

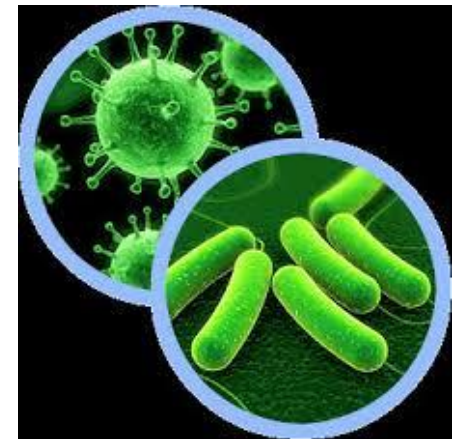
# ΙΟΙ

- **Γενετικό υλικό DNA ή RNA** προστατεύεται από πρωτεϊνικό, αλλά όχι οπωσδήποτε και από λιπιδικό περίβλημα
- **Εξαιρετική ικανότητα πολλαπλασιασμού**, ανικανότητα πρωτεϊνοσύνθεσης → ενδοκυτταρικά παράσιτα.
- **Πιθανά παθογόνοι** (μολυσματικοί παράγοντες): ευλογιά, γρίπη, AIDS, SARS. Η μελέτη τους ενδιαφέρει βιολογία/ιατρική/φαρμακευτική

**Ονοματολογία**, ανάλογα με:

- Το μέγεθος (10 - 1000 nm, *picornaviruses*)
- Το σχήμα (*Rhabdoviruses*)
- Την ασθένεια (*Herpes viruses, HIV*)
- Την περιοχή απομόνωσης (*Cocksackie viruses*)
- Τον τροπισμό (Αδενοϊοί)
- **Το γενετικό υλικό (DNA / RNA ιοί)**

Wild type, mutants (conditional, host range, attenuated → εμβόλια)  
Viremia, recombination



Είναι πλήρως εξαρτώμενοι από τον μεταβολισμό των κυττάρων-ξενιστών, με σκοπό την ταχεία αναπαραγωγή τους.

## ΔΟΜΗ του ιϊκού σωματίου

**Πρωτεϊνικό κέλυφος:** κάψα / καψομερή – εικοσαεδρική συμμετρία

**Περίβλημα (envelope):** (επιφανειακά αντιγόνα)

**Γονιδίωμα:** DNA ή RNA (μονόκλωνο, ή δίκλωνο)

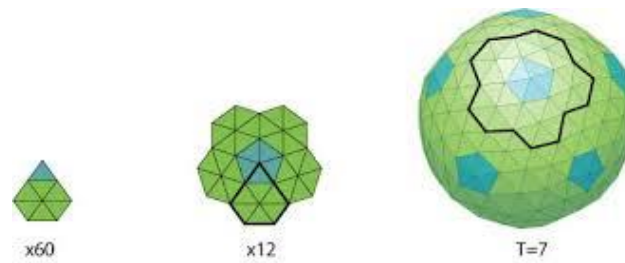
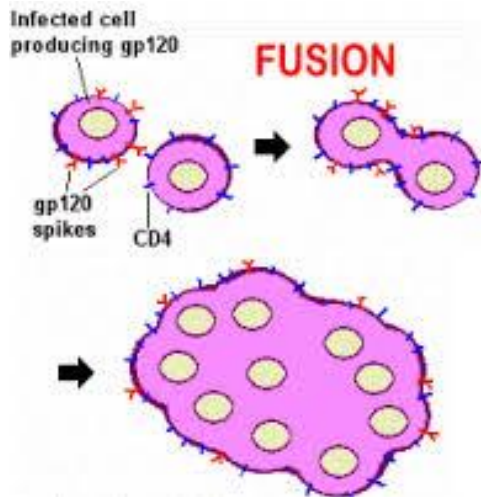
**+RNA** (θετικής πολικότητας, sense RNA, sRNA)  $\rightarrow$  **+mRNA**

**-RNA** (αρνητικής πολικότητας, antisense RNA) μη μολυσματικός παράγοντας (**-RNA  $\rightarrow$  +mRNA**)

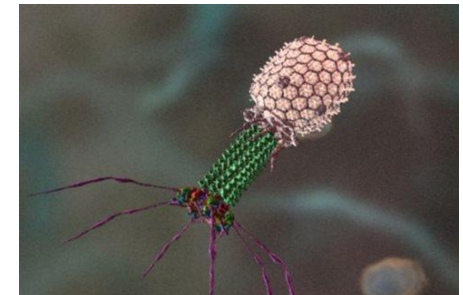
**Δίκλωνο (+/-) RNA  $\rightarrow$  +mRNA**

**+RNA retroviruses  $\rightarrow$  -DNA  $\rightarrow$  (+/-) DNA  $\rightarrow$  +mRNA**

Οι RNA εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες (RdRp) και οι αντίστροφες μεταγραφάσες (RT) αποτελούν προφανείς θεραπευτικούς στόχους



© 2010  
Swiss Institute of Bioinformatics



## Influenza, flu, grip, grippe

**Ασυμπτωματική - θανατηφόρος** λοίμωξη του αναπνευστικού: 3.000.000-5.000.000 λοιμώξεις, 250.000-650.000 θάνατοι/έτος, κυρίως από ευπαθείς ομάδες (WHO).

**Orthomyxoviridae (-)RNA** ιοί → Influenza A, B, C, D. Οι IVA υποδιαιρούνται σε υποτύπους (πχ H1N1) ανάλογα με την αμινοξική ακολουθία των γλυκοπρωτεϊνών επιφανείας.

### Επιδημίες – Πανδημίες



**Εμβολιασμός – πρόληψη νόσησης (60% επιτυχής)**  
**Φαρμακευτική αγωγή**

- Συμπτωματική θεραπεία: ΜΗΣΥΦΑ
- Αντιγριπικά φάρμακα

## Ο ΙVΑ παρουσιάζει υψηλή νοσηρότητα και συχνότητα μεταλλάξεων

**Αντιγονικό drift:** σταδιακές μεταλλάξεις- ετήσιες επιδημίες

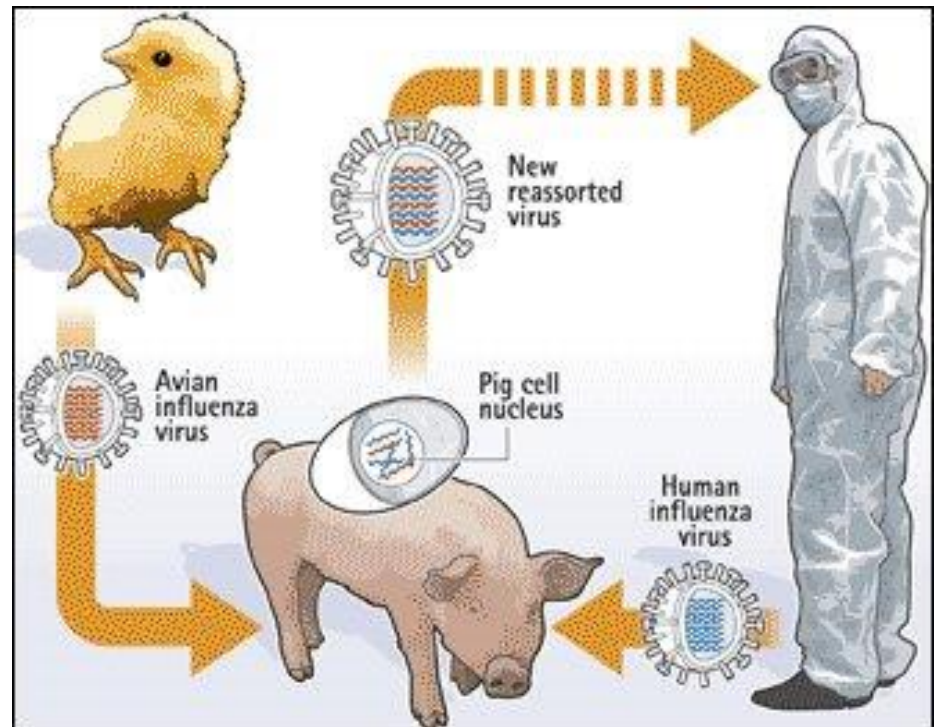
**Αντιγονικό shift:** απουσία αντιγονικής μνήμης => πανδημίες. Τα υδρόβια πουλιά λειτουργούν ως φυσικές αποθήκες του ιού **Influenza A** και περιοδικά μεταδίδουν τη λοίμωξη στα θηλαστικά.

**Ετήσιο πολυδύναμο εμβόλιο (WHO):** cocktail προσφάτως απομονωμένων παθογόνων στελεχών. Υποχρεωτικό για τις ομάδες υψηλού κινδύνου (έγκυες, ηλικιωμένοι, διαβητικοί, καρδιοπαθείς, ασθματικοί). Μείωσε δραματικά, αλλά δεν μηδένισε τα περιστατικά σοβαρής νόσησης.

Ο ιός **Influenza B** προσβάλλει αποκλειστικά τον άνθρωπο: δεν μεταλλάσσεται εύκολα και δεν προκαλεί πανδημίες –είναι όμως εν δυνάμει θανατηφόρος.

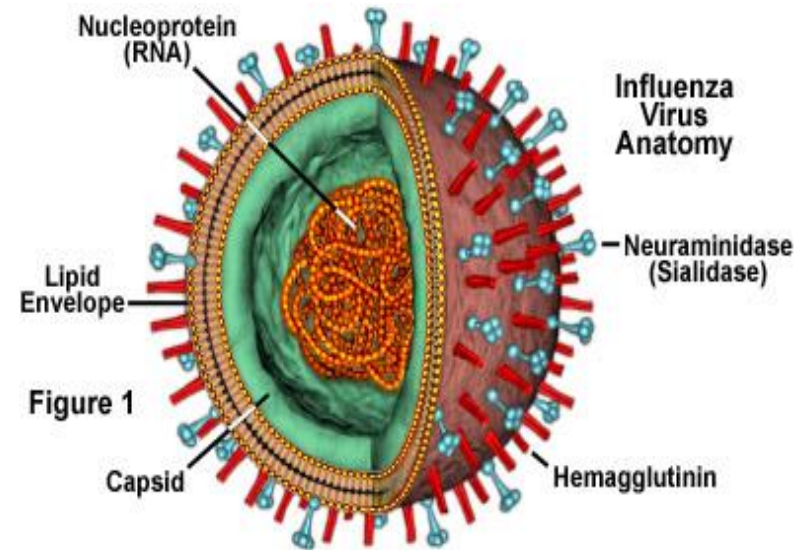
Ο ιός **Influenza C** είναι ελάχιστα παθογόνος, μόνο για παιδιά και ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.

Ο ιός **Influenza D** δεν έχει μελετηθεί επαρκώς.

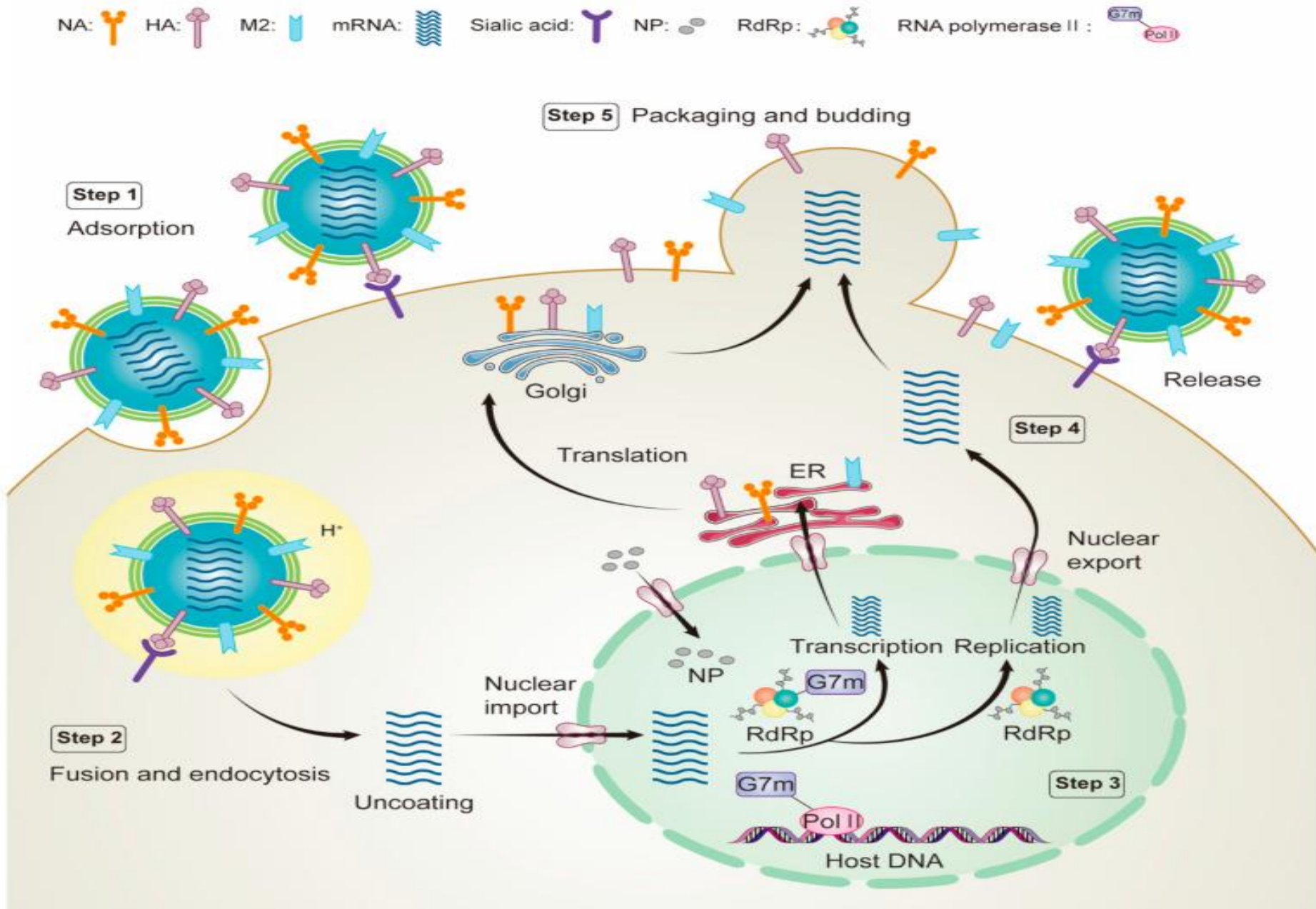


## 11 ιικές πρωτεΐνες

- **Αντιγόνα επιφανείας: Αιμαγλουτινίνη (HA), Νευραμινιδάση (NA)** – η **NA** ως σιαλιδάση επιτρέπει την κίνηση του ιού επί του βλεννογόνου.
- **Πρωτεΐνες μήτρας (Matrix proteins):** Η **M1** επικάθεται εσωτερικά του φακέλου και περικλείει την κάψα, ενώ η **M2** λειτουργεί ως ιοντικός διάυλος πρωτονίων και επάγει τον αποχωρισμό **M1 / νουκλεοπρωτεϊνών**.

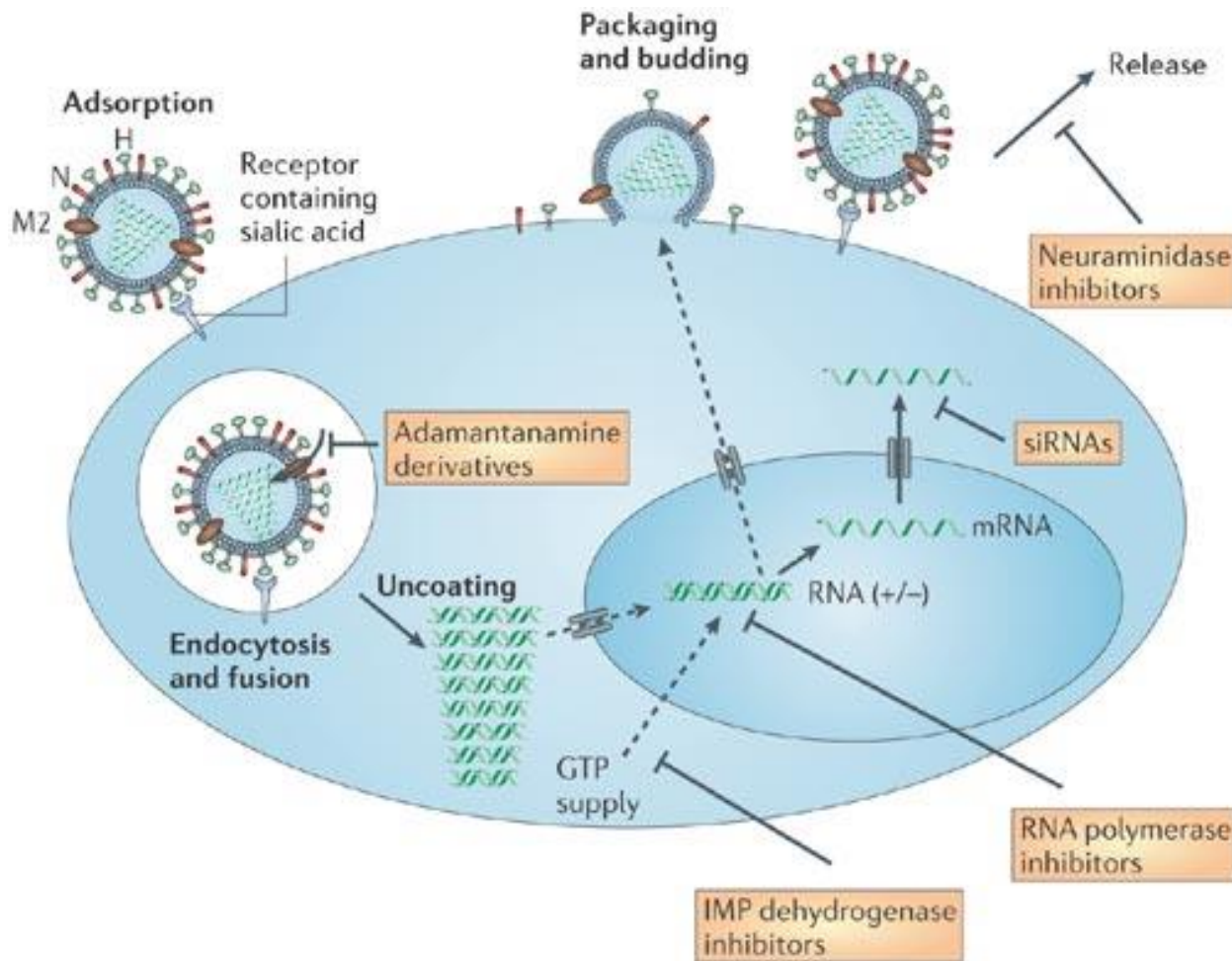


- **Νουκλεοκαψίδιο (nucleocapsid):** περικλείει 8 (IVA και IVB) ή 7 (IVC) μονόκλωνα ελικοειδή – ssRNA.
- **RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp):** 3 υπομονάδες (polymerase basic proteins 1 και 2, **PB1**, **PB2**, polymerase acidic protein, **PA**). Κάθε ssRNA συμπλέκεται με RdRP και ιικές νουκλεοπρωτεΐνες και σχηματίζουν την ική ριβονουκλεοπρωτεΐνη (**viral ribonucleoprotein particles, vRNPs**) που συμμετέχει στο σχηματισμό των νέων ιικών σωματίων και οδηγεί στη βιοσύνθεση 12 πολυπεπτιδίων.



Ο κύκλος ζωής του ιού influenza είναι σύνθετος και διακρίνεται σε στάδια

Οι **μοριακοί στόχοι των εγκεκριμένων μέχρι σήμερα φαρμάκων είναι ιϊκοί και εκτείνονται σε διάφορα στάδια**. Η αναστολή οποιουδήποτε εξ αυτών μπορεί δυνητικά να σταματήσει τον πολλαπλασιασμό του ιού και να ελέγξει τη πρόοδο και τη μετάδοση της νόσου. Διερευνάται όμως και η επέμβαση στη αλληλεπίδραση ιού - ξενιστή.



## H2 inhibitors

Arbidol

## M2 inhibitors

Amantadine  
Rimantadine

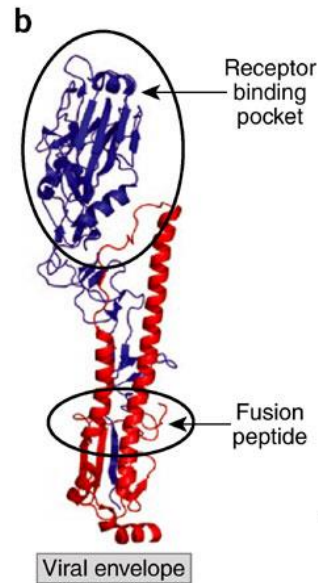
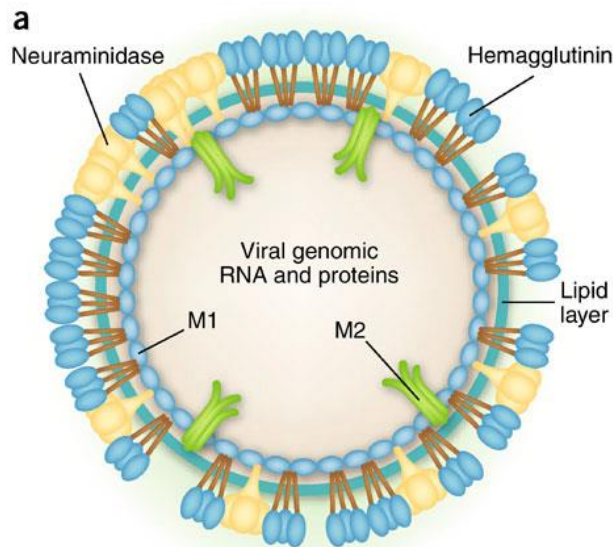
## Neuraminidase inhibitors

Zanamivir  
Oseltamivir  
Peramivir  
Laniramide octanoate

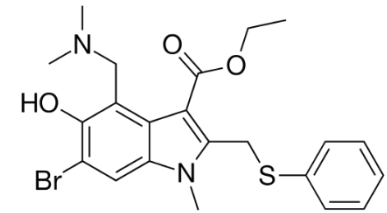
## Polymerase inhibitors

Ribavirin  
Favipiravir  
Baloxavir marboxil

## ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΙΜΑΓΛΟΥΤΙΝΙΝΗΣ (HA)



HA1  
S  
/  
S  
HA2



**Arbidol**  
IC<sub>50</sub>: 2-21μM

Όταν η **ομοτριμερής πρωτεΐνη HA** προσδένεται σε **κυτταρικούς υποδοχείς τελικούς σε σιαλικό οξύ** αρχίζει η διαδικασία ενδοκύτωσης+απέκδυσης του γενετικού υλικού του ιού, με τη συμμετοχή της M2. Το σιαλικό οξύ συνδέεται με  $\alpha$ -2,6-δεσμό σε γαλακτόζη του γλυκανικού υποδοχέα των επιθηλιακών κυττάρων.

