primary HIV infection]. *Semergen*. 2017 Jan-Feb;43(1):1-3. Spanish.
- Matos de Souza MR, Cunha MS, Okon A, Monteiro FLL, Campanati L, Wagner CR, da Costa LJ. In Vitro and In Vivo Characterization of the Anti-Zika Virus Activity of ProTides of 2'-C- β -Methylguanosine. *ACS Infect Dis*. 2020 Jul 10;6(7):1650-1658
- McGuigan C, Pathirana RN, Mahmood N, Devine KG, Hay AJ. Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV1 in cell lines which are resistant to the action of AZT. *Antiviral Res*. 1992 Apr;17(4):311-21.
- McNamara MG, Goyal L, Doherty M, Springfield C, Cosgrove D, Sjoquist KM, Park JO, Verdaguer H, Braconi C, Ross PJ, Gramont A, Zalcborg JR, Palmer DH, Valle JW, Knox JJ. NUC-1031/cisplatin versus gemcitabine/cisplatin in untreated locally advanced/metastatic biliary tract cancer (NuTide:121). *Future Oncol*. 2020 Jun;16(16):1069-1081.
- Mehellou Y, Rattan HS, Balzarini J. The ProTide Prodrug Technology: From the Concept to the Clinic. *J Med Chem*. 2018 Mar 22;61(6):2211-2226.

- Mehellou Y. The ProTides Boom. *ChemMedChem*. 2016 Jun 6;11(11):1114-6.
- Morán Arribas M, Rivero A, Fernández E, Poveda T, Caylá JA. Burden of HIV infection, vulnerable populations and access barriers to healthcare. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2018 Sep;36 Suppl 1:3-9. English, Spanish.
- Muggia F, Diaz I, Peters GJ. Nucleoside and nucleobase analogs in cancer treatment: not only sapacitabine, but also gemcitabine. *Expert Opin investig Drugs*. 2012 Apr;21(4):403-8.
- Okon A, Matos de Souza MR, Shah R, Amorim R, da Costa LJ, Wagner CR. Anchimerically Activatable Antiviral ProTides. *ACS Med Chem Lett*. 2017 Aug 14;8(9):958-962
- Papadopulos-Eleopulos E, Turner VF, Papadimitriou JM, Causer D, Alphonso H, Miller T. A critical analysis of the pharmacology of AZT and its use in AIDS. *Curr Med Res Opin*. 1999;15 Suppl 1:S1-45.
- Pastuch-Gawołek G, Gillner D, Król E, Walczak K, Wandzik I. Selected nucleos(t)ide-based prescribed drugs and their multi-target activity. *Eur J Pharmacol*. 2019 Dec 15;865:172747.
- Santoro MG, Carafoli E. Remdesivir: From Ebola to COVID-19. *Biochem Biophys Res Commun*. 2021 Jan 29;538:145-150.
- Schwenzer H, De Zan E, Elshani M, van Stiphout R, Kudsy M, Morris J, Ferrari V, Um IH, Chettle J, Kazmi F, Campo L, Easton A, Nijman S, Serpi M, Symeonides S, Plummer R, Harrison DJ, Bond G, Blagden SP. The Novel Nucleoside Analogue ProTide NUC-7738 Overcomes Cancer Resistance Mechanisms In Vitro and in a First-In-Human Phase I Clinical Trial. *Clin Cancer Res*. 2021 Dec 1;27(23):6500-6513.
- Seley-Radtke KL, Yates MK. The evolution of nucleoside analogue antivirals: A review for chemists and non-chemists. Part 1: Early structural modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Res*. 2018 Jun;154:66-86.
- Sivanandy P, Jun PH, Man LW, Wei NS, Mun NFK, Yii CAJ, Ying CCX. A systematic review of Ebola virus disease outbreaks and an analysis of the efficacy and safety of newer drugs approved for the treatment of Ebola virus disease by the US Food and Drug Administration from 2016 to 2020. *J Infect Public Health*. 2022 Mar;15(3):285-292.
- Slusarczyk M, Ferla S, Brancale A, McGuigan C. Synthesis and biological evaluation of 6-substituted-5-fluorouridine ProTides. *Bioorg Med Chem*. 2018 Feb 1;26(3):551-565.
- Slusarczyk M, Serpi M, Pertusati F. Phosphoramidates and phosphonamidates (ProTides) with antiviral activity. *Antivir Chem Chemother*. 2018 Jan-Dec;26:2040206618775243.
- Sofia MJ, Bao D, Chang W, Du J, Nagarathnam D, Rachakonda S, Reddy PG, Ross BS, Wang P, Zhang HR, Bansal S, Espiritu C, Keilman M, Lam AM, Steuer HM, Niu C, Otto MJ, Furman PA. Discovery of a β -d-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine nucleotide prodrug (PSI-7977) for the treatment of hepatitis C virus. *J Med Chem*. 2010 Oct 14;53(19):7202-18.

- Strom A, Shah R, Dolot R, Rogers MS, Tong CL, Wang D, Xia Y, Lipscomb JD, Wagner CR. Dynamic Long-Range Interactions Influence Substrate Binding and Catalysis by Human Histidine Triad Nucleotide-Binding Proteins (HINTs), Key Regulators of Multiple Cellular Processes and Activators of Antiviral ProTides. *Biochemistry*. 2022 Dec 6;61(23):2648-2661.
- Thornton PJ, Kadri H, Miccoli A, Mehellou Y. Nucleoside phosphate and phosphonate prodrug clinical candidates. *J. J Med Chem*. 2016;59:10400-10410.
- Tomori O, Kolawole MO. Ebola virus disease: current vaccine solutions. *Curr Opin Immunol*. 2021 Aug;71:27-33.
- Trovato M, Sartorius R, D'Apice L, Manco R, De Berardinis P. Viral Emerging Diseases: Challenges in Developing Vaccination Strategies. *Front Immunol*. 2020 Sep 3;11:2130.
- Uckun FM, Cahn P, Qazi S, D'Cruz O. Stampidine as a promising antiretroviral drug candidate for pre-exposure prophylaxis against sexually transmitted HIV/AIDS. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012 Apr;21(4):489-500.
- van Leur SW, Heunis T, Munnur D, Sanyal S. Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. *Virulence*. 2021 Dec;12(1):2814-2838.
- Vila-Córcoles Á, Vila-Rovira Á, Satué-Gracia EM, Ochoa-Gondar O, de Diego-Cabanes C, Hospital-Guardiola I, Forcadell-Peris MJ, Martín-Luján F, Basora-Gallisà J. Lugar de atención, sintomatología y curso clínico, gravedad y letalidad en 536 casos confirmados de COVID-19 en adultos mayores de 50 años en el área de Tarragona, marzo-junio de 2020. *Rev Esp Salud Publica*. 2021 Sep 8;95:e202109115.
- Wagner CR, Iyer VV, McIntee EJ. Pronucleotides: toward the in vivo delivery of antiviral and anticancer nucleotides. *Med Res Rev*. 2000 Nov;20(6):417-51
- Yates MK, Seley-Radtke KL. The evolution of antiviral nucleoside analogues: A review for chemists and non-chemists. Part II: Complex modifications to the nucleoside scaffold. *Antiviral Res*. 2019 Feb;162:5-21.