

Revisión

Jordi Reina

Plitidepsina, un inhibidor del factor de elongación celular eEF1a y molnupiravir un análogo del ribonucleósido citidina, dos nuevos compuestos químicos con intensa actividad frente al SARS-CoV-2

Unidad de Virología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases, Facultad de Medicina (UIB). Palma de Mallorca.

Article history

Received: 8 March 2021; Revision Requested: 14 March 2021; Revision Received: 16 March 2020; Accepted: 21 March 2021; Published: 27 April 2021

RESUMEN

El conocimiento del ciclo replicativo del SARS-CoV-2 y sus interacciones con las proteínas celulares, ha abierto una nueva posibilidad terapéutica basada en el bloqueo de las esenciales para el virus. El factor de elongación proteico celular eEF1A podría ser una buena diana. Dentro de sus inhibidores naturales están las dideminas y sus compuestos químicos relacionados como la plitidepsina. En cultivo de células humanas este compuesto es capaz de inhibir al virus con una potencia 27,5 veces la del remdesivir. Debe administrarse por vía endovenosa. De los compuestos análogos a los ribonucleósidos, el molnupiravir (MK-4482/EIDD-2801) (hidroxi-citidina) determina una mutagenesis letal sobre el SARS-CoV-2. En animales, tras su administración oral disminuye unas 25.000 veces la carga viral pulmonar y unas 100.000 veces administrado como profilaxis. Evita la transmisión del virus y elimina su presencia en la orofaringe. Ambos compuestos químicos han iniciado los ensayos clínicos en humanos en Fase I/II.

Palabras clave: plitidepsina; molnupiravir (MK4482/EIDD-2801); SARS-CoV-2; antiviral

Plitidepsin, an inhibitor of the cell elongation factor eEF1a, and molnupiravir an analogue of the ribonucleoside cytidine, two new chemical compounds with intense activity against SARS-CoV-2

ABSTRACT

The knowledge of the replicative cycle of SARS-CoV-2 and its interactions with cellular proteins has opened a new therapeutic

possibility based on blocking those essential for the virus. The cellular protein elongation factor eEF1A could be a good target. Among its natural inhibitors are didemins and their related chemical compounds such as plitidepsin. In human cell culture, this compound is capable of inhibiting the virus with a potency 27,5 times that of remdesivir. It must be administered intravenously. Of the ribonucleoside analogues, molnupiravir (MK-4483/EIDD-2801) (hydroxy-cytidine) determines a lethal mutagenesis on SARS-CoV-2. In animals, after oral administration, the pulmonary viral load decreases 25,000 times and when administered as prophylaxis, approximately 100,000 times. It prevents the transmission of the virus and eliminates its presence in the oropharynx. Both chemicals have started Phase I / II human clinical trials.

Keywords: plitidepsin; molnupiravir (MK-4482/EIDD-2801); SARS-CoV-2; antiviral

PLITIDEPSINA

Desde la aparición de la pandemia causada por el SARS-CoV-2 se han buscado diferentes estrategias de tratamiento y prevención. Mientras que el desarrollo de vacunas se ha realizado de una forma rápida, la obtención de fármacos con actividad frente al virus ha sido más lenta. Por ello se han ido probando antivirales ya conocidos, como el remdesivir, que no han mostrado resultados concluyentes [1,2]. El conocimiento del ciclo replicativo viral y sus interacciones con las diferentes proteínas de la célula huésped humana, han abierto una nueva posibilidad terapéutica basada en el bloqueo de aquellas que son esenciales para el virus [3,4].