Λόγω του **όξινου pH** του ενδοσώματος μεταβάλλεται η διαμόρφωση της HA: διασπάται ο **δισουλφιδικός δεσμός HA1-S-S-HA2** που ενώνει τα δύο τμήματα κάθε υπομονάδας και το **HA2 (πεπτίδιο ενσωμάτωσης, fusion peptide)** αλληλεπιδρά με τις μεμβράνες του ενδοσώματος.

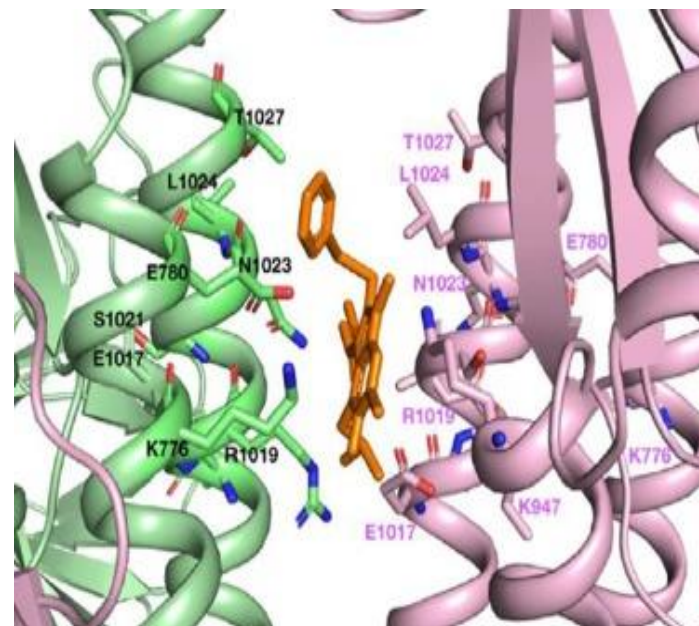
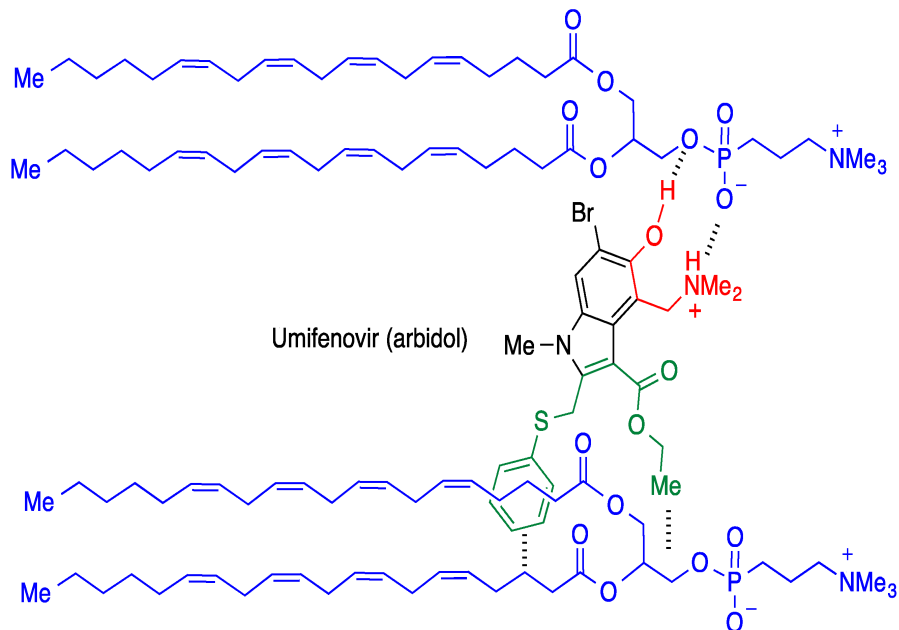
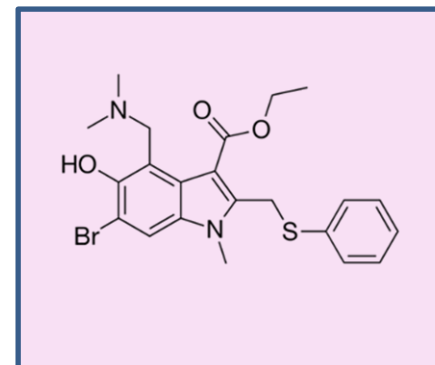
**Το Arbidol (Umifenovir) συνδέεται στην μεσεπιφάνεια HA1-HA2 και ενισχύει την πρόσδεση της HA σε κυτταρικούς υποδοχείς, αυξάνοντας την σταθερότητα της HA στο όξινο περιβάλλον.**

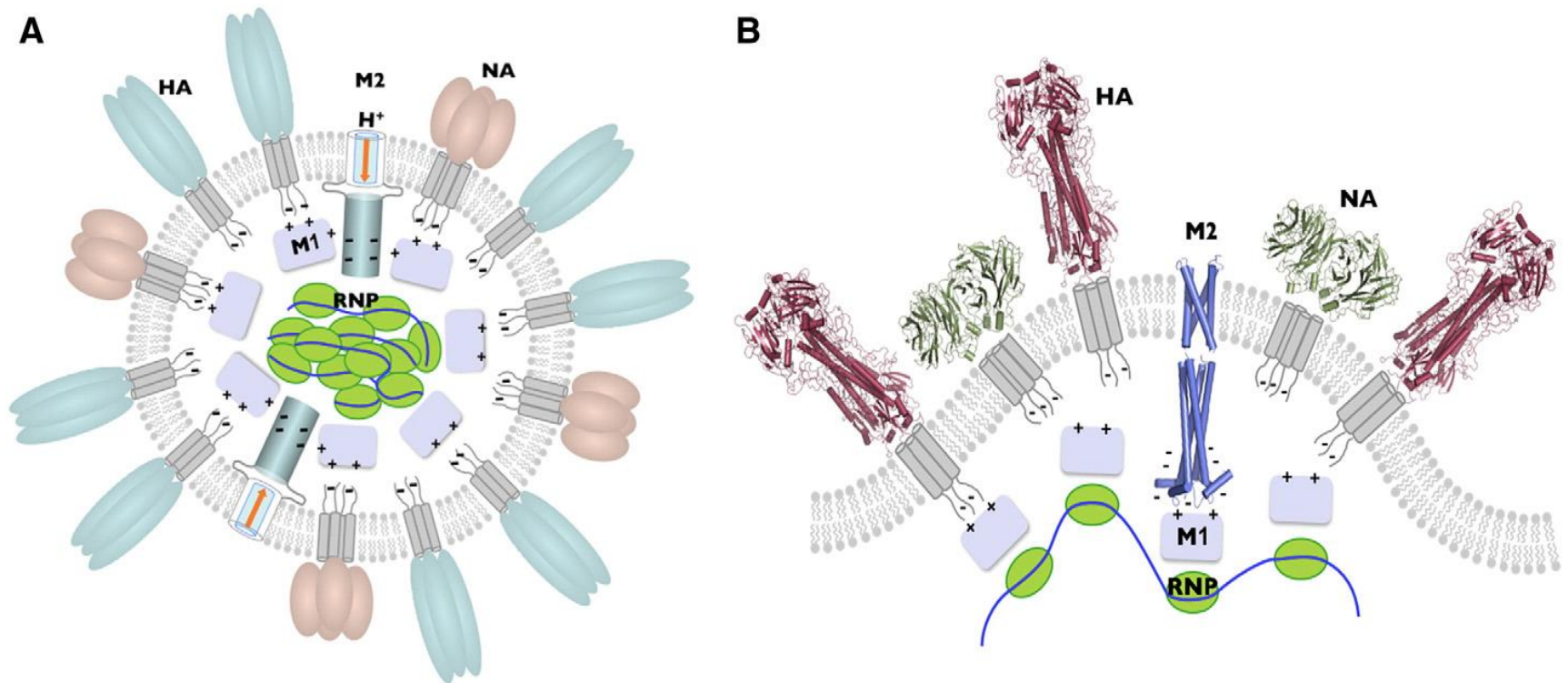
Το ινδολικό παράγωγο **Arbidol** αλληλεπιδρά με αμινοξικά υπόλοιπα μεμβρανικών πρωτεϊνών και η διμεθυλαμινομάδα του **σχηματίζει δεσμό τύπου άλατος** με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες των φωσφολιπιδίων. Ενισχύει την αλληλεπίδραση της HA με την κυτταρική μεμβράνη και αναστέλλει τις διαμορφωτικές αλλαγές, που είναι αναγκαίες για την απέκδυση του γενετικού υλικού του ιού.

Το **Arbidol (Umifenovir)** είναι ευρέως φάσματος αντιϊκό έναντι RNA ιών Influenza A, και B, Zika, Ebola, HCV, SARS-CoV-2.

**Κυκλοφορεί για τη θεραπεία ιώσεων του αναπνευστικού σε Ρωσία και Κίνα.**

Εμφάνιση αντοχής.

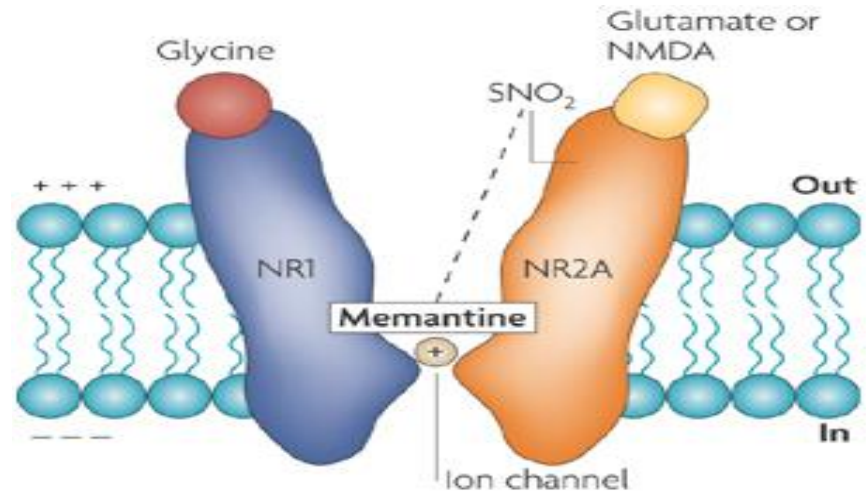
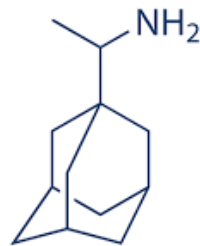
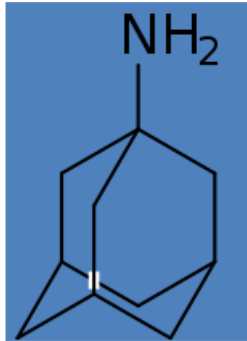




## Αναστολείς της λειτουργίας της M2 – δραστικοί μόνο έναντι influenza A

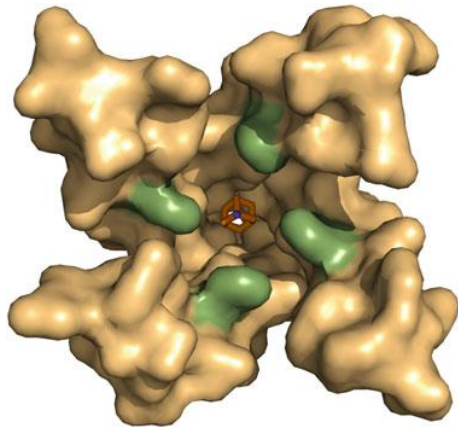
Στο όξινο περιβάλλον του ενδοσώματος η **M2** λειτουργεί ως διάυλος  $H^+$ : οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ **M1** και **RNP** ελαττώνονται και επάγεται η απόδοση του **vRNA (-RNA)** στο κυτταρόπλασμα. Ακολουθεί η μεταφορά του στον πυρήνα και η μεταγραφή.

Οι **M1** και **M2** θα λάβουν αργότερα μέρος και στην **υκή ωρίμανση (maturation)** και τη διαδικασία σχηματισμού του νέου ιικού φακέλου.



**Αδαμανταναμίνες:** Τα φάρμακα **Amantadine** και **Rimantadine** αναστέλλουν την αγωγιμότητα της M2 επειδή **σταθεροποιούν την κλειστή διαμόρφωση του διαύλου**.

- **To Amantadine** (1-αδαμανταναμίνη): είναι καλά ανεκτό, αλλά μπορεί να εμφανίσει παρενέργειες από το ΚΝΣ (ζάλη, εφιάλτες, παραισθήσεις).
- **To Rimantadine** [1-(1-αδαμαντυλο)αιθαναμίνη] είναι καλύτερα ανεκτό, με λιγότερες παρενέργειες από το ΚΝΣ.

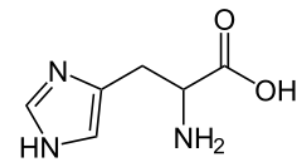


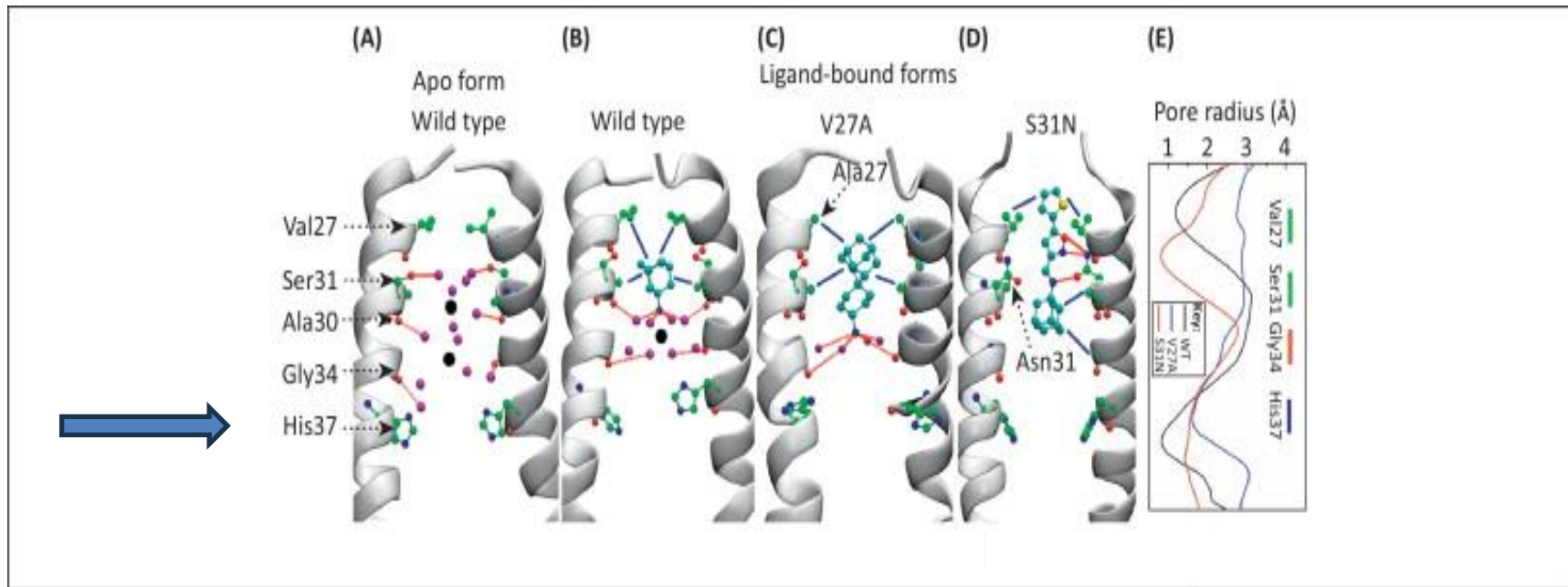
Η M2 είναι ομοτετραμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Κάθε υπομονάδα της διαθέτει ένα καλά ελικωμένο αμινοτελικό άκρο (αμινοξέα 1-23), διαμεμβρανικό τμήμα (24-46) και καρβοξυτελικό άκρο (47-97), που αλληλεπιδρά με την M1. Οι αδαμανταναμίνες δεσμεύονται στη διαμεμβρανική περιοχή.

- Το **Amantadine** ( $IC_{50}$  16  $\mu$ M) αλληλεπιδρά κυρίως στο τμήμα μεταξύ **Val27 - His37**
- Το **Rimantadine** ( $IC_{50}$  11  $\mu$ M) δεσμεύεται σε μια διαφορετική, «αλλοστερική» θέση

Τα 4 σχεδόν επιφανειακά υπόλοιπα ιστιδίνης (**His37**) πρωτονιώνονται στο όξινο περιβάλλον του ενδοσώματος και απωθούνται, με αποτέλεσμα τη διάνοιξη του διαύλου και την είσοδο πρωτονίων προς το εσωτερικό του ιού.

Σε υψηλότερες τιμές pH οι ιστιδίνες αυτές συμμετέχουν σε δίκτυο δεσμών H, που κρατά τον διάυλο “κλειστό”.

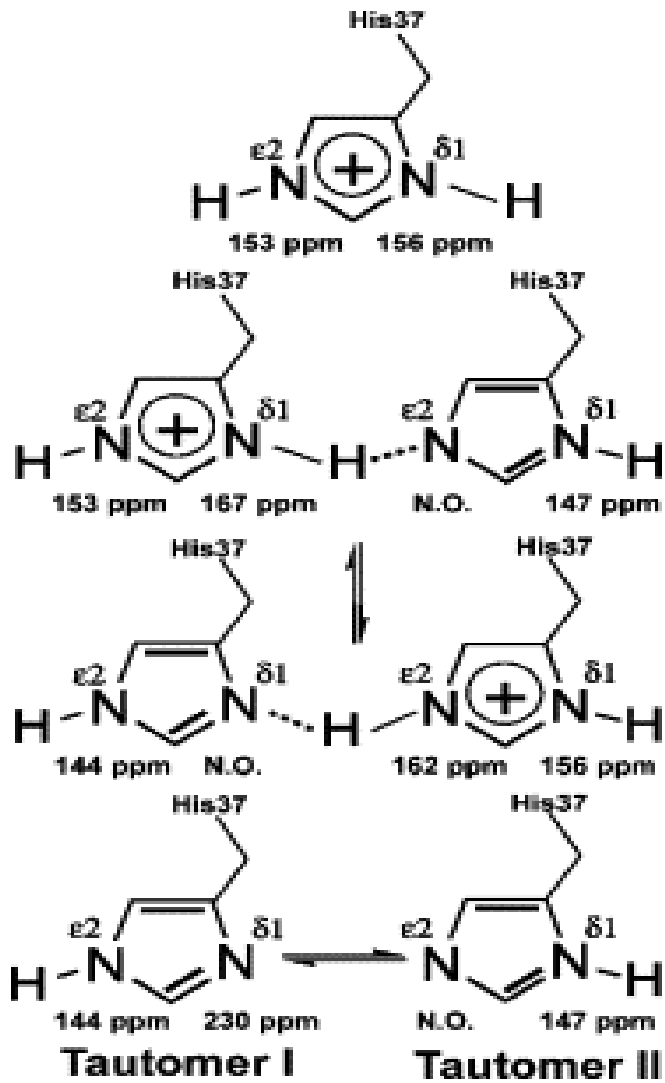




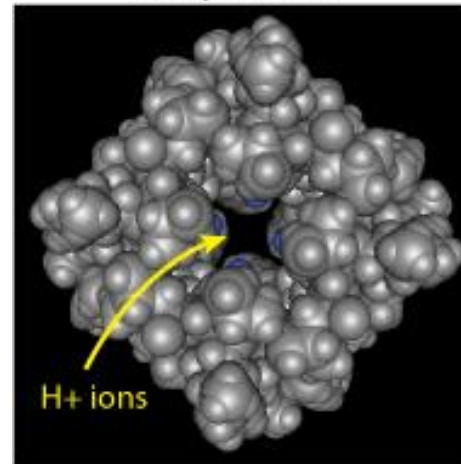
**Απουσία φαρμάκου:** ο διάυλος πάνω από την **His37** είναι «σταθερός» με καλά σχηματισμένες έλικες και καταλαμβάνεται από μόρια  $H_2O$ .

**Παρουσία φαρμάκου:** η φορτισμένη  $NH_3^+$  του **Amantadine** αναπτύσσει ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και το **ογκώδες λιπόφιλο αδαμαντάνιο** αναπτύσσει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, κυρίως με την **Val27**, με αποτέλεσμα να σταθεροποιεί την κλειστή διαμόρφωση του διαύλου και να αναστέλλει την αγωγιμότητα του.

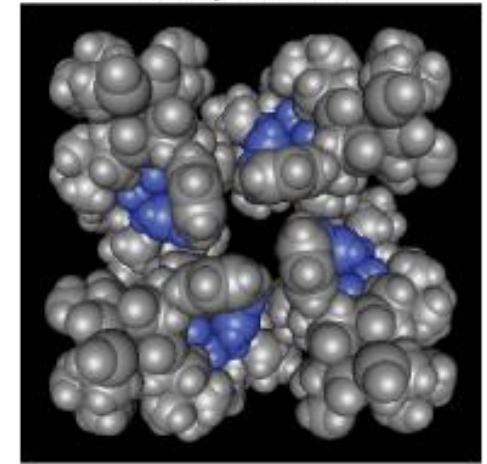
Η παρουσία του **Amantadine**, που εμποδίζει τον σχηματισμό διμερών His - HisH<sup>+</sup> αναστέλλει την αγωγιμότητα του διαλύου



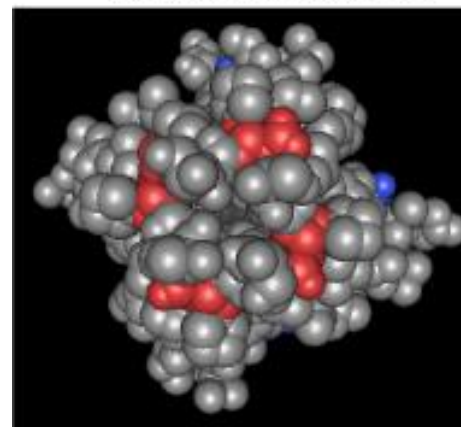
M2 open, front



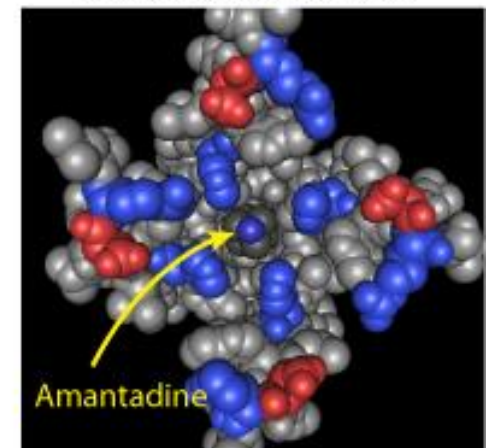
M2 open, back

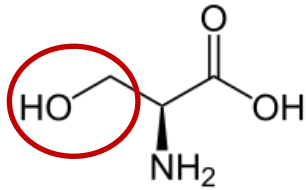


M2 + amantadine, front

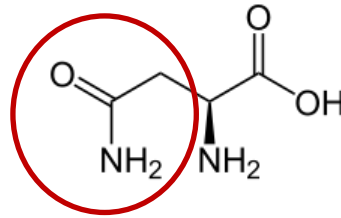


M2 + amantadine, back





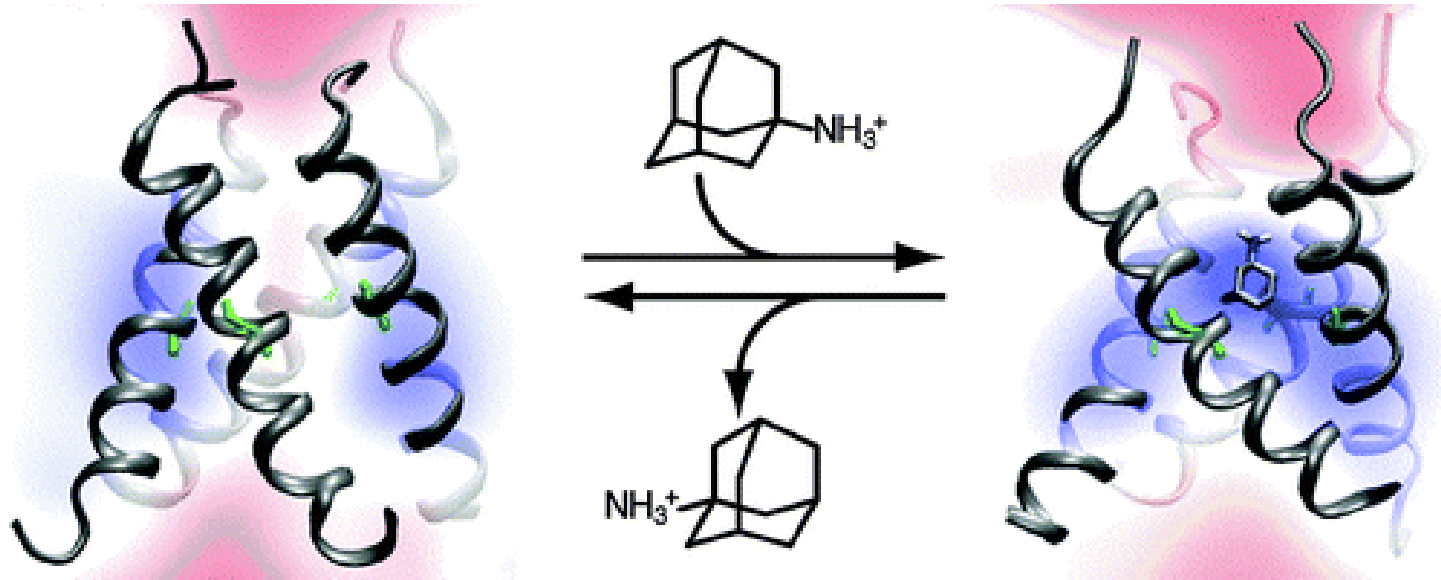
Serine, S



Asparagine, N

Η εκτεταμένη χρήση των παραγώνων αδαμαντανίου σε μεγάλους πληθυσμούς και σε πτηνοτροφικές μονάδες της Ασίας (Ρωσίας + Κίνας) οδήγησε στην **εμφάνιση φαρμακοάντοχων μεταλλάξεων**, στο διμεμβρανικό τμήμα του διαύλου κυρίως με αντικατάσταση των αμινοξέων πάνω από την **His-37**

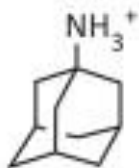
Στο 95% των μεταλλαγμένων στελεχών εντοπίζεται η αλλαγή **S31N**: Ο ογκώδης υποκαταστάτης της Asp εμποδίζει την ανάπτυξη των χαρακτηριστικών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του αδαμαντανίου και της Val27. Η μετάλλαξη δεν σχετίζεται με τις υπόλοιπες λειτουργίες και τη μολυσματικότητα του ιού και ανιχνεύεται πλέον στο 99% του πληθυσμού.



Σε άλλα φαρμακοάντοχα στελέχη η αλλαγή των αμινοξικών υποκαταστατών αποσταθεροποιεί την έλικα => ο διάυλος διευρύνεται και εξασθενεί σημαντικά η πρόσδεση του φαρμάκου.

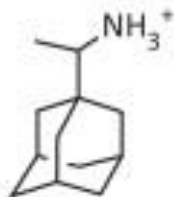
**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ:** διατήρηση της αγωγιμότητας του διαύλου παρά τη παρουσία του φαρμάκου.

(A)



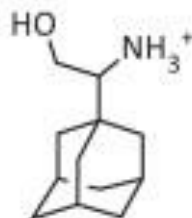
Amantadine [9]

(B)



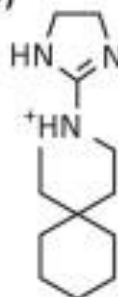
Rimantadine [9]

(C)



Compound A4 [64]

(D)



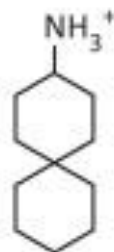
BL-1743 [67]

(E)



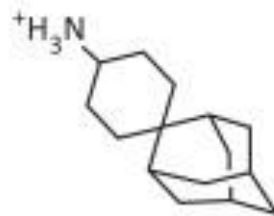
3-azaspiro[5.5]undecane [53]

(F)



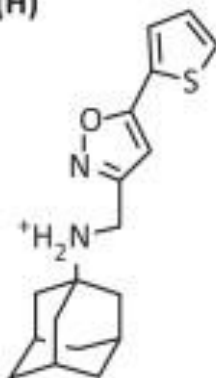
Spiro[5.5]undecan-3-amine [52]

(G)



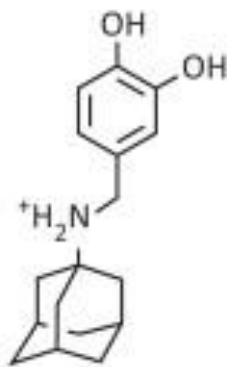
Compound 9 [58]

(H)



M2WJ332 [41]

(I)



Compound 44 [68]

## Drug design

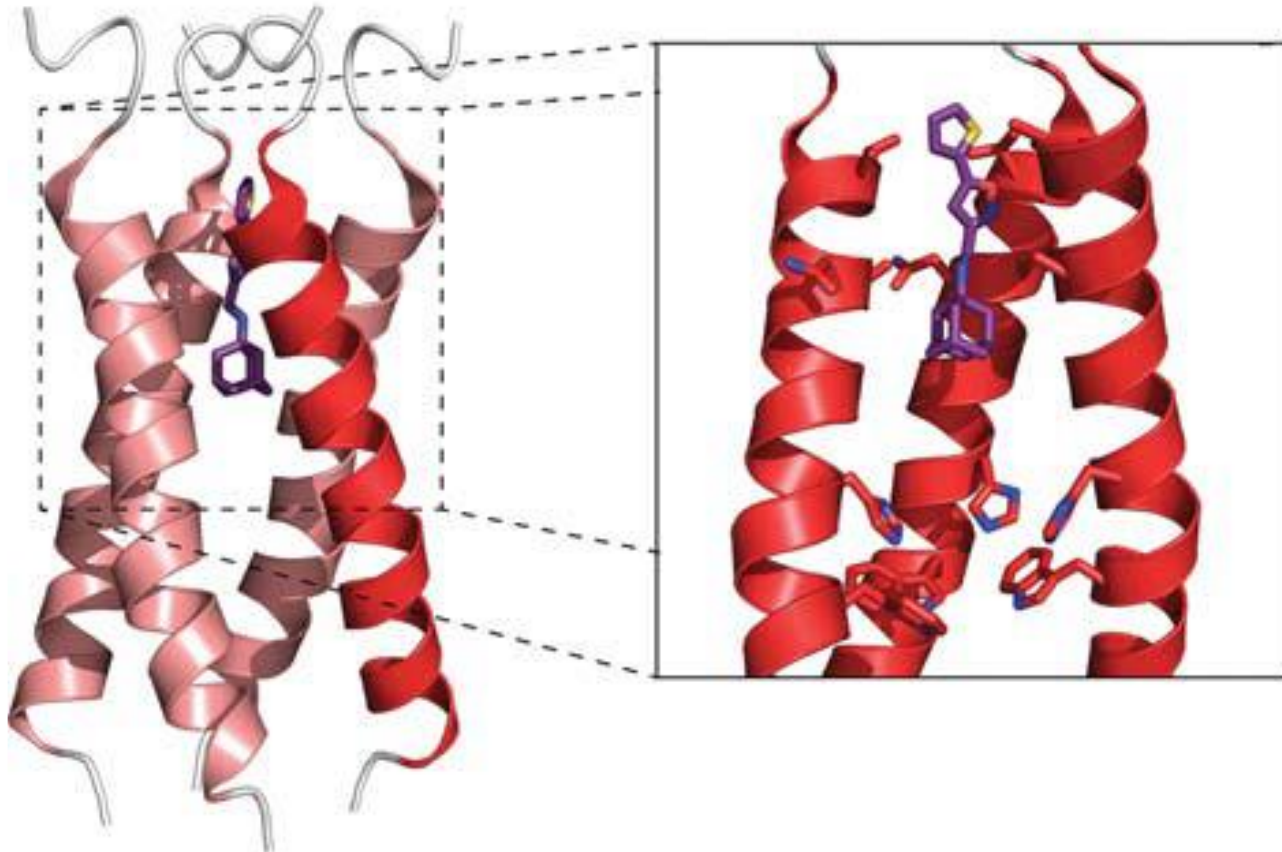
Ο διάυλος είναι «ευκίνητος» και αντέχει την αύξηση του μεγέθους των αναστολέων, που εκτοπίζουν περισσότερα μόρια H<sub>2</sub>O

**Το λιπόφιλο τμήμα πρέπει να παραμείνει αλικυκλικό**, με αύξηση του μεγέθους του για να δρα και στα μεταλλαγμένα στελέχη

**Η εισαγωγή (ετερο) αρωματικού υποκαταστάτη στην αμινομάδα ενισχύει τη δραστηριότητα** λόγω αλληλεπίδρασης με αμινοξέα του διαύλου.

Τα ογκώδη παράγωγα αλληλεπιδρούν όπως το **Amantadine**, με τις **His37 (pH sensor)** και **Val 27 (channel gate)** των τεσσάρων υπομονάδων της M2.

Αυτή η θέση σύνδεσης περιστοιχίζεται από 4 «αλλοστερικές θέσεις» που μπορούν να υποδεχτούν προσδέματα μεγαλύτερα της ριμανταδίνης.



**V27**

**N31**

**H37**

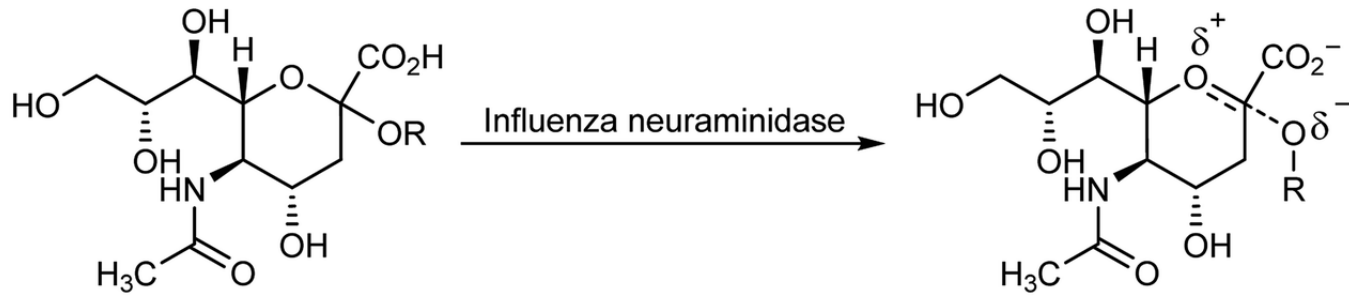
**W47**

## ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΝΕΥΡΑΜΙΝΙΔΑΣΗΣ (NA)

Η τετραμερής NA είναι η δεύτερη σημαντική γλυκοπρωτεΐνη του IV και δρα ως σιαλιδάση, καταλύοντας την υδρόλυση του κυτταρικού υπολοίπου σιαλικού οξέος, που διασφαλίζει τη σύνδεση του ιού με το κύτταρο του ξενιστή. Το ένζυμο αυτό:

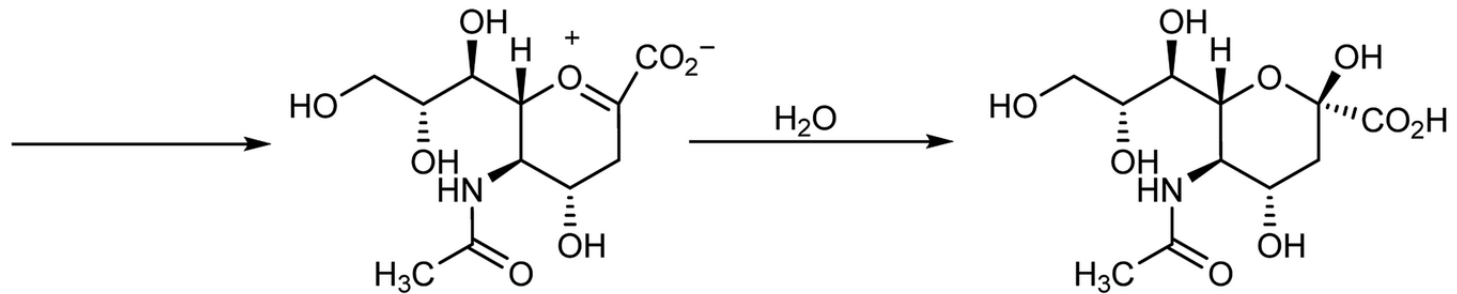
- **έχει κομβικό ρόλο στην απελευθέρωση των νέων ιϊκών σωματίων**, που εξερχόμενα του μολυσμένου κυττάρου δεσμεύονται επί των ειδικών κυτταρικών υποδοχέων.
- **αναστέλλει τη δέσμευση των νέων ιϊκών σωματίων** σε κυτταρικές επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες, που διαθέτουν υπόλοιπο σιαλικού οξέος
- **προλαμβάνει την συσσωμάτωση των νέων ιϊκών σωματίων**, αφού καταλύει την απομάκρυνση των υπόλοιπων σιαλικού οξέος και από τις ιϊκές πρωτεΐνες HA και NA
- **διευκολύνει την μετακίνηση των ιϊκών σωματίων** διαμέσου των εκκρίσεων του ανώτερου αναπνευστικού – αναγκαία για τη διασπορά του ιού και την εισβολή του στο αναπνευστικό επιθήλιο.

## ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΝΕΥΡΑΜΙΝΙΔΑΣΗΣ (ΝΑ)



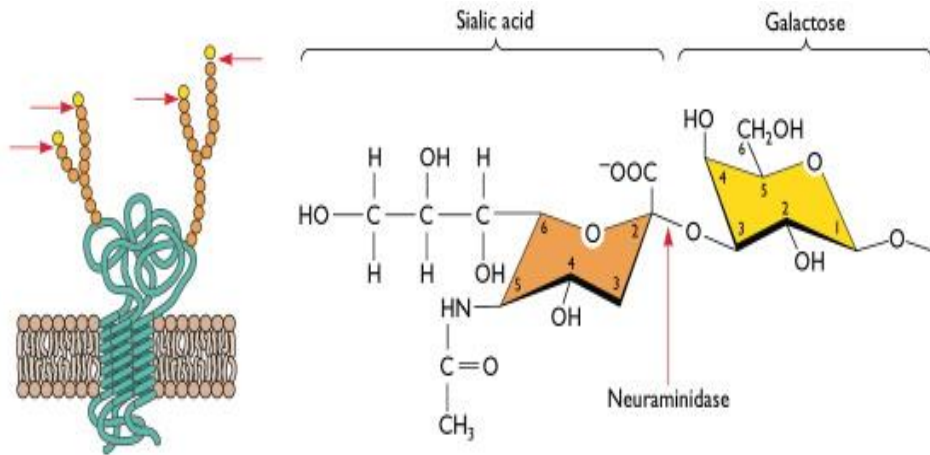
Sialyl  $\alpha$ -glycoside  
R= Glycoprotein

[Transition State]



Oxonium Intermediate

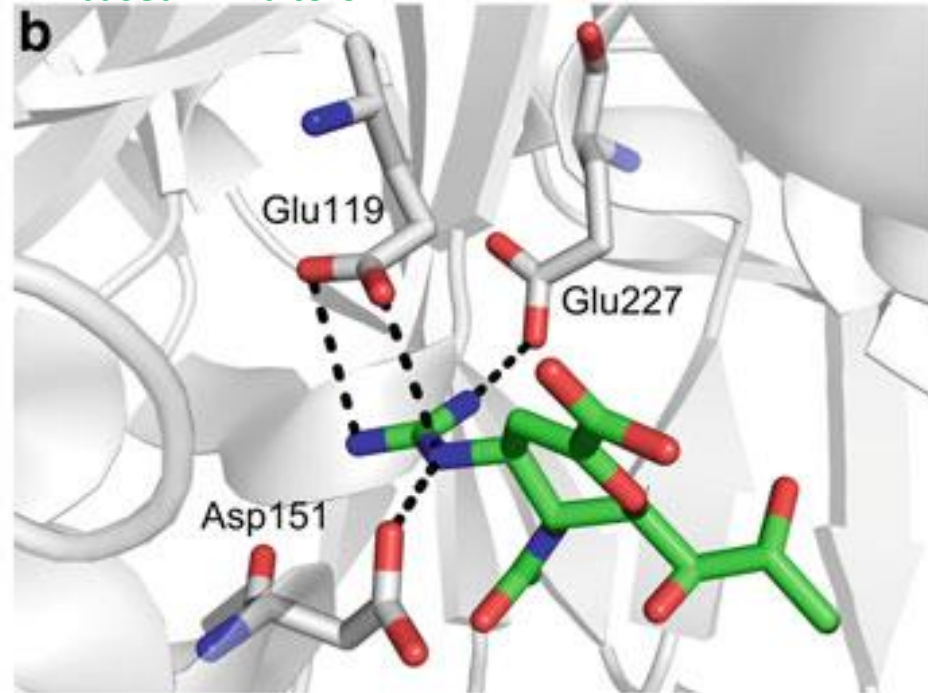
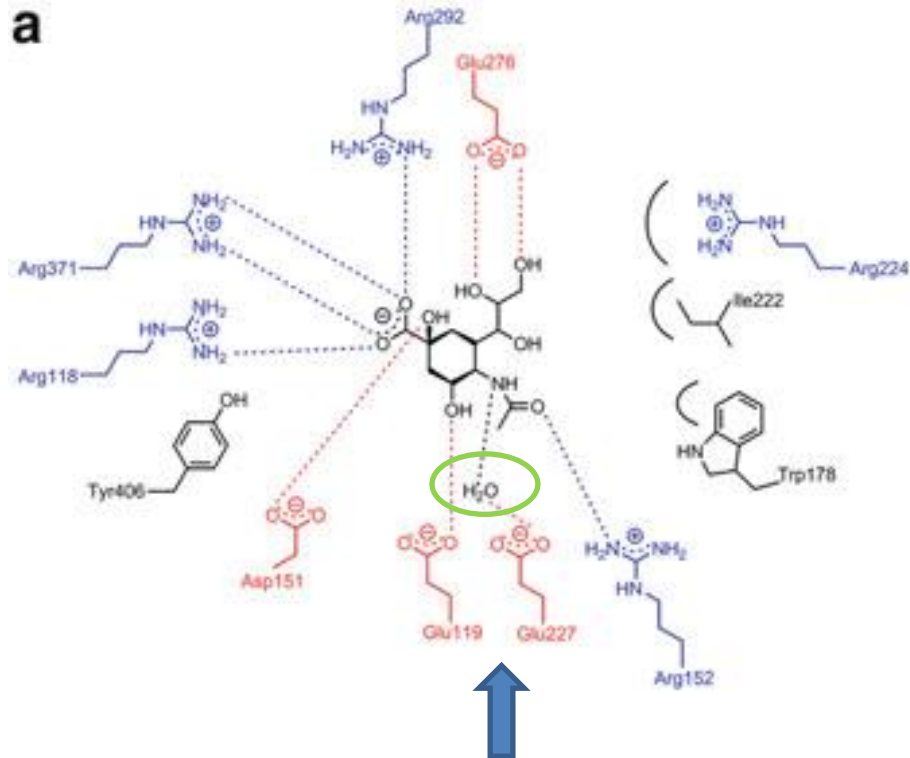
Sialic Acid