En los estudios previos realizados sobre las interacciones entre el SARS-CoV-2 y las proteínas celulares del huésped se ha detectado que como mínimo 332 de ellas podrían ser esenciales para el virus y por lo tanto posibles dianas terapéuticas [3-5]. De todas ellas parece que el factor de elongación proteico celular eEF1A podría ser una buena diana frente a este virus [6]. Este factor ya había sido descrito como un factor del huésped

Correspondencia:
Jordi Reina

Unidad de Virología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Espases, Facultad de Medicina (UIB). Carretera Valldemossa 79, 07120 Palma de Mallorca.
E-mail: jorge.reina@ssib.es

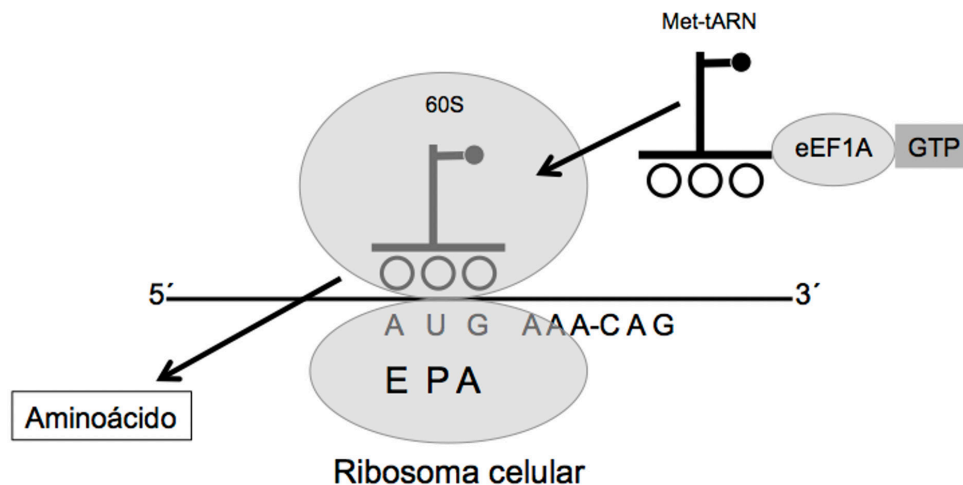


Figura 1 Proceso de incorporación de un nuevo triplete (Met-tARN) al ribosoma celular para la elongación de la cadena proteica en la que participa el Factor de Elongación eEF1A (modificado de Brønstrup et al. [6]).

esencial para la replicación de diferentes virus patógenos humanos, incluidos la gripe [7] y el VRS [8].

A nivel celular el proceso de elongación y adición de nuevos aminoácidos a una proteica se realiza a través de la llegada al ribosoma de un Met-tARN (ARN de transporte) que se fija al codón AUG en la posición P del mismo, dejando libre la posición A para la entrada de un nuevo t-ARN. Un ciclo normal de elongación proteica precisa de cuatro pasos: unión del t-ARN al ribosoma, formación del aminoácido, unión a la cadena proteica en formación y la translocación del propio ribosoma. Para la adición de un nuevo tARN, primer paso, se precisa la participación del factor de elongación celular eEF1A (Figura 1). Este factor es esencial y los compuestos que lo bloquean o inhiben han demostrado una elevada capacidad para disminuir la síntesis de nuevas proteínas celulares [3,6].

Dentro de estos inhibidores naturales están las didemninas y sus compuestos químicos relacionados que han mostrado un importante efecto antitumoral, antiviral e inmunosupresor [6]. Un compuesto relacionado es la plitidepsina (Aplidin®, PLD) (dehidrodidemnina B, Aplidin, PharmaMar, SA, España) que es un depsipéptido que posee un piruvato en vez de un lactato en la posición N-terminal (Figura 2). Este compuesto fue aislado originalmente de la especie marina mediterránea *Aplidium albicans* y presenta un fórmula molecular de $C_{57}H_{87}N_7O_{15}$ [9-11].