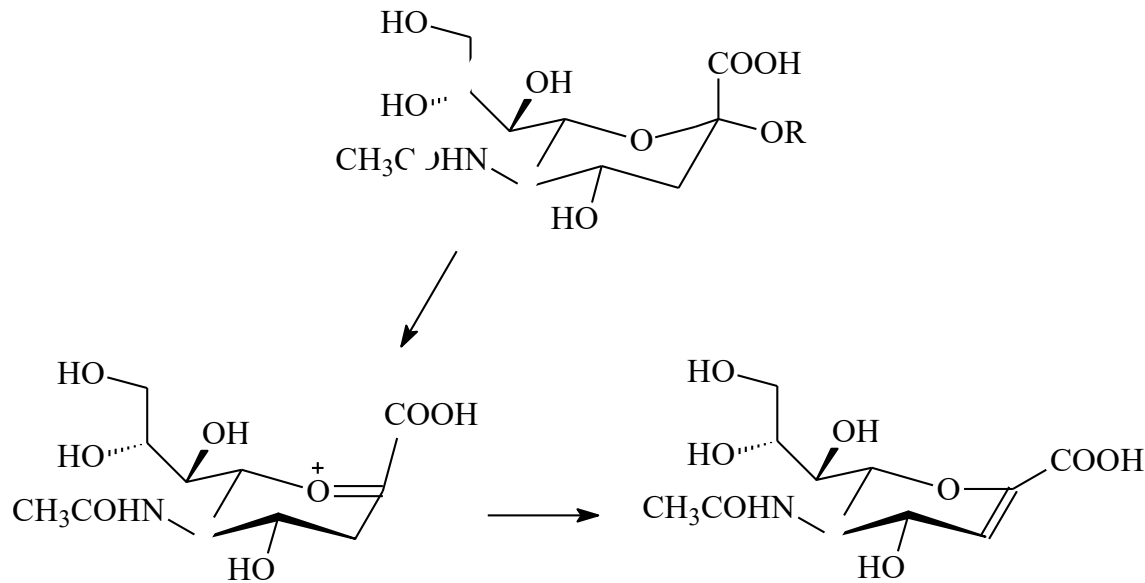
Όταν το σιαλικό οξύ προσδένεται στη ΝΑ:

- το 1-COOH συνδέεται με **3 Arg (118, 292, 371)**.
- η αλυσίδα τύπου γλυκερόλης συνδέεται σε **Glu276**.
- το 3-OH συνδέεται με **Glu (119, 227)** με τη συμμετοχή ενός μορίου H<sub>2</sub>O.

**Ζητούμενο: ανταγωνιστικοί transition state-based inhibitors**



## ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΝΕΥΡΑΜΙΝΙΔΑΣΗΣ



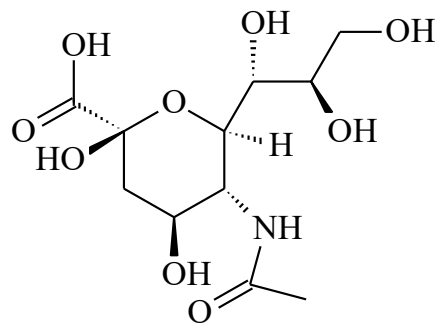
Ενώ το πυρανικό **O** δεν φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στη σύνδεση, η ανάπτυξη δ. άλατος του **1-COOH** με **3** τις βασικές **Arg** ευνοεί τη λήψη διαμόρφωσης ψευδολουτήρα (**boat**).

**Neu5Ac2en:** Το **2,3-διϋδρο-2-δεοξυ-N-ακετυλονευραμιδικό οξύ (DANA)** που μιμείται αυτή τη διαμόρφωση αναστέλλει την HA.

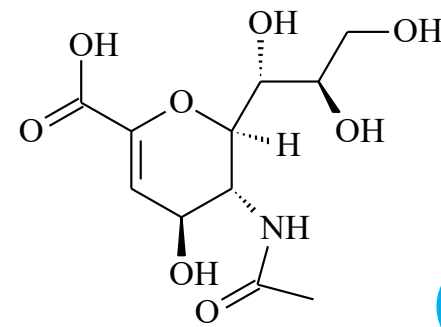
Αντιϊκή δράση *in vitro*

Αδρανές *in vivo* => μεταβολική απενεργοποίηση

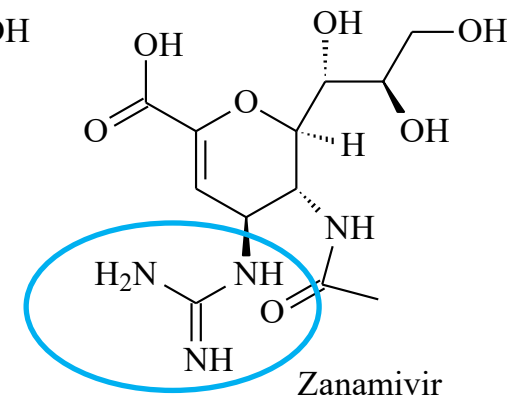
## Παράγωγα πυρανόζης: zanamivir



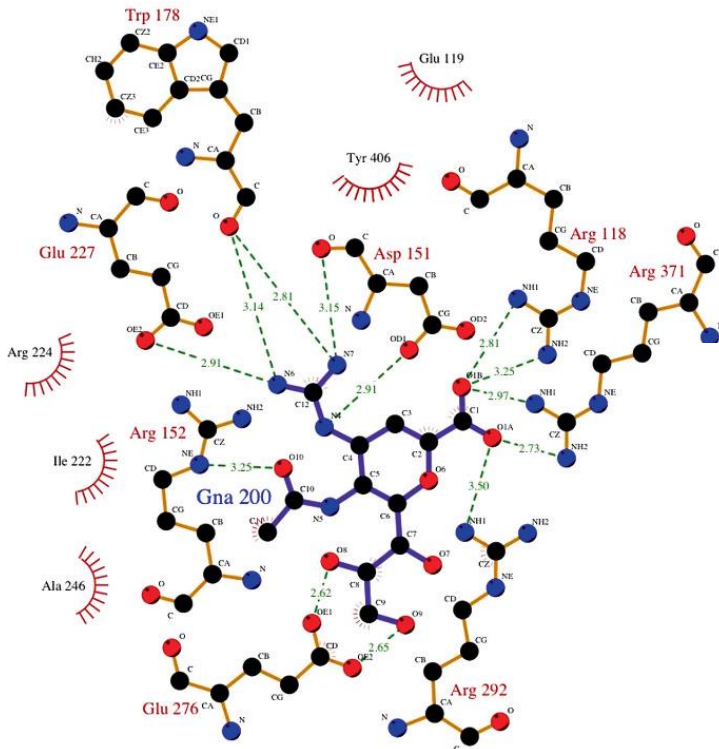
Sialic acid



Neu5Ac2en



Zanamivir



### Zanamivir

- Το **4-OH** που είναι θέση γλυκουρονίωσης, αντικαταστάθηκε από **4-γουανιδινομάδα**, που αλληλεπιδρά ισχυρά με **3 όξινα αμινοξέα** (Glu119, Asp151, Glu227), αυξάνοντας την ισχύ της πρόσδεσης.
- Εντροπικό κέρδος από την εκτόπιση του H<sub>2</sub>O.
- Αύξηση εκλεκτικότητας έναντι της αναστολής ανθρώπινων γλυκοϋδρολασών.

Τα -OH της αλυσίδας τύπου γλυκερόλης παραμένουν και αναπτύσσουν δ.Η με το **Glu276**.

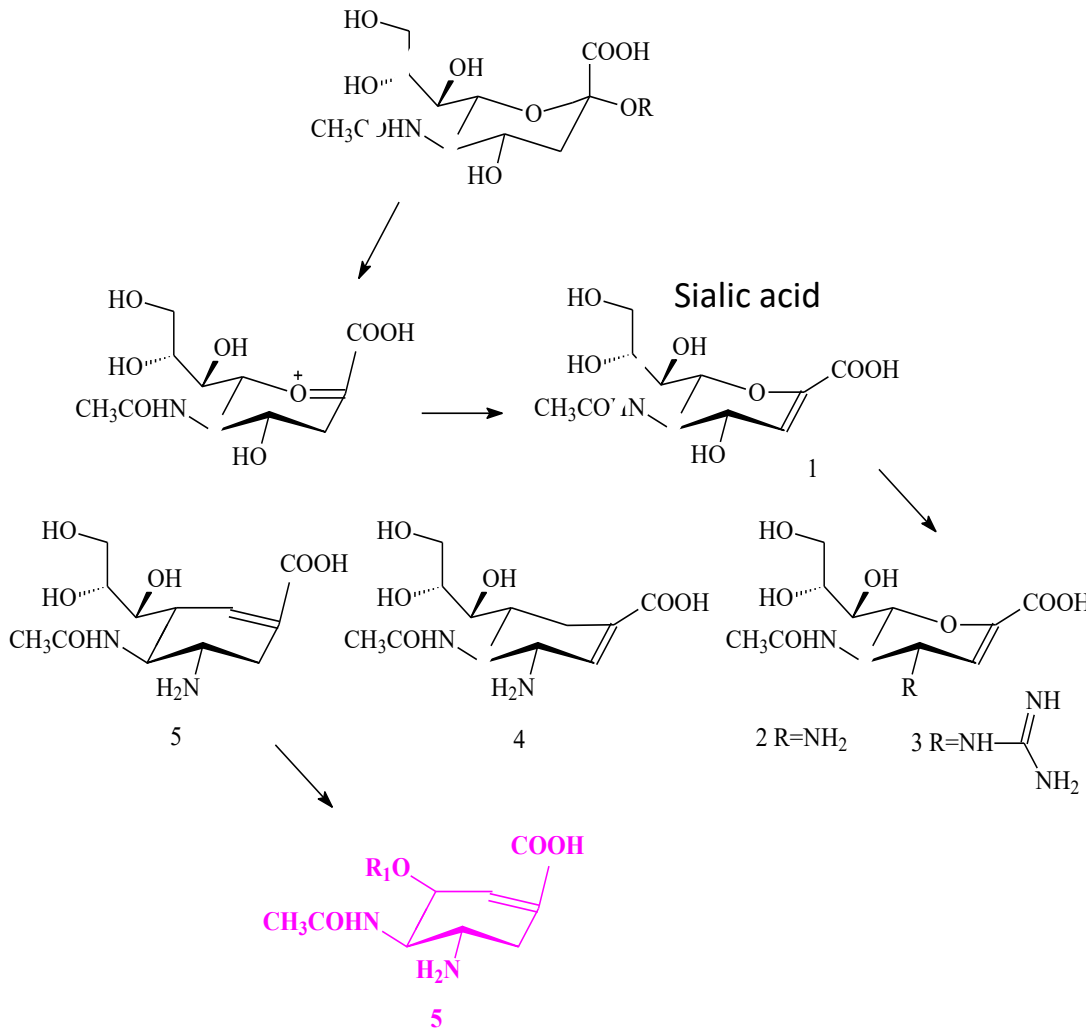
**Η εισπνεόμενη φ/τ μορφή** χρησιμοποιείται θεραπευτικά (σε διάστημα 48h μετά τη προσβολή) και προφυλακτικά. Προβληματική η χορήγηση σε παιδιά, ηλικιωμένους, ασθενείς με αναπνευστικά προβλήματα. **Εγκρίθηκε ενέσιμο ενδοφλέβιο σκεύασμα.**

# Παράγωγα κυκλοξενίου: Oseltamivir per os

1: Neu5Ac2en (2,3 didehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminic acid)

3: Zanamivir, 10-25% OB, χορήγηση με ψεκάσμο

5: Oseltamivir καρβοκυκλικό ανάλογο βιοδιαθέσιμο από το στόμα



Clinical candidate

**Oseltamivir R1=αλκύλιο** → διερεύνηση της θέσης του δδ και αντικατάσταση της γλυκερόλης από αλκυλαιθέρα. Το αιθερικό O εξισορροπεί τη λιποφιλία και δίνει ευκαιρία για SAR: αλλαγή μήκους + όγκου του υποκαταστάτη.

Για R1= -CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> → IC<sub>50</sub> 6.3 μM (1000 φορές δραστικότερο του amantadine έναντι influenza A).

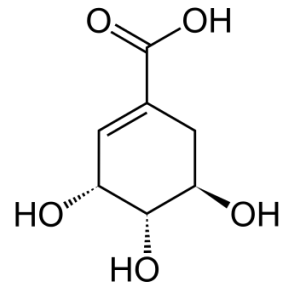
influenza A + B δραστικό.

Θεραπευτικό εύρος 10 000.

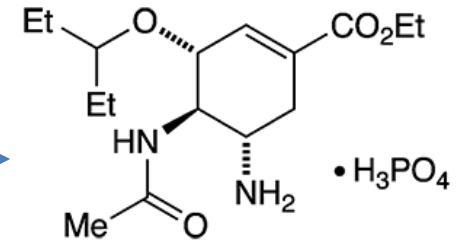
**Ο αιθυλεστέρας του Oseltamivir χορηγείται ως προφάρμακο:**

Τα Zanamivir και Oseltamivir αποδείχθηκαν ιδιαίτερα αποτελεσματικά:

- για την θεραπεία της γρίπης
- για την προφύλαξη πληθυσμού **υψηλής έκθεσης και ρίσκου** πριν και μετά την έκθεση στον λοιμογόνο παράγοντα.



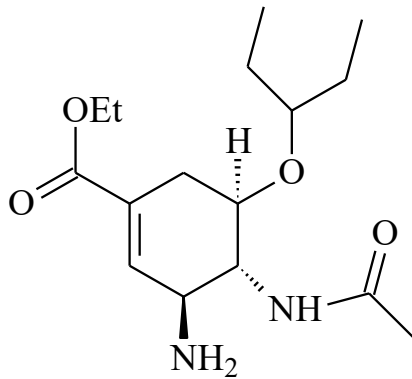
Shikimic acid



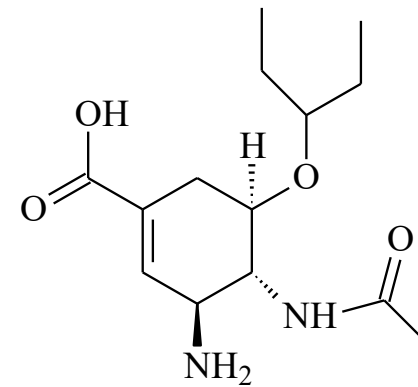
oseltamivir

Το **Shikimic acid** (3,4,5-τριϋδροξυ-1-κυκλοεξεν-1-καρβοξυλικό οξύ) μπορεί να παρασκευασθεί συνθετικά, ή να απομονωθεί από μικροβιακές καλλιέργειες, ή από φυτικά εκχυλίσματα.

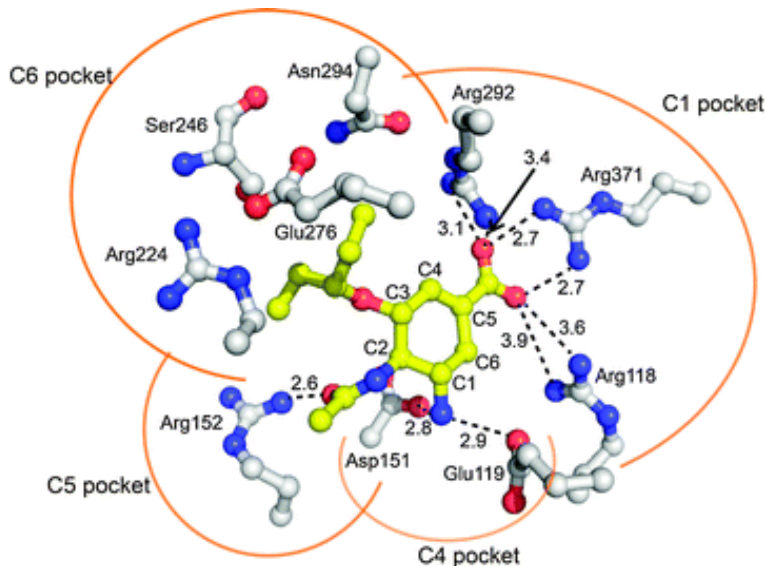
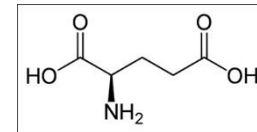




**OSELTAMIVIR (προφάρμακο)**



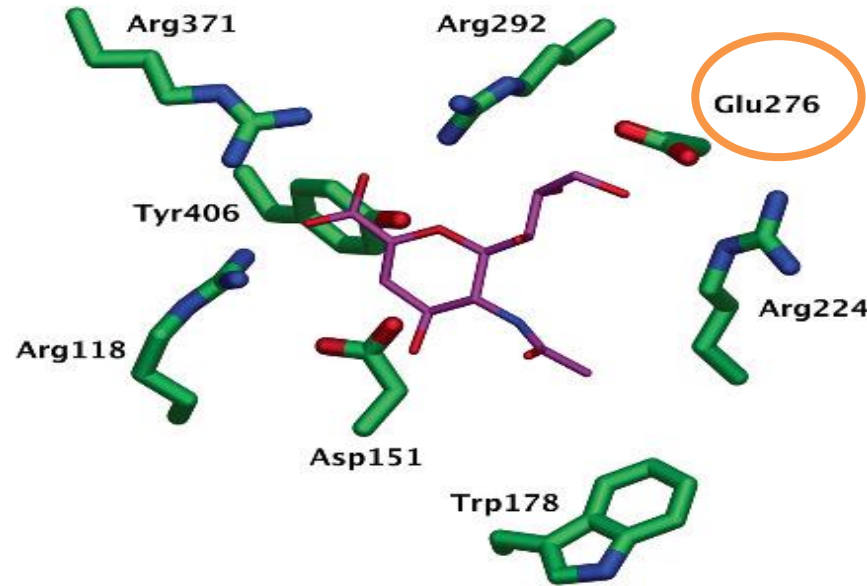
η δραστική μορφή



Στο **Osetamivir** διατηρείται το μοτίβο αλληλεπιδράσεων του **Zanamivir**. Η **ισοπεντυλοξυ-** ομάδα αναπτύσσει **υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με αμινοξέα** που βρίσκονται στα όρια του ενεργού κέντρου, αλλάζοντας ελαφρώς τη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου.

Επειδή αυξάνονται οι αλληλεπιδράσεις είναι δυνατή η αντικατάσταση της 4-γουανιδινομάδας από τη λιγότερο βασική αμινομάδα, **χωρίς σημαντική απώλεια δραστηριότητας.**

**Με κατάλληλη μορφοποίηση ο εστέρας του Osetamivir μπορεί να χορηγηθεί από το στόμα. Αποτελεί ΦΑΡΜΑΚΟ 1<sup>Ης</sup> ΓΡΑΜΜΗΣ για παιδιά > 2 εβδομάδων και ενήλικες.**

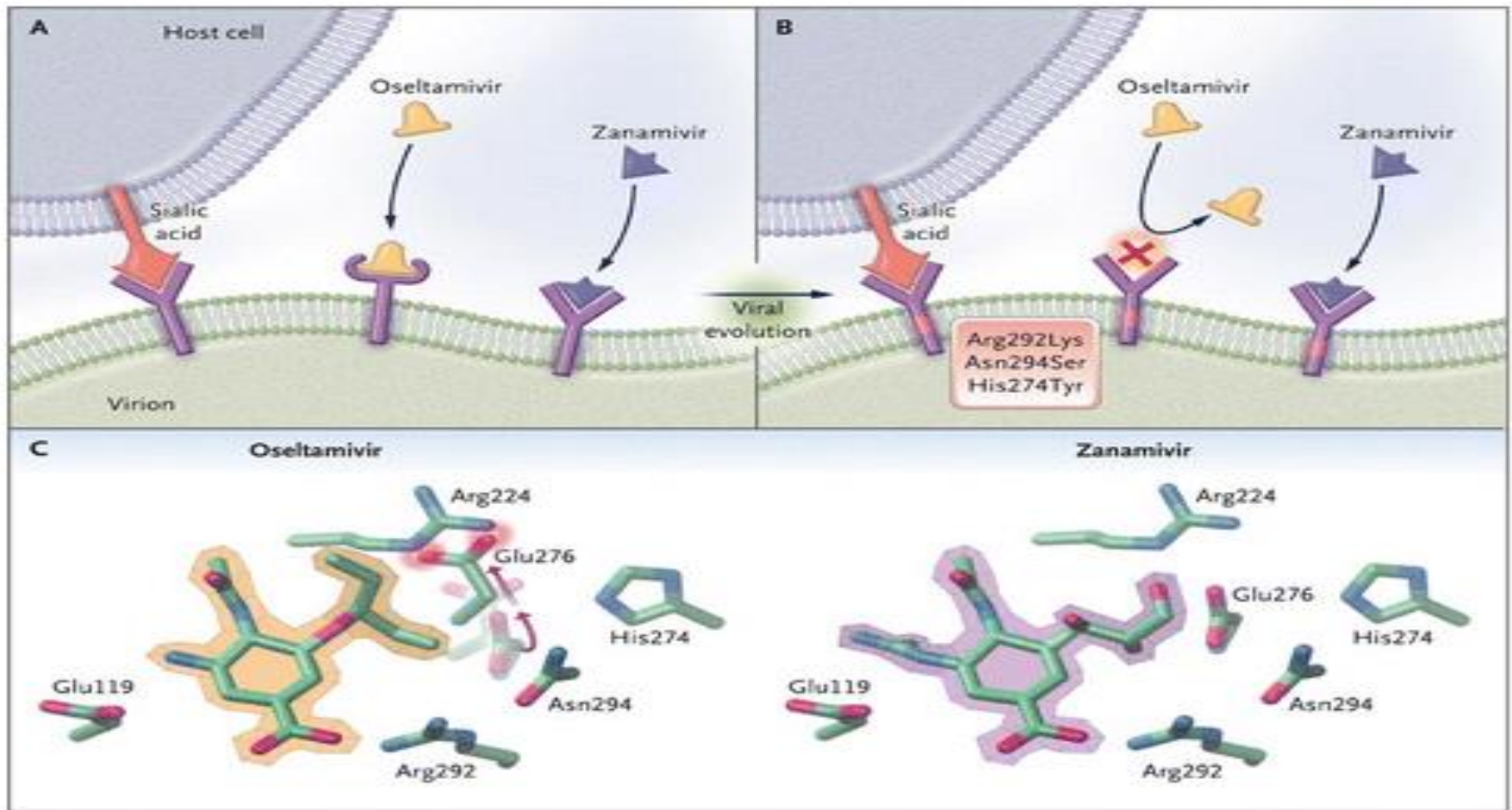


**Ανάπτυξη αντοχής στο oseltamivir:** η υδρόφοβη αλληλεπίδραση της ισοπεντυλοξυ- ομάδας του oseltamivir με αμινοξέα εκτός ενεργού κέντρου και με το **Glu276** που αλλάζει διαμόρφωση ευνοεί την εμφάνιση μεταλλάξεων.

Συχνά ανιχνεύεται μεταλλαγμένο στέλεχος με αλλαγή γειτονικού αμινοξέος (συχνότερη μετάλλαξη η Influenza A NA<sub>(His274Tyr)</sub>. Σε αντίθεση με τα μεταλλαγμένα από τη παρουσία αμινοαδαμαντανίων φάρμακα, το **His274Tyr** που δεν αναστέλλεται ικανοποιητικά από το φάρμακο, **πολλαπλασιάζεται αργά**.

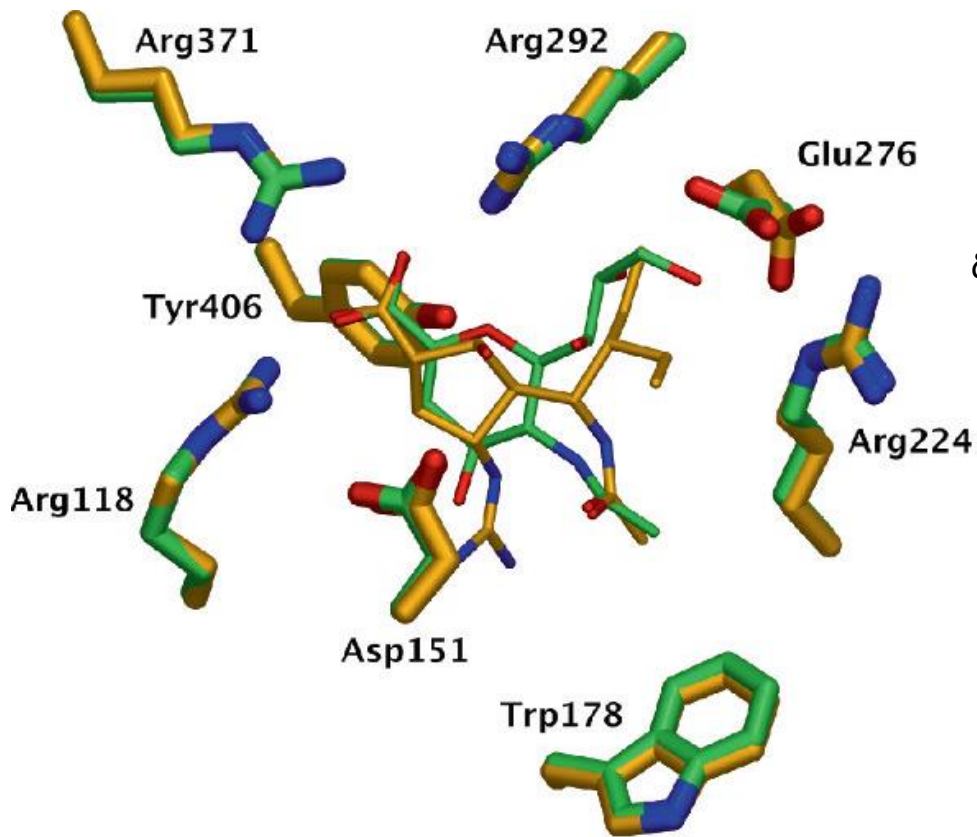
Όμως, με επί πλέον μεταλλάξεις ευνοείται η ανάπτυξη **παθογόνων στελεχών ανθεκτικών στο oseltamivir, που πολλαπλασιάζονται γρηγορότερα (Χ100) από το άγριο στέλεχος**. Προς το παρόν αυτά τα στελέχη εμφανίζονται σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.

**Δυσκολότερα αναπτύσσεται αντοχή στο zanamivir.**



**Ανάπτυξη αντοχής στο oseltamivir:** Ο ογκώδης υποκαταστάτης της **Tyr274** στο στέλεχος **His274Tyr** προκαλεί **αναγκαστική μετατόπιση** του **Glu276**, με αποτέλεσμα την εξασθένηση των αλληλεπιδράσεων του με τον ισοπεντυλοξυ- υποκαταστάτη του oseltamivir. Οι αλληλεπιδράσεις του zanamivir δεν επηρεάζονται.

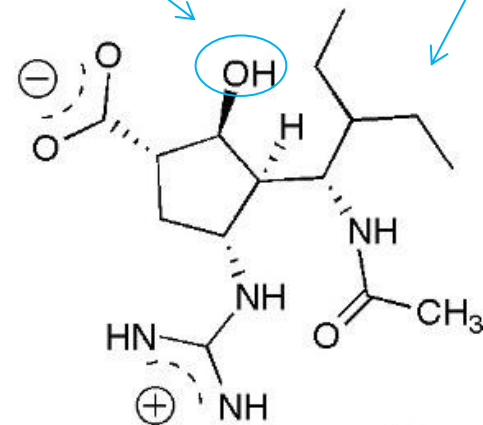
**Το zanamivir που μοιάζει περισσότερο στο φυσικό υπόστρωμα, συνδέεται αυστηρά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου που δεν μεταλλάσσεται εύκολα. Η εμφάνιση φαρμακοάντοχων μεταλλάξεων είναι δυσκολότερη, όχι όμως αδύνατη.**



Υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις όπως στο zanamivir

Αύξηση λιποφιλίας και αλληλεπιδράσεις με υδρόφοβες κοιλότητες χωρίς αλλαγή διαμόρφωσης όπως στο oseltamivir

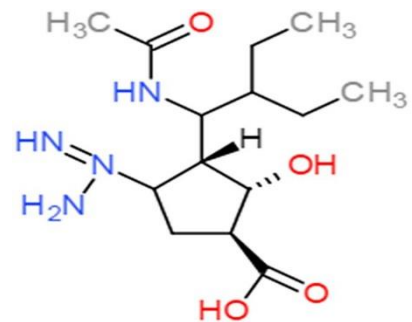
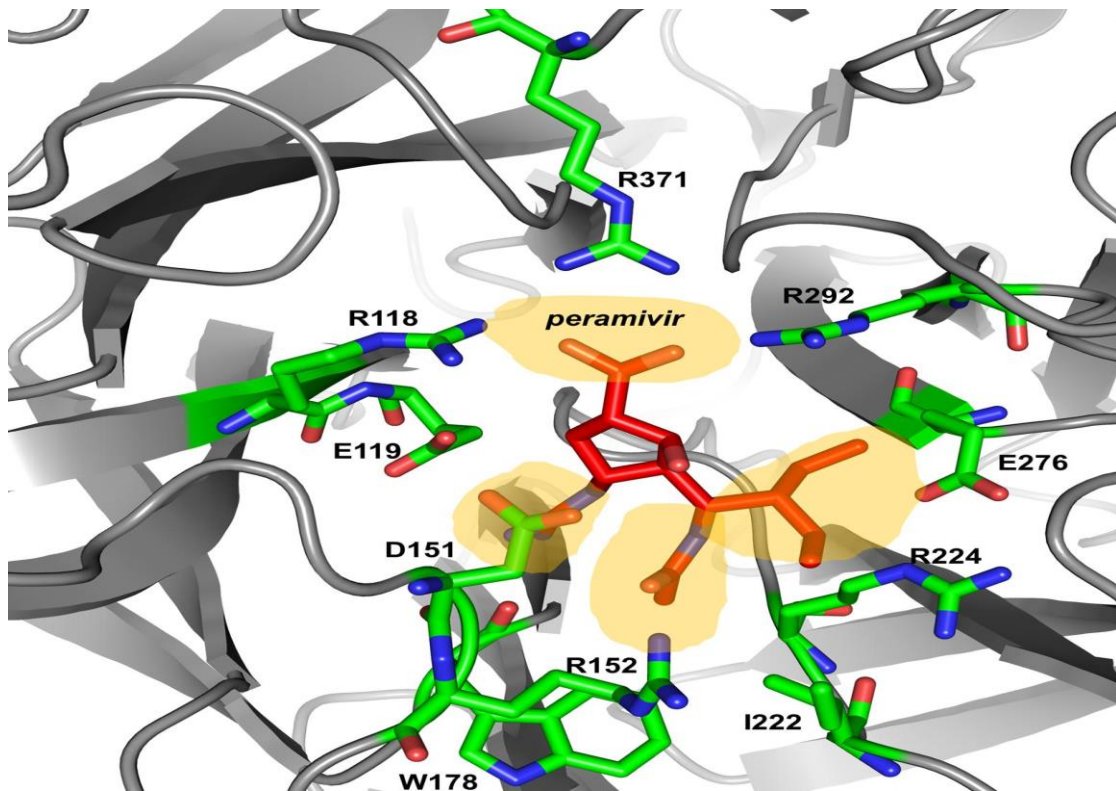
δH με 4-OH όπως το Neu5Ac2en



(peramivir)

**Παράγωγα κυκλοπεντανίου:** το **peramivir** (νεώτερο φάρμακο) αναστέλλει ισχυρά την NA και είναι αποτελεσματικό από την πρώτη χορήγηση. Δραστικό σε άγρια και σε μεταλλαγμένα στελέχη, όχι όμως στο **His274Tyr**. Το αντίστοιχο αμινοπαράγωγο παραμένει δραστικό.

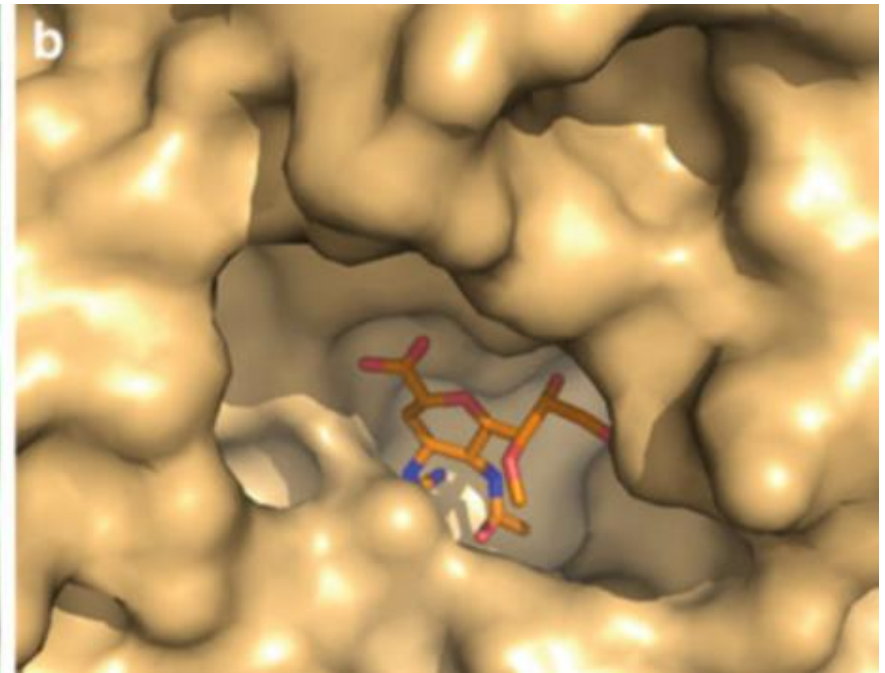
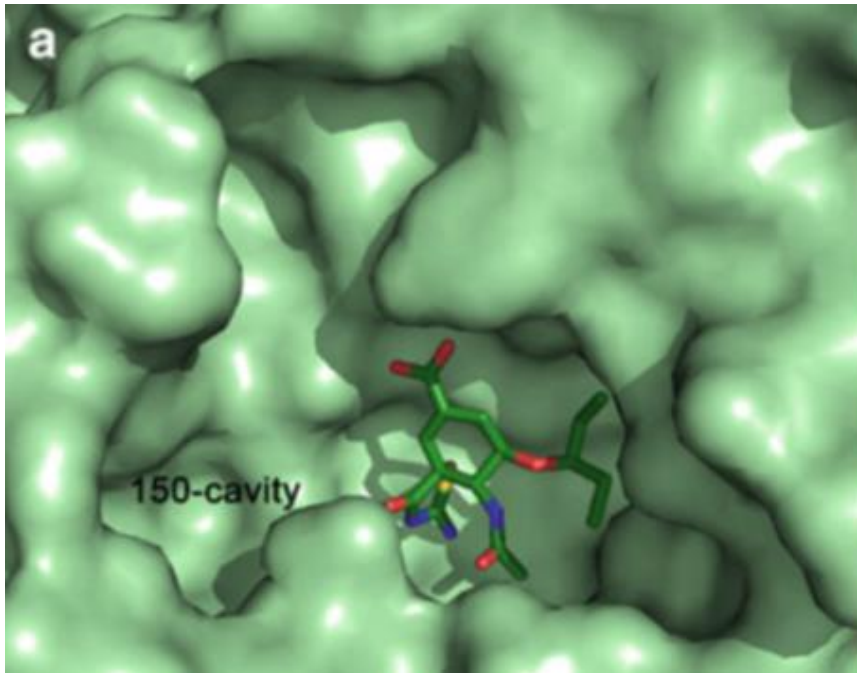
Λαμβάνεται από το στόμα αλλά έχει μικρή βιοδιαθεσιμότητα => η **ενδομυϊκή χορήγηση είναι πολύ αποτελεσματική, ισοδυναμεί με 5 ημέρες θεραπείας με oseltamivir. Χορηγείται ενδονοσοκομειακά, σε ασθενείς με οξέα συμπτώματα (παιδιά και ενήλικες).**



Το καρβοξυλικό ανιόν του **peramivir** σχηματίζει ισχυρούς δεσμούς με τρεις ισχυρά διατηρημένες αργινίνες (Arg118, Arg292 και Arg371) – ισχυρότερη σύνδεση από τα **oseltamivir** και **zanamivir**.

Το μεθύλιο του ακεταμιδίου μπαίνει σε λιπόφιλη κοιλότητα και αλληλεπιδρά με τα αμινοξέα Trp178 και Ile222, ενώ το C=O και το NH του αμιδίου συνδέονται με την Arg152.

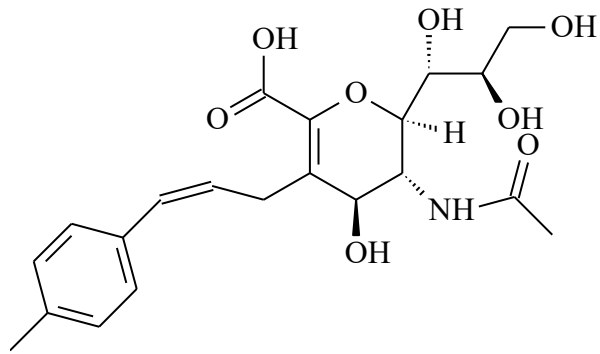
Η γουανιδινομάδα εκτοπίζει ένα μόριο νερού και καταλαμβάνει μια άλλη κοιλότητα, σχηματίζοντας ισχυρούς ηλεκτροστατικούς και δH με τα καρβοξύλια των Glu119, Asp151 και Glu227.



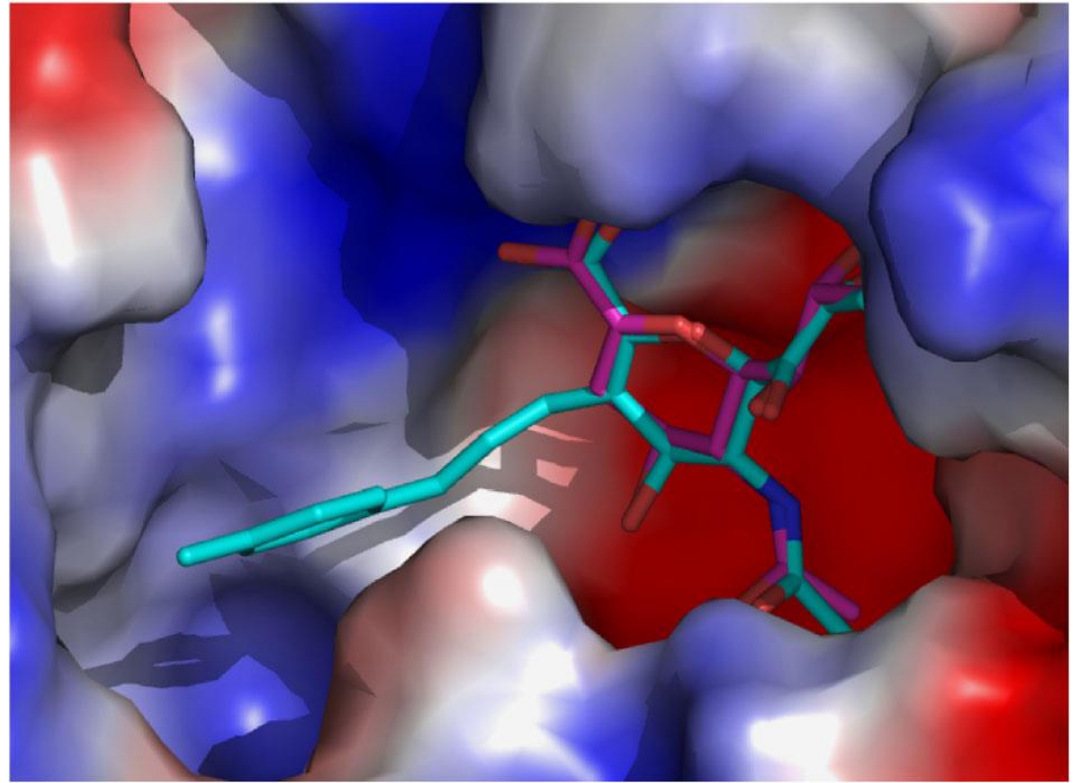
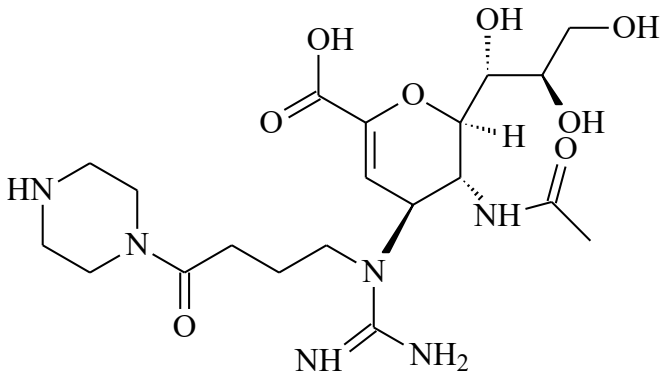
**Αξιοποίηση κοντινών λιπόφιλων κοιλοτήτων** Η σύνδεση σιαλικού οξέος ή άλλου προσδέματος στο ενεργό κέντρο της NA προϋποθέτει μετακίνηση μιας έλικας (έλικα 150, α.147-151) και την αποκάλυψη μιας **γειτονικής υδρόφοβης κοιλότητας (κοιλότητα 150)**.

Οι NA τύπου I (N1, N4, N5, N8) χαρακτηρίζονται από «**ανοιχτή διαμόρφωση της έλικας 150**», που καθιστά την κοιλότητα 150 προσβάσιμη σε αναστολείς (εικόνα a).

Στις NA τύπου II (N2, N3, N6, N7, N9) η έλικα 150 λαμβάνει κλειστή διαμόρφωση και η κοιλότητα δεν είναι προσβάσιμη για τους αναστολείς (εικόνα b).

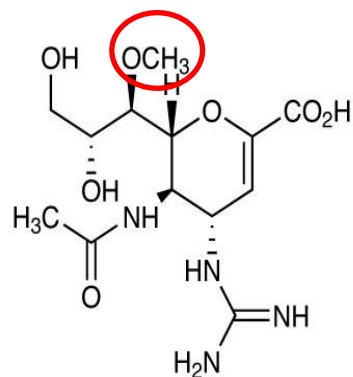


3-(p-tolyl)allyl-Neu5Ac2en



Η εισαγωγή μεγάλου υποκαταστάτη στην 3-θέση παραγώγου πυρανόζης ενισχύει τη δραστηριότητα έναντι των ιών που διαθέτουν **NA τύπου I**: ο υποκαταστάτης εισέρχεται και συνδέεται στην κοιλότητα-150.