A pesar del pequeño cambio estructural, la plitidepsina se ha mostrado en los estudios en humanos mucho más potente en su actividad inhibitoria de la eEF1A y menos tóxica que la propia didemnina B, de ahí que se ha convertido en su sustituto clínico [6,9]. La plitidepsina se fija al eEF1A y además de bloquear la síntesis proteica induce un estrés oxidativo a la célula mediante la activación y fosforilación de los factores Rac1 GTPasa y JNK1 que determina la apoptosis y muerte celular [3,6]. A través de este mecanismo destruye las células neoplá-

sicas que presentan un incremento en la cinética replicativa, y por ello mayor síntesis proteica. Por ello, la plitidepsina podría utilizarse para bloquear la síntesis proteica del SARS-CoV-2 que se hace dominante cuando infecta una célula huésped. Es decir, este compuesto químico no actuaría directamente contra el virus, sino que no le permitiría completar el ciclo replicativo y la síntesis proteica que determina la formación de nuevos viriones [10-11].

White et al. [11] han estudiado la capacidad de la plitidepsina para bloquear la replicación del SARS-CoV-2 en la línea celular de primates Vero E6. En este estudio se comprueba como este compuesto es capaz de inhibir al virus a una concentración mínima de 1,76 nM (IC_{50}), que representa unas nueve veces más potencia que otros compuestos ya conocidos como la ternantina-4 y 87,5 veces más que la zotatafina [3]. Cuando se ha ensayado en líneas celulares humanas, la plitidepsina presenta una IC_{50} de tan solo 0,88 nM, que representa unas 27,5 veces más poder inhibitor que remdesivir (fármaco de referencia) [1,11]. También se ha observado en estas células la ausencia de dosis respuesta en los ensayos de citotoxicidad, lo cual parece sugerir que la plitidepsina sólo determina un efecto citostático, más que citotóxico sobre estas células no determinando su destrucción [5].

Al analizar el efecto de la plitidepsina sobre células pulmonares humanas se observa que presenta una IC_{50} de 3,14 nM, lo cual parece indicar una potente actividad antiviral en este tipo de células. A lo largo de las 8 horas de duración del ciclo celular, la administración a las 4 horas de 20 nM de la plitidepsina inhibe de forma intensa la expresión de la nucleoproteína (NP) del SARS-CoV-2. Esta observación parece indicar que el proceso inhibitor se produce a nivel citoplasmático, lo cual confirma el mecanismo antiviral sobre bloquea el eEF1A [11].

El remdesivir, un análogo de la adenosina, ha sido utilizado

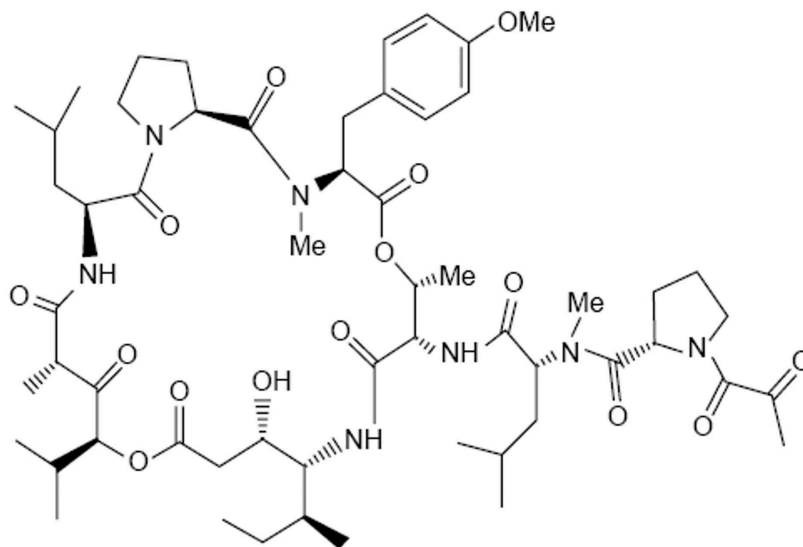


Figura 2 Estructura química de la plitidepsina (dehidrodidemnina B).

de forma generalizada para el tratamiento inicial frente a la infección por el SARS-CoV-2 [1,2]. A pesar de que la plitidepsina ha mostrado una mayor potencia inhibidora *in vitro* que el remdesivir, resulta interesante conocer el posible uso combinado de ambos compuestos. El estudio realizado por White et al. [11] demuestra *in vitro* que la plitidepsina presenta un efecto aditivo con el remdesivir, por lo tanto, la combinación de ambos podría ser una buena terapia frente a esta infección, especialmente en las primeras 48 horas de la infección.