→ Επανέρχεται η 3-υποκατάσταση με γουανιδίνη και η 5-αλυσίδα τύπου γλυκερόλης. Ο συνδυασμός μειώνει τη πιθανότητα εμφάνισης μεταλλαγμένων στελεχών.



Laninamivir (R-125489)

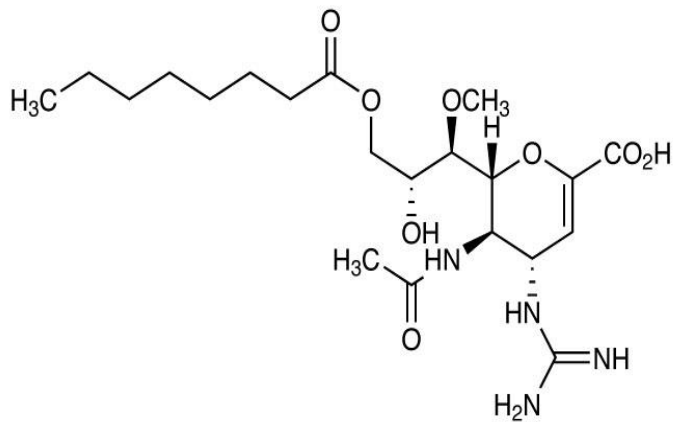
**A long-acting inhibitor, Laninamivir octanoate:** εισπνεόμενο προφάρμακο παραγώγου πυρανόζης. Ο λιπόφιλος εστέρας στην 9-θέση αποδίδει σταδιακά το δραστικό συστατικό (**laninamivir**) στους πνεύμονες, όπου δρα ως **ισχυρός αναστολέας της NA τύπου I**.

Προσομοιάζει τον τρόπο σύνδεσης του **zanamivir** => μικρή πιθανότητα φαρμακοάντοχων μεταλλάξεων.

Ασκεί **παρατεταμένη δράση ( $t_{1/2}$  3ημέρες)**, διατηρώντας τα θεραπευτικά επίπεδα στους πνεύμονες **για τουλάχιστον 5 ημέρες**.

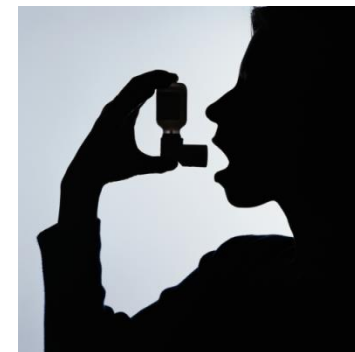
**Εξαιρετικό για προφύλαξη (1 ψεκασμός εβδομαδιαίως).**

Διατίθεται σε συσκευασία 8 (ενήλικες) και 4 (παιδιά) ψεκασμών.



Laninamivir prodrug (CS-8958)

**7-O-αλκυλίωση=> Ενώ τα 8-OH και 9-OH σχηματίζουν  $\delta H$  με το Glu276 το 7-OH εκτείνεται απλά προς τον διαλύτη = ιδανική θέση για την εισαγωγή υποκαταστάτη.**



# Retroviruses

1970: **Baltimore+Temin**

Αντίστροφη μεταγραφάση

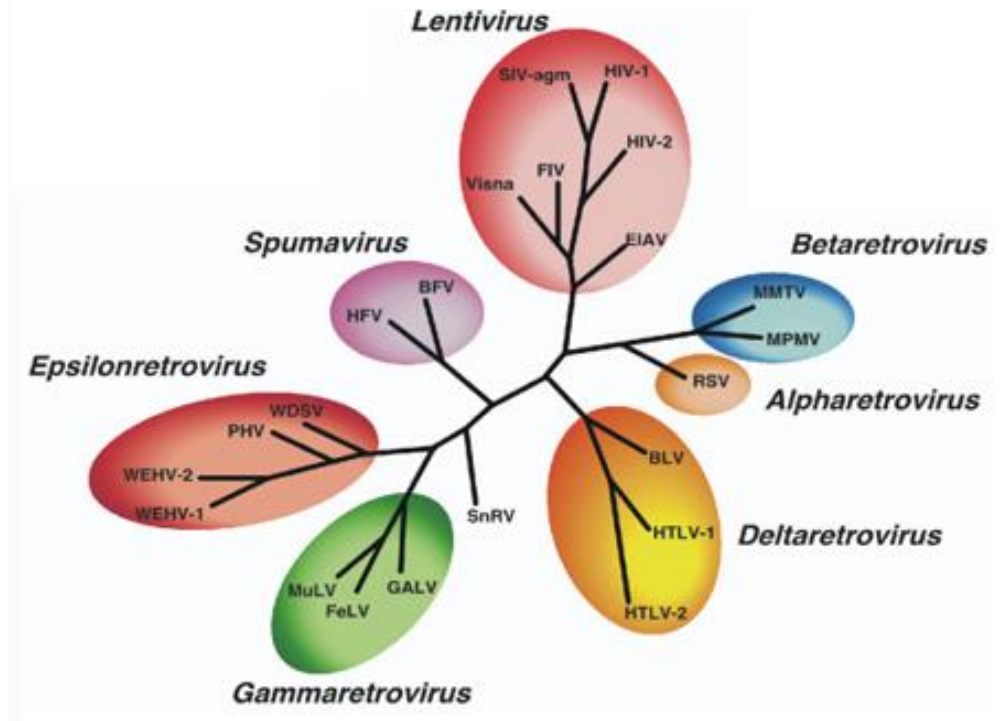
Nobel prize

- Oncovirus (oncornavirus):
- HTLV-1, HTLV-2, HTLV-5
- Spumavirus (δεν είναι παθογόνος)
- Lentivirus (HIV-1, HIV-2)

**Peyton Rous:** Rous sarcoma virus,  
συσχέτιση ρετροϊών με ογκογονίδια  
(growth-controlling genes)

**Robert Gallo:** ο HTLV-1 μπορεί  
να προκαλέσει λεμφοκυτταρική λευχαιμία  
στον άνθρωπο

Δεκαετία 1980-90: ταυτόχρονη αναγνώριση από τους **Robert Gallo** (ΗΠΑ) και **Luc Montagnier** (Γαλλία) της προσβολής από τον HIV-1 ως παθογόνου αιτίου για το AIDS

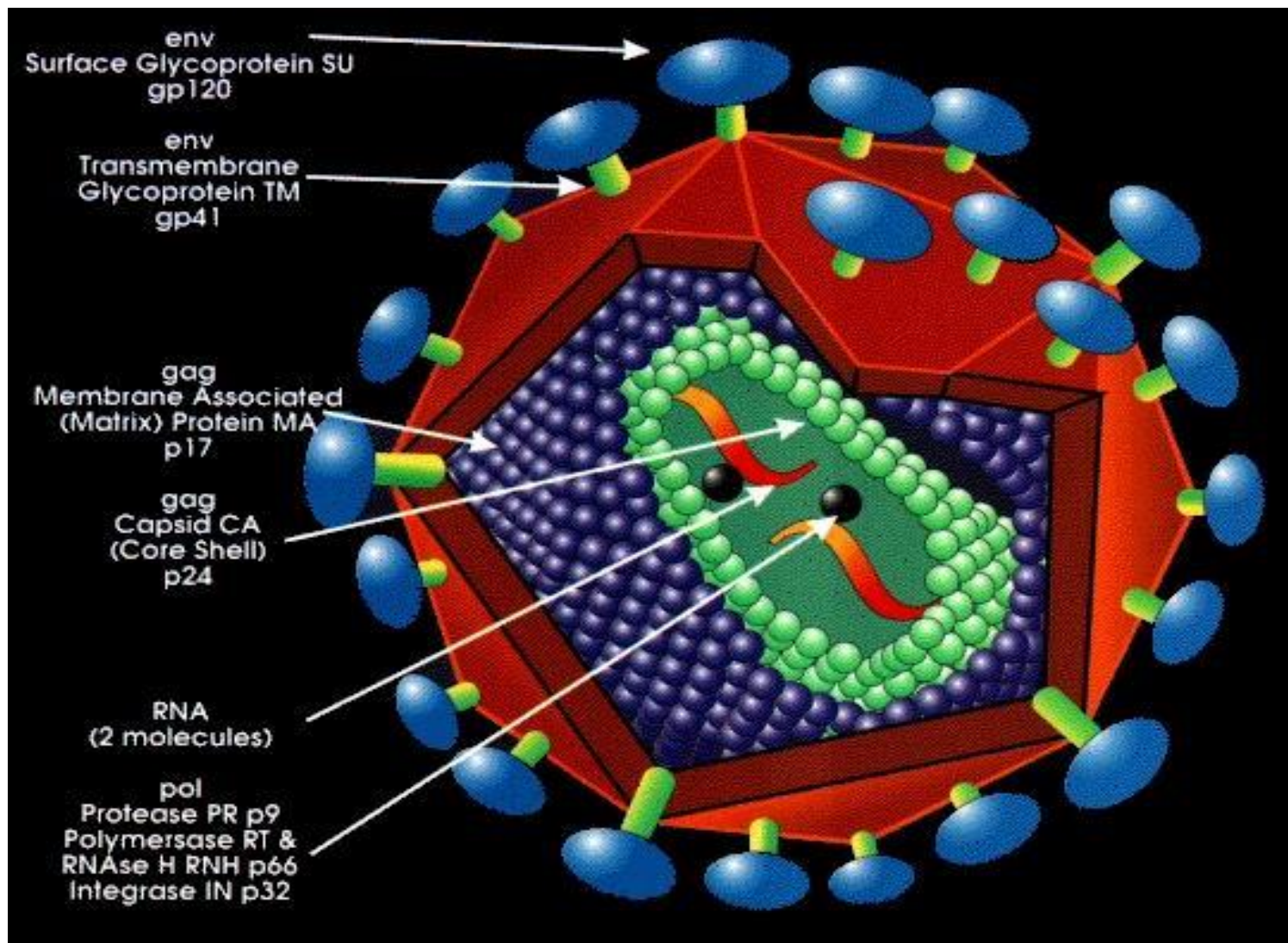


**Ο ιός HIV προσβάλλει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος** και σταδιακά εξασθενίζει την άμυνα του οργανισμού. Ο πολλαπλασιασμός του είναι σύνθετη και πολυεπίπεδη διαδικασία την οποία επιχειρούν να αναστείλουν τα αντιικά φάρμακα.

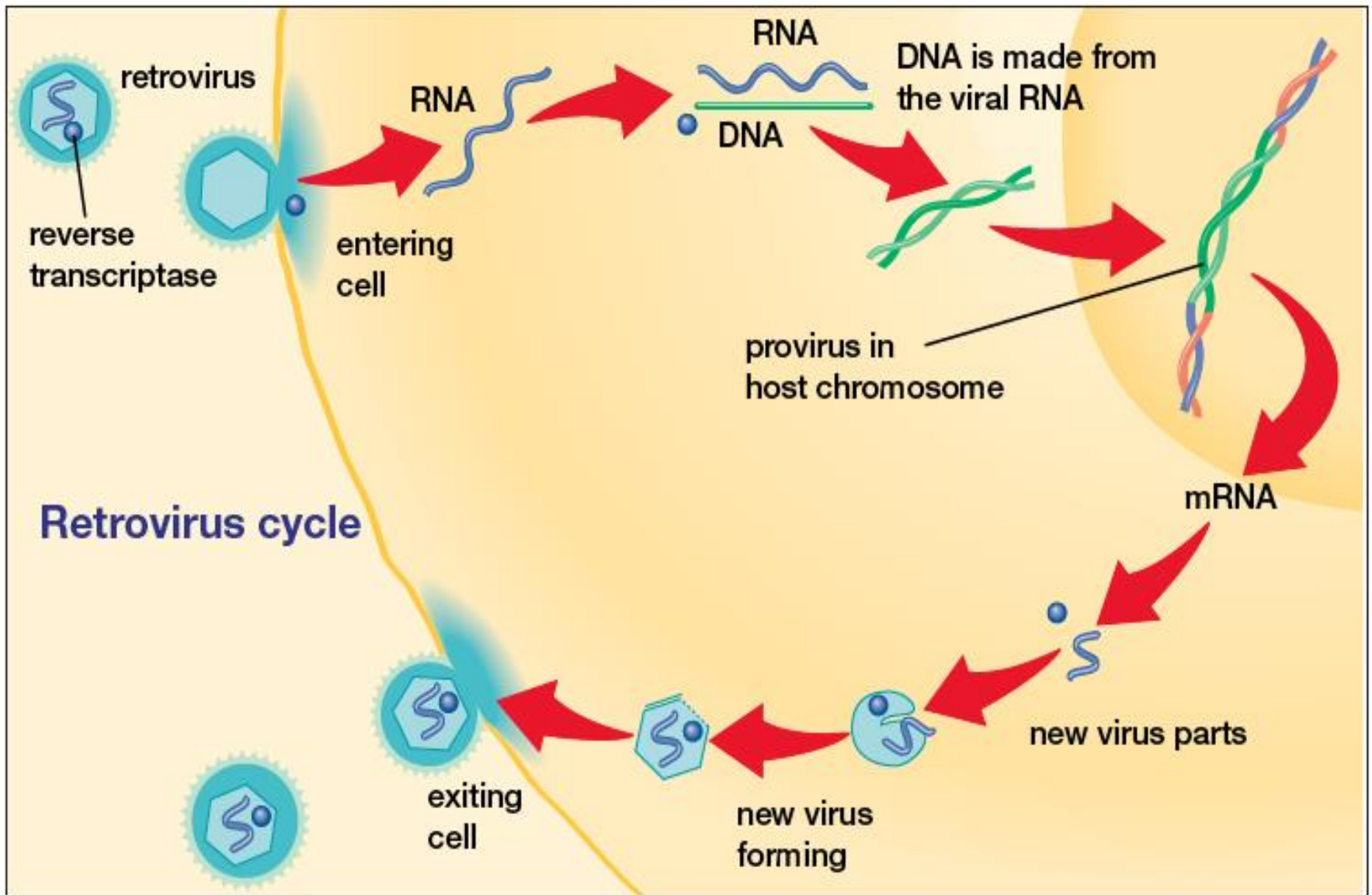
Σύμφωνα με το αρμόδιο τμήμα του ΟΗΕ (UNAIDS) περισσότεροι από **37.000.000** ασθενείς ζουν μολυσμένοι τον ιο HIV, συμπεριλαμβανομένων 2.100.000 παιδιών ηλικίας κάτω των 15 ετών. Εξ αυτών 18.000.000 έχουν πρόσβαση στα φάρμακα.

Αν και οι θάνατοι μειώνονται (680.000/έτος) ως αποτέλεσμα της φαρμακευτικής αγωγής, τα περιστατικά νέας μόλυνσης παραμένουν σταθερά (1.500.000/έτος).

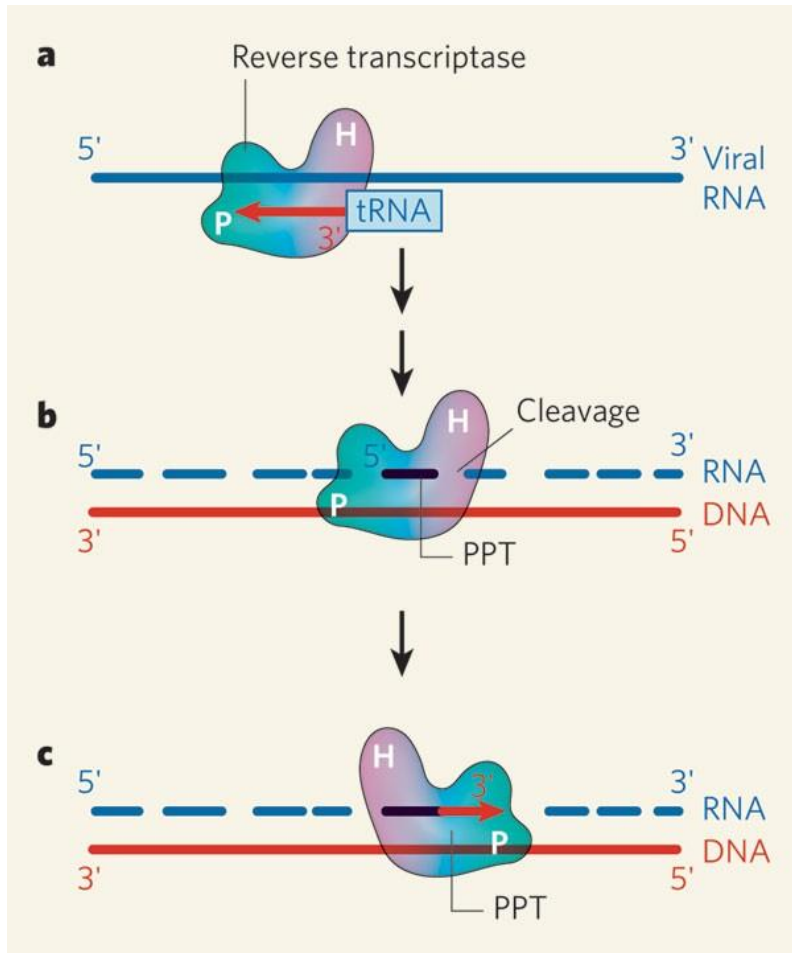




Μελέτη του ιικού σωματίου. Η παρουσία αντισωμάτων για τις επιφανειακές πρωτεΐνες αποτελεί σημαντικό δείκτη της ασθένειας AIDS και στόχο της ανάπτυξης εμβολίων.



Ο HIV δημιουργεί πολλά αντίγραφα κυκλικού proviral DNA που κωδικοποιεί πλήθος δομικών πρωτεϊνών ( $gag \rightarrow GP120, GP41$  envelope) και λειτουργικών ενζύμων ( $pol \rightarrow RT, protease, integrase$ ), ( $tat \rightarrow$  σύνδεση σε ρυθμιστικές περιοχές, ενεργοποίηση ν m-RNA)

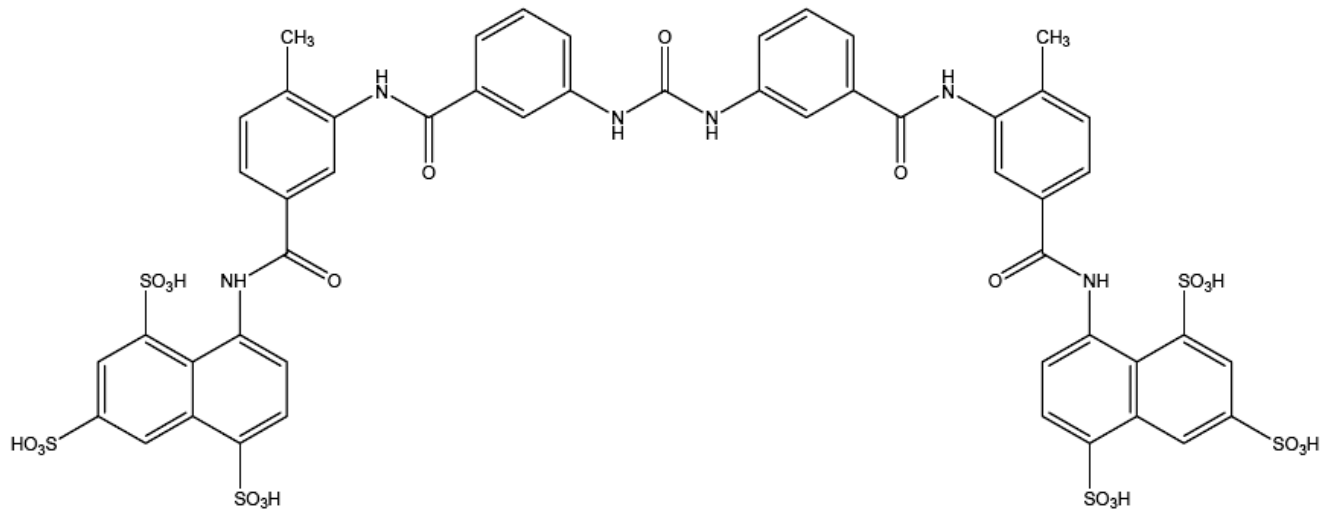


Εντός του ξενιστή κυττάρου η αντίστροφη μεταγραφάση λειτουργεί ως **ικκή DNA πολυμεράση**: χρησιμοποιεί ως μήτρα συγκεκριμένο τμήμα του ιικού RNA (tRNA<sub>Iys3</sub>), για τη σύνθεση του πρώτου ιικού (-)DNA, που στη συνέχεια θα υβριδιστεί σε RNA:DNA.

Ακολούθως το ένζυμο λειτουργεί ως ριβονουκλεάση (**RNάση H**) και απομακρύνει τον κλώνο RNA.

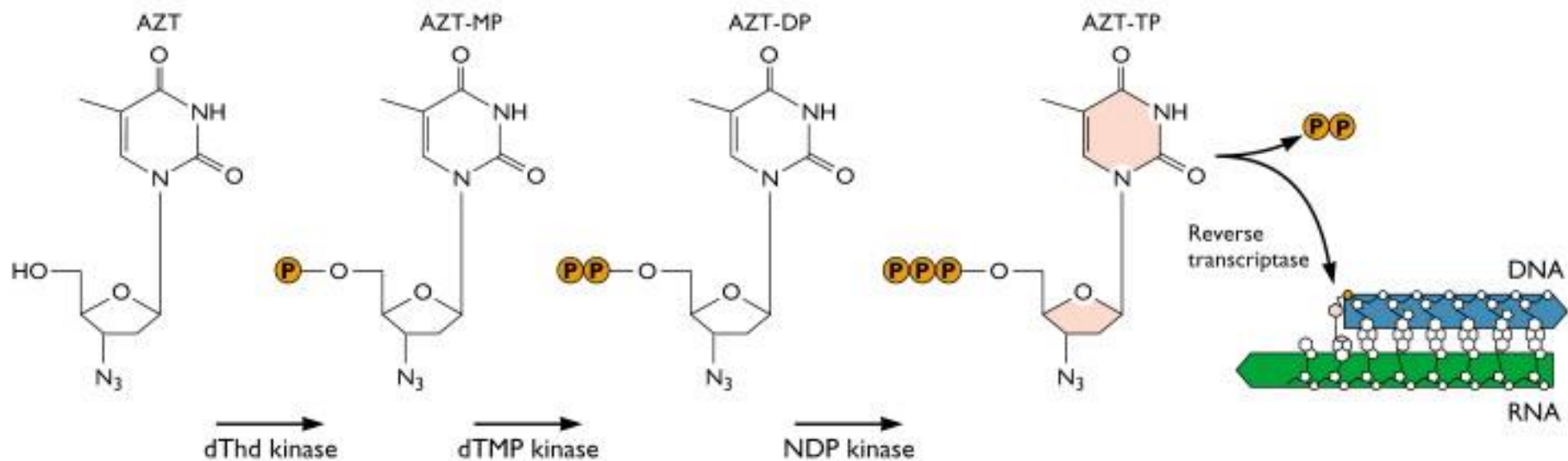
Τέλος δρα ως **DNA πολυμεράση** συνθέτοντας τον συμπληρωματικό κλώνο (+)DNA και συνεχίζοντας για τη σύνθεση των άλλων αντιγράφων (dsDNA). Η ενσωμάτωση θα παρεμβάλει αυτό το ικό DNA στο DNA του ξενιστή.