Debido a que la plitidepsina actúa sobre un factor o proteína celular (eEAF1A) es necesario analizar el posible efecto adverso sobre la célula humana huésped. Como ya se ha mencionado parece que sólo presenta sobre la célula pulmonar infectada un efecto citostático, de modo que el SARS-CoV-2 se muestra mucho más susceptible al bloqueo de la translación proteica que la célula huésped que lo alberga, de acuerdo con los estudios con células mutadas con ausencia del eEAF1A [6,11].

Si bien, inicialmente se observó una disminución significativa de la NP viral, es más importante conocer el impacto de la plitidepsina sobre la cinética replicativa viral (ARN y producción proteica). Así se ha observado como este compuesto reduce significativamente el contenido y la carga del ARN viral a las 8 y 12 después de la infección, pero esta actividad disminuye a partir de las 24 horas del inicio de la misma, dato muy semejante al observado con remdesivir [11]. Además, es capaz de reducir la expresión de los ARNs subgenómicos del virus a las 4 horas de la infección celular, manteniendo esta actividad a lo largo de todo el ciclo replicativo. Esta inhibición de la actividad translacional de la plitidepsina confirma la mayor susceptibilidad de los virus de ARN negativos frente a los de genoma ARN positivos [7,8]. El impacto de la plitidepsina sobre

la translación de la proteína NP es muy superior a la obtenida con remdesivir [11].

La plitidepsina se desarrolló básicamente para el tratamiento de procesos tumorales de elevada replicación celular como el mieloma múltiple; en los ensayos clínicos se ha utilizado la dosis intravenosa de 7,5 mg repartidos en tres días [9,10]. Se ha calculado en modelos murinos la dosis óptima, llegando a la observación de que la administración de una dosis de 0,3 mg/Kg durante tres días consecutivos reducía en 2 logaritmos la carga del SARS-CoV-2 en el parénquima pulmonar; mientras que la dosis única de 1 mg/Kg la reducía en 1,5 logaritmos. Además de este efecto antiviral, los estudios histopatológicos demuestran una disminución significativa de los procesos inflamatorios a nivel pulmonar [11].

Todos estos estudios, en líneas celulares y ratones modificados genéticamente, parecen indicar que la plitidepsina es un potente inhibidor de la replicación y producción proteína frente al SARS-CoV-2, que además de asocia a una disminución del proceso inflamatorio pulmonar. Dado que la plitidepsina no interactúa directamente con el SARS-CoV-2 seguiría siendo eficaz frente a todas las posibles mutaciones que se están produciendo y que podrían afectar a otros antivirales o incluso a las vacunas actuales [12].

Desde el punto de su utilización en humanos es preciso todavía establecer la dosis y la posología más adecuada conocer sus posibles efectos adversos, a pesar de su utilización clínica en procesos oncológicos [9,10]. Existe en nuestro país un ensayo multicéntrico destinado a evaluar el perfil de seguridad, toxicidad y eficacia de plitidepsina en cada nivel de dosis administrada durante 3 días consecutivos en pacientes con COVID-19 que precisan de ingreso hospitalario. El objetivo principal es establecer la dosis recomendada de plitidepsina

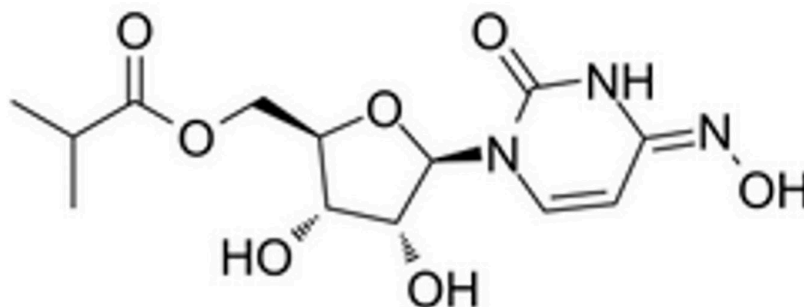


Figura 3 Estructura química de molnupiravir o análogo ribonucleósido β -D-N4-hidroxicitidina (NHC).

para utilizarla en un estudio posterior de eficacia de Fase II/III; al estar en la fase final de reclutamiento no hay datos preliminares [13]. Pero debe reseñarse que, según los datos previos, su eficacia es mayor si se administra las primeras 12-24 horas post-infección, que podría combinarse con remdesivir en casos graves y que presenta el inconveniente de tener que administrarse por vía endovenosa.

MOLNUPIRAVIR (MK-4482 O EIDD-2801)

La necesidad de disponer de un fármaco antiviral con actividad demostrada frente al SARS-CoV-2 tanto para tratamiento como profilaxis, ha determinado la aplicación de diferentes estrategias. Una de las ya comprobadas es la utilización de análogos de los diferentes nucleósidos, como remdesivir (análogo de la adenosina) [1,2].

Los nucleósidos análogos actúan directamente sobre la replicación mediante diferentes mecanismos (a) incorporación de nucleósidos exógenos (posibles fármacos) que comportan la finalización del proceso replicativo. Este proceso puede ser inmediato (obligado) o se obtiene después de un limitado número de procesos replicativos (no obligado); (b) estos nucleósidos pueden incorporarse a lo largo de la cadena en replicación sustituyendo a los naturales e introduciendo mutaciones (alteración de los codones) que determinen errores en la replicación o transcripción. La acumulación de mutaciones y la pérdida de la viabilidad viral se definen genéticamente como "mutagénesis letal y error catastrófico". A través de estos procesos los nucleósidos exógenos alteran el comportamiento viral determinando una disminución del fitness y de la eficacia replicativa; (c) en algunas ocasiones, y debido a su semejanza química, los análogos producen depleción de las reservas de los nucleósidos naturales y dificultad replicativa crónica [14,15].

El desarrollo de estos análogos frente a los coronavirus se enfrenta con la actividad correctora natural de la proteína no estructural 14, una 3'-5'-exoribonucleasa o guanina-N7-metiltransferasa (nsp14-ExoN) que corrige los errores de copia del ARN y le confiere una fidelidad de hasta 20 veces mayor que la detectada en otros virus. La proteína nsp14-ExoN es la respon-

sable de que la mayoría de los coronavirus, incluido el SARS-CoV-2, se muestren resistentes a muchos análogos, incluyendo la ribavirina y el 5-fluoruracilo [16,17]. Por lo tanto, los nuevos análogos han de ser capaces de inhibir a los coronavirus en presencia de la actividad de la nsp14-ExoN [14-17].

El ribonucleósido análogo molnupiravir (MK-4482 o EIDD-280) es el isopropil-éster del compuesto β -D-N4-hidroxicitidina (fórmula $C_{13}H_{19}H_3O_7$). Este profármaco posee una elevada biodisponibilidad oral y es fosforilado en el grupo N4-hidroxilo a nivel del tracto gastrointestinal. Posteriormente es hidrolizado para dar lugar al fármaco original (EIDD-1931) que se distribuye a los diferentes tejidos para ser tri-fosforilado por las células eucariotas (forma activa) [15,17,18]. El compuesto tri-fosforilado presenta un amplio espectro antiviral frente a los virus ARN, tales como la gripe, Ebola, virus de la encefalitis equina venezolana y Coronavirus (MERS, SARS-1 y SARS-CoV-2) [17,18]. Se ha mostrado eficaz incluso frente a las cepas del SARS-CoV-2 resistentes a remdesivir [17,19].