Η ενεργοποίηση του κυττάρου από τον ιό έχει ως συνέπεια τη μεταγραφή του pro-viral DNA σε ικό mRNA που θα μεταφραστεί στο κυτταρόπλασμα προς πολυπρωτεΐνες, που θα διασπασθούν με τη δράση της ικής πρωτεάσης.



Το **suramin** (αντιτρυπανοσωμιακό) είναι το πρώτο φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε έναντι του HIV. Αναστέλλει την διείσδυση του ιού στα κύτταρα. Ορισμένα πολυσουλφουρωνένα παράγωγα και σουλφονικοί εστέρες χρησιμοποιούνται και σήμερα για τοπική εφαρμογή.

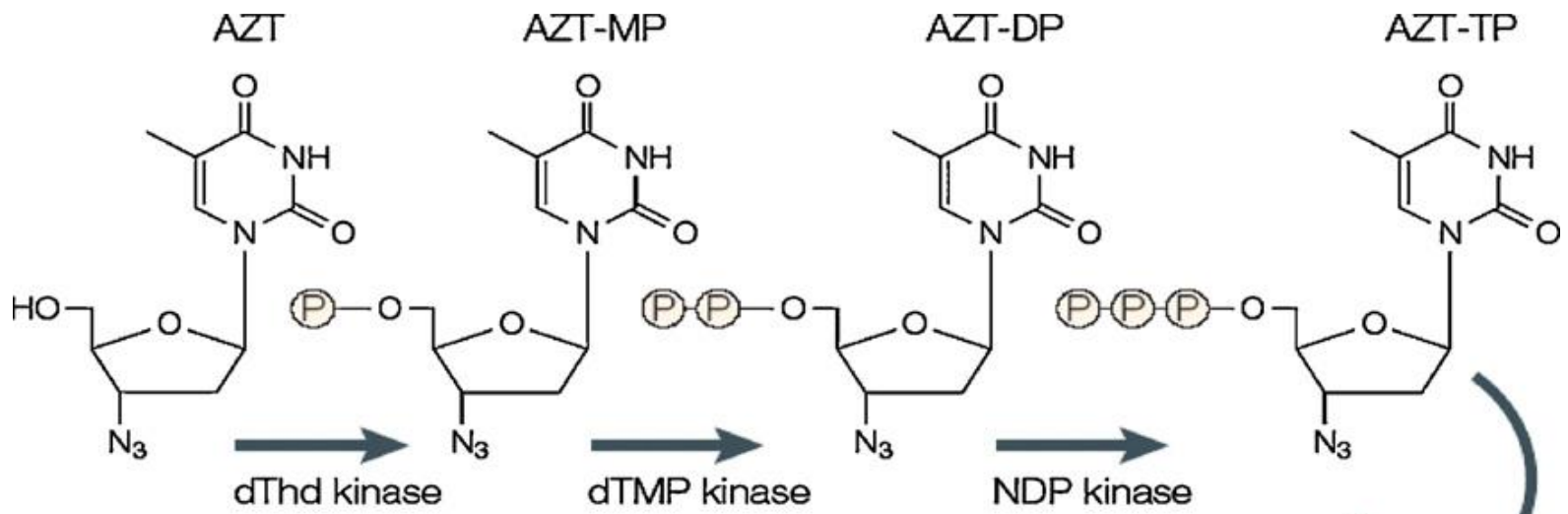
Το 1985 ανακαλύπτεται η **αντι-ρετροϊκή δράση του AZT**. Κυκλοφορεί με επείγουσες διαδικασίες (1987) στα «δυτικά» κράτη. Αποσαφηνίζεται ο μηχανισμός δράσης των **νουκλεοζιτικών αναστολέων της αντίστροφης μεταγραφάσης (NRTIS)** και μετά την σύνθεση πληθώρας παραγώγων, διερευνώνται εκτεταμένα οι σχέσεις δομής-δράσης.



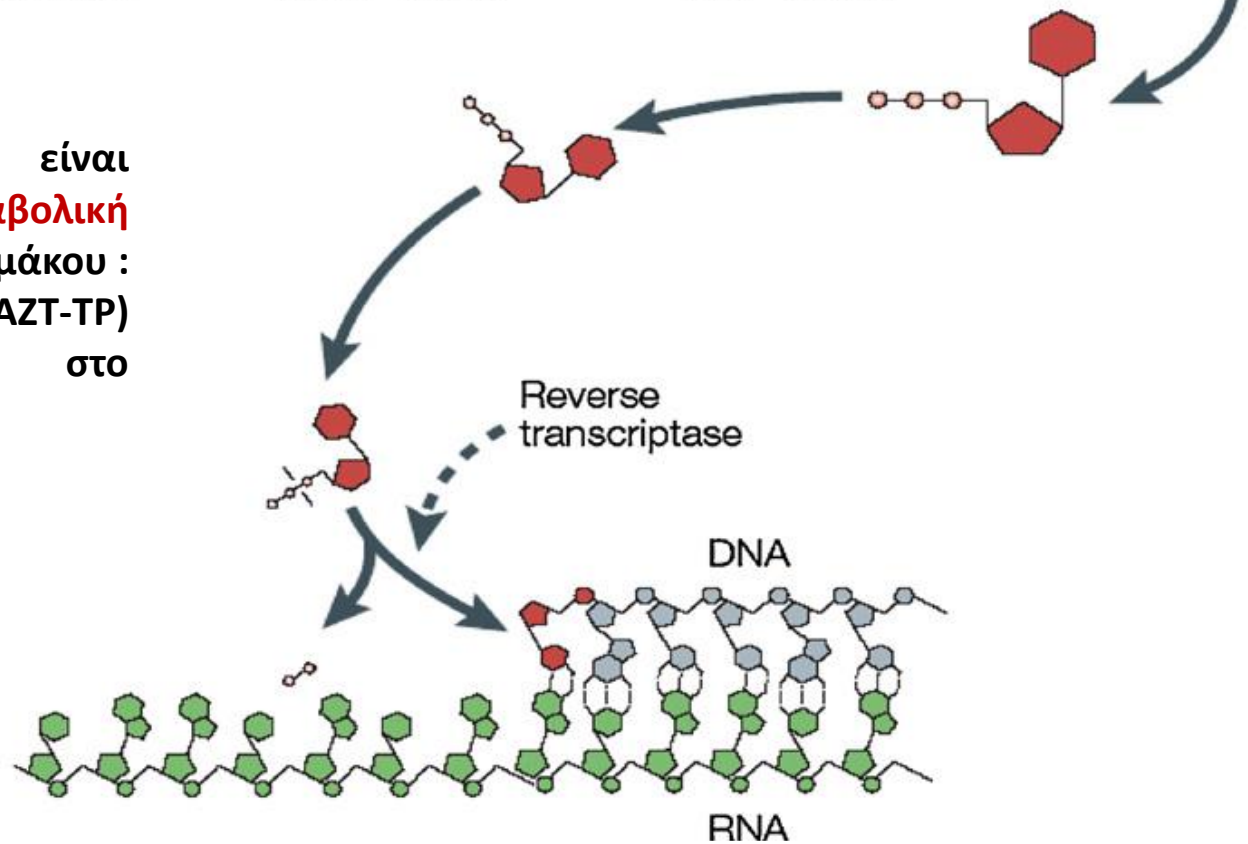
Τα **NRTIS** αναστέλλουν την αντίστροφη μεταγραφάση (κυρίως τη λειτουργία της ως RNA-άσης H), αφού ενεργοποιηθούν μεταβολικά από κυτταρικά ένζυμα.

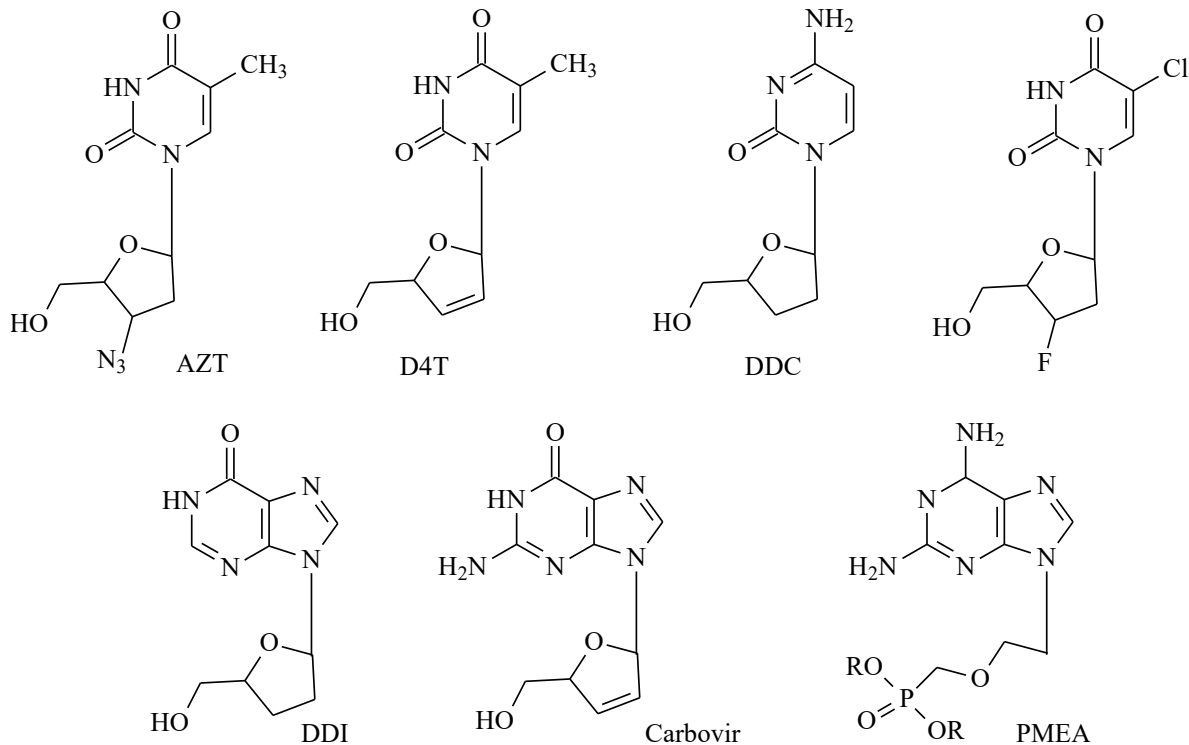
Το AZT-TP αναγνωρίζεται ως υπόστρωμα από την αντίστροφη μεταγραφάση και ενσωματώνεται στο νουκλεϊνικό οξύ. Δρα ως **chain terminator**, γιατί η παρουσία του 3'-αζιδίου απαγορεύει την δημιουργία του 5',3'-φωσφοδιεστερικού δεσμού.

Το AZT-TP αναστέλλει ασθενώς την ανθρώπινη γ-DNA πολυμεράση → τοξικότητα στο μυελό των οστών, περιφερική νευροπάθεια κ.α. παρενέργειες.



Η **αναγνώριση** είναι απαραίτητη για τη **μεταβολική ενεργοποίηση** του φαρμάκου : η δραστική μορφή (AZT-TP) σχηματίζεται μέσα στο κύτταρο





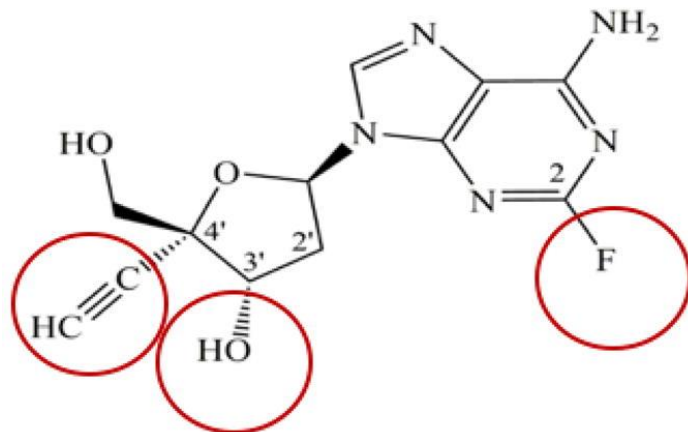
Τα 2'3'-διδεοξυνουκλεοζιτικά παράγωγα (**DDNs**) που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία του AIDS δρουν ως **chain terminators**. Αναγνωρίζονται από τα κυτταρικά ένζυμα προκειμένου να ενεργοποιηθούν μεταβολικά προς τριφωσφορικά νουκλεοτίδια που πρέπει να μην αναγνωρίζονται από τα ανθρώπινα ένζυμα (μη τοξικά για τον ξενιστή). Χρησιμοποιούνται επίσης ανάλογα μονοφωσφορικών νουκλεοτιδίων (PMEa).

## DDNs παράγωγα διδεοξυριβόζης

- Εισαγωγή αλογόνου στη 2'-θέση: αύξηση μεταβολικής σταθερότητας
- Αζίδιο, αλογόνο, νιτρίλιο, ή άλλη ηλεκτρονιοελκτική ομάδα στην 3' – θέση
- 2',3' διπλός δεσμός
- Εισαγωγή ετεροατόμου στην 3'-θέση
- Καρβοκυκλικά ανάλογα σακχαρικού τμήματος
- Αλλαγή του σακχάρου: L-ριβόζη αντί της D- ριβόζης, ή (-) αντί για (+)  
εναντιομερές => αύξηση θεραπευτικού εύρους

**Προβλήματα:** μεταβολική αστάθεια, ανεπιθύμητες ενέργειες, φ/κ συμπεριφορά

## Ένα νεώτερο νουκλεοζιτικό παράγωγο: 4'-ethynyl-2-fluoro-2' – deoxyadenosine islatravir

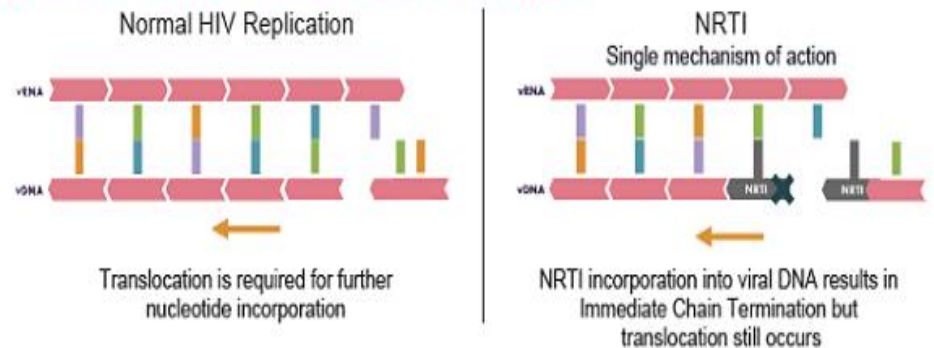


**Η παρουσία του 2-F** μειώνει την κυτταροτοξικότητα και αυξάνει την μεταβολική σταθερότητα, γιατί **αναστέλλει τη δράση της απαμινάσης της αδενοσίνης**. Το ένζυμο αυτό, που καταλύει την «υδρόλυση» της 6-NH<sub>2</sub> αλληλεπιδρά με τα N1 και N3, με την πρωτονίωση του N1 να αποτελεί το πρώτο και σημαντικό βήμα για την προσθήκη -OH στην 6-θέση. Η παρουσία του ηλεκτραρνητικού F δεν ευνοεί τη πρωτονίωση του N1 με αποτέλεσμα να καθυστερεί η μεταβολική απενεργοποίηση του φαρμάκου.

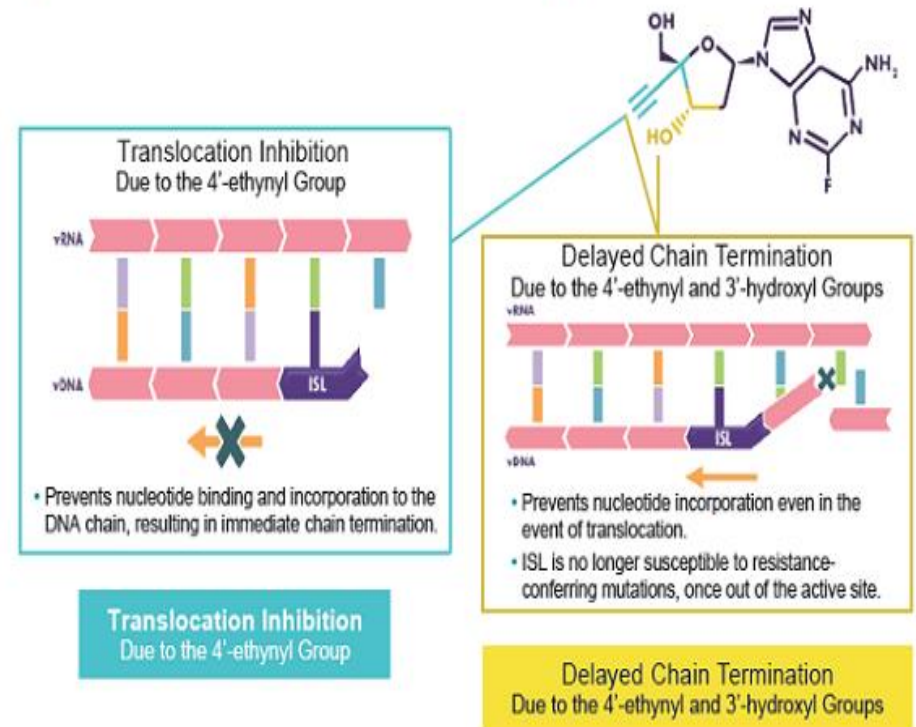
**Η 4'-αιθινυλομάδα** αλληλεπιδρά με ειδικό τρόπο με την αντίστροφη μεταγραφάση και αναστέλλει τη γλυκόλυση του νουκλεοζίτη, **αυξάνοντας σημαντικά τον t<sub>1/2</sub> in vivo**.

Το **islatravir** δρα ως **αναστολέας μετάθεσης** της αντίστροφης μεταγραφάσης (inhibitor of reverse transcriptase translocation). Ενώ η παρουσία 3'-OH επιτρέπει την ενσωμάτωση στον νέο κλώνο, η 4'-αιθινυλομάδα αλληλοεπιδρά ισχυρά με αμινοξέα του ενεργού κέντρου του ενζύμου και εμποδίζει τη μετακίνηση του για την περαιτέρω επιμήκυνση του νέου κλώνου.

## Normal HIV Replication and NRTI MOA

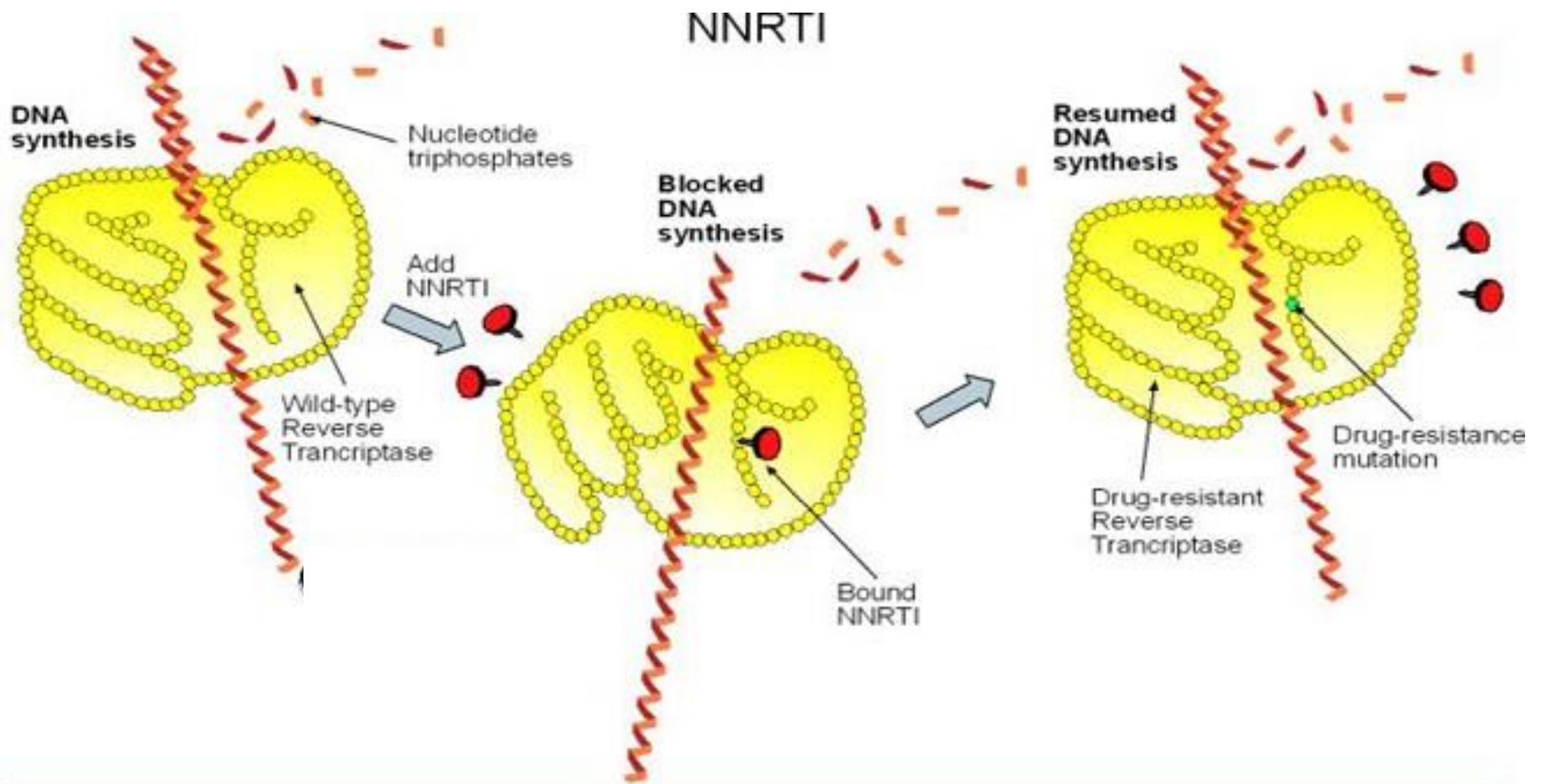


## ISL, a First-in-Class NRTTI With Multiple MOAs



Το φάρμακο έχει δείξει εντυπωσιακά αποτελέσματα στις κλινικές δοκιμές:

- Εξαιρετική αποτελεσματικότητα και εκλεκτικότητα (απουσία κυτταροτοξικότητας).
- Παρατεταμένη δράση (υπό ανάπτυξη και ως long-acting implant).
- Απουσία μεταλλάξεων.