El molnupiravir se incorpora, a través de la ARN-polimerasa ARN-dirigida viral, al genoma determinando un acúmulo de mutaciones que determinan el denominado "error catastrófico" viral [14,18,19]. La forma activa de este fármaco se presenta en dos formas químicas; (a) la oxima que se asemeja a la uridina y se une a la adenosina; y (b) su forma tautómera que se asemeja a la citidina y se une a la guanosina, pudiendo integrarse en cualquier cadena genética [17]. Uno de los efectos adversos de los análogos ribonucleósidos es sobre la función mitocondrial. Sin embargo, se ha observado que el molnupiravir no produce ninguna toxicidad mitocondrial ni afecta a su funcionalidad [20].

Cox et al. [21] han realizado una serie de estudios en humanos para conocer la capacidad del molnupiravir para bloquear la replicación y transmisión del SARS-CoV-2. Los primeros datos demuestran la eficacia oral de este fármaco en la infección activa y su disminución a nivel del parénquima pulmonar. Además, comprueban los escasos efectos adversos que produce. Este fármaco alcanza en chimpancés y hurones, tras la administración de una dosis oral de 130 o 10 mg/Kg, unas concentraciones plasmáticas superiores a 0,5 μ M a las 12

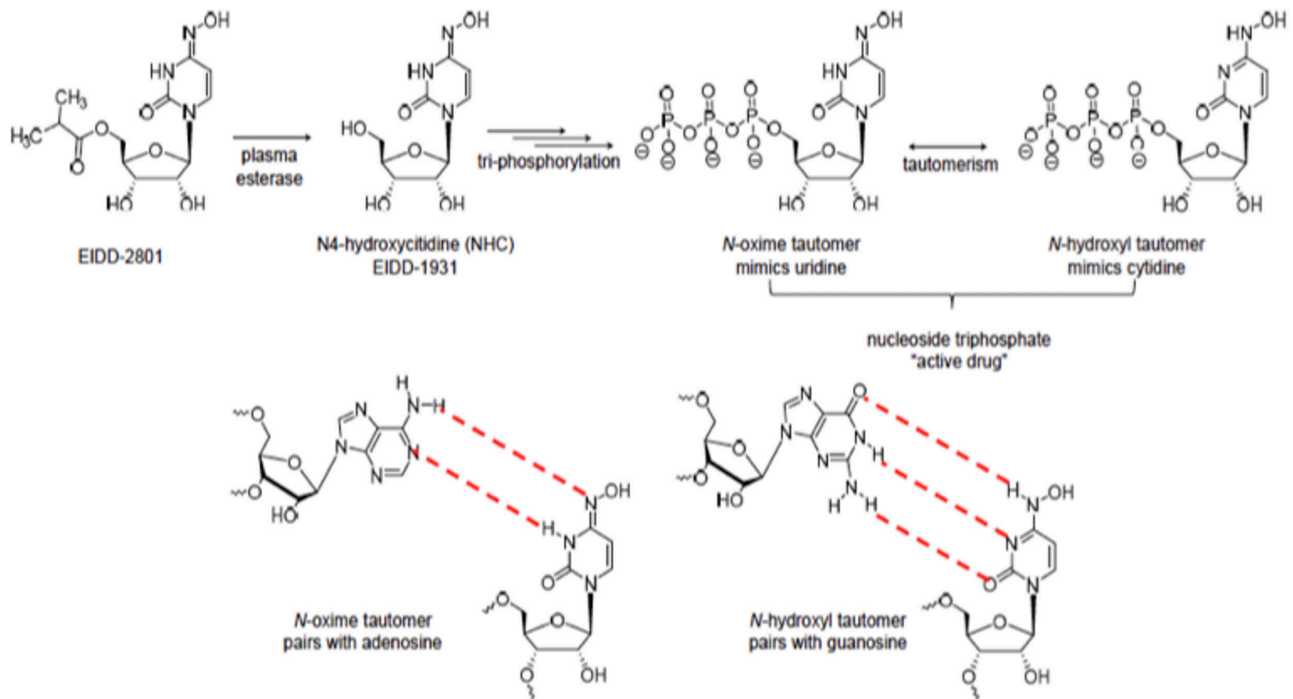


Figura 4 Estructura química de molnupiravir con sus dos formas químicas: la oxima semejante a uridina y su tautómera semejante a guanosina (tomado de Al-Horani et al.[17] (CC BY 4.0).

horas después del inicio del tratamiento. Se observa una drástica reducción de la carga viral en la orofaringe a las 24 horas tras el inicio del tratamiento y un descenso progresivo de su eficacia si se retrasa este inicio. Esta reducción determina un bloqueo en la transmisión del SARS-CoV-2 entre los hurones y el acortamiento del periodo infeccioso. Por ello su recomendación es la administración lo más precozmente posible (primeras 24-48 horas) para reducir las elevadas cargas virales de estos días y evitar el inicio de los procesos inflamatorios. Con ello se disminuiría el progreso de la infección, las complicaciones y la transmisión de las personas infectadas [21].

En el estudio animal de Wahl et al. [20] se observa como el molnupiravir posee un intenso efecto sobre la replicación del SARS-CoV-2 que se detecta a las 48 horas de su administración oral. De este modo reduce la carga viral en parénquima pulmonar unas 25.000 veces (4,4 log) cuando el tratamiento se inicia a las 24 horas post-infección. Si se inicia a las 48 horas, la reducción de la carga viral es de un 96% (1.5 log). En su aspecto preventivo, el tratamiento pre-exposición reduce significativamente (unas 100.000 veces) la carga en el tejido pulmonar humano y su efecto es mayor si el inicio es muy precoz.

Este fármaco se está estudiando en ensayos clínicos multicéntricos en Fase I/II, en los que se ha observado que consigue niveles en sangre humana seguros y que exceden las concentraciones del antiviral necesarias para inhibir la replicación viral en los cultivos de células epiteliales respiratorias humanas (EC_{50} de 0,5-1 μ M). En estos ensayos se están utilizando do-

sis de 1.600 mg/dos veces al día, que sería la equivalente a la utilizada en ratones y hurones [20]. Estamos a la espera del resultado de estos ensayos clínicos, pero los datos obtenidos en ratones parecen aportar un optimismo terapéutico.

FINANCIACIÓN

El autor declara no haber recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

El autor declara no tener ningún conflicto de intereses

BIBLIOGRAFÍA

1. Liang C, Tian L, Liu Y, Hui N, Qiao G, Li H et al. A promising antiviral candidate drug for the COVID-19 pandemic: a mini-review of remdesivir. *Eur J Med Chem* 2020; 201:112527. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112527.
2. Reina J. Remdesivir, la esperanza antiviral frente al SARS-CoV-2. *Rev Esp Quimoter* 2020; 33:176-9. doi:10.37201/req/028.2020.
3. Gordon DE, Jang GM, Bouhaddou M, Xu J, Obernier K, O'Meara MJ et al. A SARS-CoV-2-human protein-protein interaction map reveals drug targets and potential drug-repurposing. *bioRxiv* 2020. doi:10.1101/2020.03.22.002386.

4. Gordon DE, Hiatt J, Bouhaddou M, Rezelj V, Ulferts S, Braberg H et al. Comparative host-coronavirus protein interaction networks reveal pan-viral disease mechanisms. *Science* 2020; 370. doi:10.1126/science.abe9403.
5. Bojkova D, Klann K, Koch B, Widera M, Krause D, Ciesek S et al. Proteomics of SARS-CoV-2-infected host cells reveals therapy targets. *Nature* 2020; 583:469-72. doi:10.1038/s41586-020-2332-7.
6. Brønstrup M, Sasse F. Natural products targeting the elongation phase of eukaryotic protein biosynthesis. *Nat Prod Res* 2020. doi:10.1039/d0np00011f.
7. Sammaibashi S, Yamayoshi S, Kawaoka Y. Strain-specific contribution of eukaryotic elongation factor 1 gamma to the translation of influenza A virus proteins. *Front Microbiol* 2018; 9:1446. doi:10.3389/fmicb.2018.01446.
8. Wei T, Li D, Marcial D, Khan M, Lin MH, Snape N et al. The eukaryotic elongation factor 1A is critical for genome replication of the paramyxovirus respiratory syncytial virus. *PLoS One* 2014; 9:e114447. doi:10.1371/journal.pone.0114447.
9. Barreca M, Spano V, Montalbano A, Cueto M, Diaz Marrero AR, Deniz I et al. Marine anticancer agents: an overview with a particular focus on their chemical classes. *Mar Drugs* 2020; 18:619. doi:10.3390/md18120619.
10. Alonso-Alvarez S, Pardo E, Sanchez-Nieto D, Navarro M, Caballero MD, Mateos MV et al. Plitidepsin: design, development and potential place in therapy. *Drug Des Devel Ther* 2017; 11:253-64. doi:10.2147/DDDT.S94165.
11. White KM, Rosales R, Yildiz S, Kehrer T, Miorin L, Moreno E et al. Plitidepsin has a potent preclinical efficacy against SARS-CoV-2 by targeting the host protein eEF1A. *Science* 2021. doi:10.1126/science.abf4058.
12. Reuschl AK, Thorne LG, Zuliani-Alvarez L, Bouhaddou M, Obernier K, Soucheray M et al. Host-directed therapies against early-lineage SARS-CoV-2 retain efficacy against B.1.1.7 variant. *bioRxiv* 2021. doi:10.1101/2021.01.24.427991.
13. Estudio prueba de concepto multicéntrico, aleatorizado, paralelo, abierto, para evaluar el perfil de seguridad de tres dosis de plitidepsina en pacientes con COVID-19 que precisen ingreso hospitalario (APLICOV-PC). Registrado en: <https://reec.aemps.es/reec/public/detail.html>. Identificador 2020-001993-31.
14. Puijssers AJ, Denison MR. Nucleoside analogues for the treatment of coronavirus infections. *Curr Opin Virol* 2019; 35:57-62. doi:10.1016/j.coviro.2019.04.002.
15. Vasudevam N, Ahlqvist GP, McGeough CP, Paymode DJ, Cardoso FS, Lucas T et al. A concise route to MK-4482 (EIDD-2801) from cytidine. *Chem Commun* 2020; 56:13363-4. doi:10.1039/d0cc05944g.
16. Shilatifard A. COVID-19: rescue by transcriptional inhibition. *Sci Adv* 2020; 6:eabc6891. doi:10.1126/sciadv.abc6891.
17. Al-Horani RA, Kar S. Potential anti-SARS-CoV-2 therapeutics that target the post-entry stages of the viral life cycle: a comprehensive review. *Viruses* 2020; 12:1092. doi:10.3390/v12101092.
18. Robson F, Khan KS, Le TK, Paris C, Demirbag S, Barfuss P et al. Coronavirus RNA proofreading: molecular basis and therapeutic targeting. *Mol Cell* 2020. doi:10.1016/j.molcel.2020.07.027.
19. Sheahan TP, Sims AC, Zhou S, Graham RL, Puijssers AJ, Agostini ML et al. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. *Sci Transl Med* 2020. doi:10.1126/scitranslmed.abb5883.
20. Wahl A, Gralinski LE, Johnson CE, Yao W, Kovarova M, Dinnon KH et al. SARS-CoV-2 infection is effectively treated and prevented by EIDD-2801. *Nature* 2021. doi:10.1038/s41586-021-03312-w.
21. Cox RM, Wolf JD, Plemper RK. Therapeutically administered ribonucleoside analogue MK-4482 (EIDD-2801) blocks SARS-CoV-2 transmission in ferrets. *Nature Microbiol* 2021. doi:10.1038/s41564-020-00835-2.