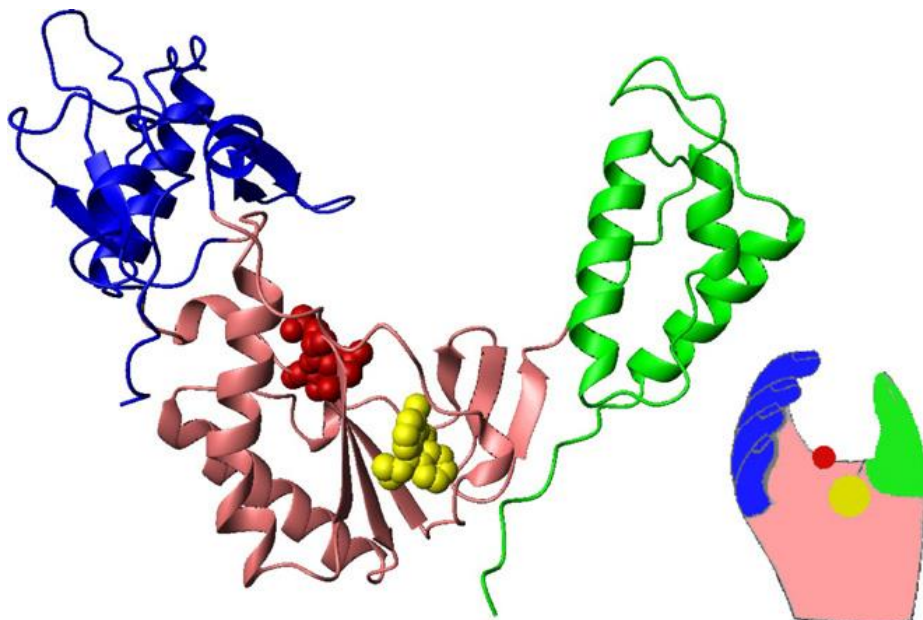
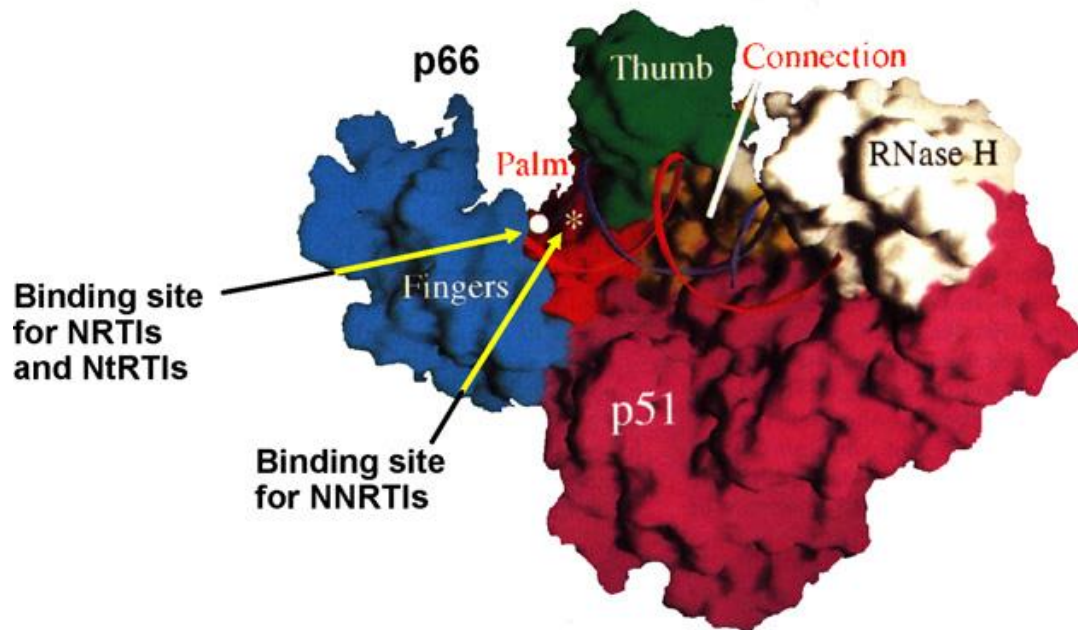
Οι **μη νουκλεοζιτικοί αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης (NNRTIs)** είναι **αλλοστερικοί**. Ανήκουν σε περισσότερες από 30 διαφορετικές χημικές κατηγορίες, και αποτελούν ευρήματα εκτεταμένων screening tests. Χαρακτηρίζονται από:

- υψηλή εξειδίκευση
- ισχυρή δράση
- μεγάλο θεραπευτικό εύρος

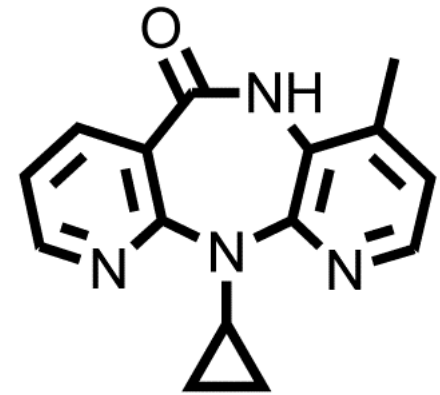
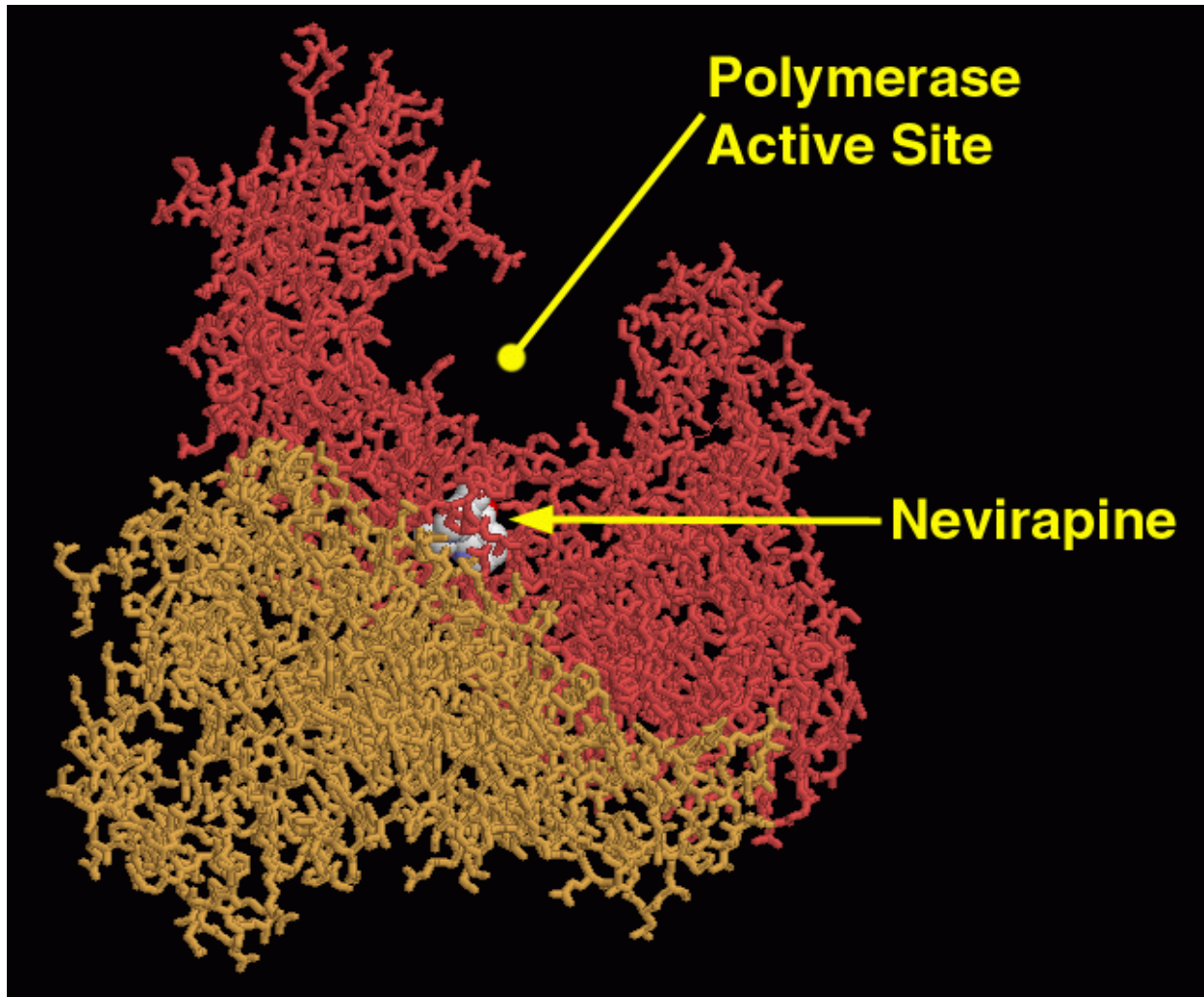
Το ένζυμο είναι ετεροδιμερές, αποτελούμενο από δύο υπομονάδες.

Η p66 λειτουργεί ως πολυμεράση, ενώ το άκρο της p51 ως RNAάση Η.

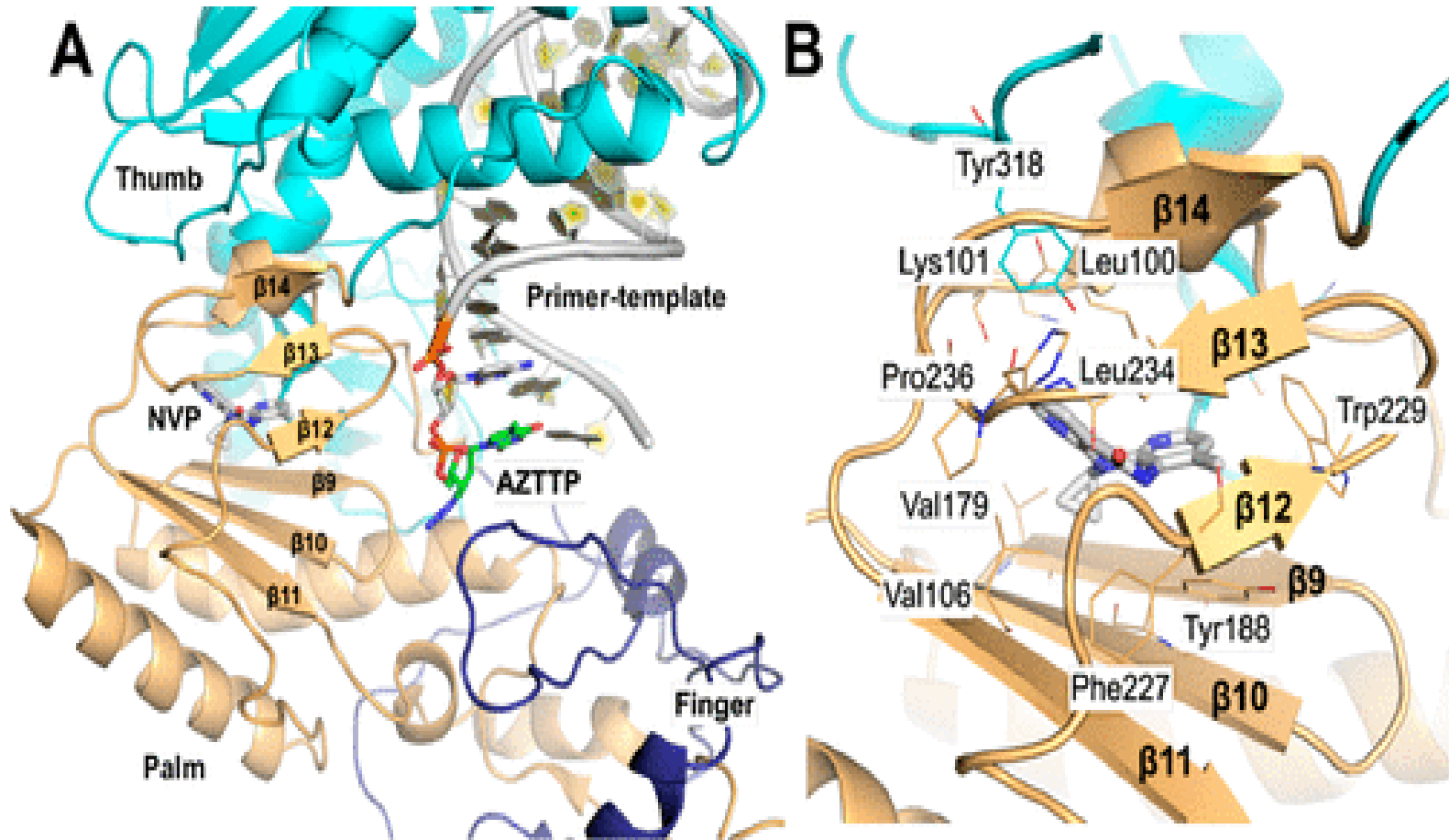
Δεν λειτουργεί με ακρίβεια, γεγονός που **ευνοεί τις ιικές μεταλλάξεις**.



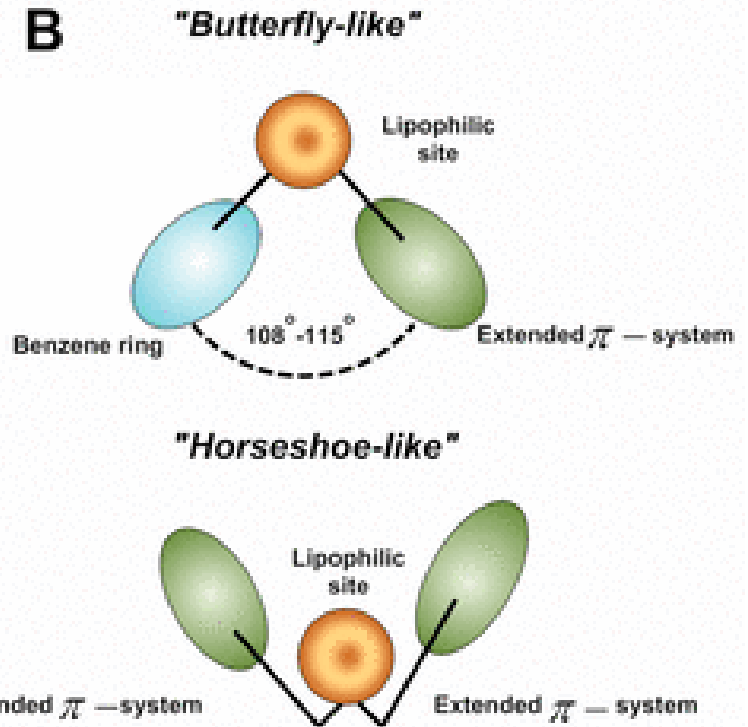
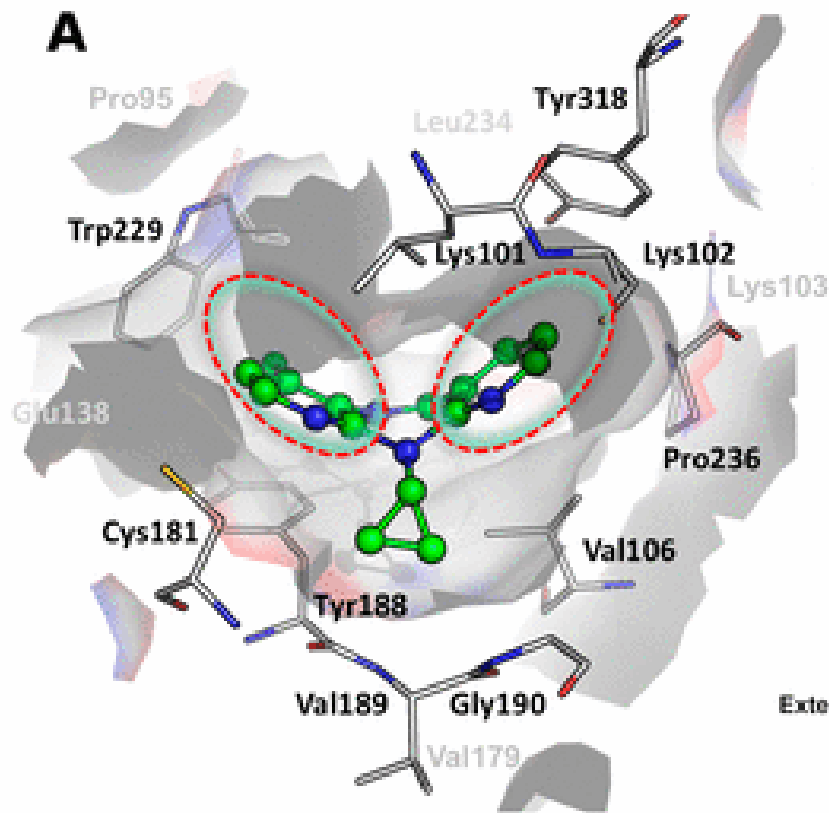
Τα NNRTIs δεσμεύονται σε μια ευπροσάρμοστη υδρόφοβη κοιλότητα (non-nucleoside inhibitor-binding pocket, NNIBP), που εντοπίζεται κοντά (σε απόσταση  $\sim 10\text{\AA}$ ), αλλά βρίσκεται σαφώς εκτός του ενεργού κέντρου της αντίστροφης μεταγραφάσης.



**Παράδειγμα:** Η δέσμευση του το nevirapine στην υδρόφοβη κοιλότητα NNIBP, εκτός του ενεργού κέντρου του ενζύμου, **μεταβάλλει τη γεωμετρία του ενεργού κέντρου** και αναστέλλει τη σύνθεση του ιικού DNA.



- (A) Τα **nevirapine** (NVP με γκρίζο χρώμα) and **AZT triphosphate** (AZTTP με πράσινο χρώμα) δεσμεύονται σε διαφορετικές θέσεις της HIV-1 RT.
- (B) Μεγέθυνση της θέσης δέσμευσης των NNRTIS στην NNIBP, όπου διακρίνονται οι αλληλεπιδράσεις του φαρμάκου με υπόλοιπα αμινοξέων



**Butterfly και horseshoe model of binding:** η εύκαμπτη κοιλότητα NNIBP μπορεί να υποδεχθεί μεγάλη ποικιλία προσδεμάτων. Η σχετική ακαμψία του nevirapine συμβάλλει στη σχετικά εύκολη ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών.

Η μελέτη της κρυσταλλογραφικής δομής πολλών NNRTIs συνδεόμενων στην NNIBP επιβεβαιώνει τη λήψη διαμόρφωσης "πεταλούδας" (υοειδές σχήμα) και επιτρέπει την αναλυτική μελέτη των επιμέρους αλληλεπιδράσεων.

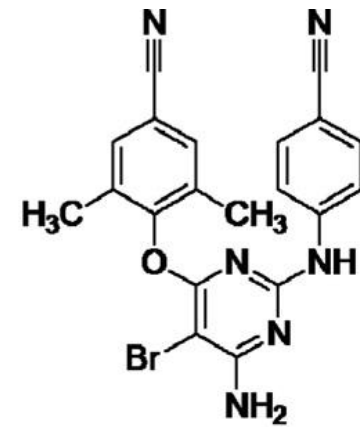
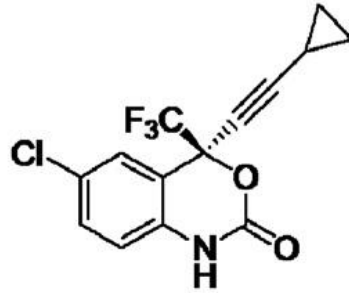
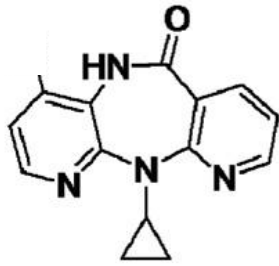
**Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ενός νέου αναστολέα του HIVκατηγορίας NNRTI μπορούν να συνοψισθούν ως εξής:**

- (1) Ισχυρή αντική δράση** έναντι wild-type και μεταλλαγμένων ιικών στελεχών
- (2) Υψηλή βιοδιαθεσιμότητα** για χορήγηση από το στόμα (χορήγηση 1/ημέρα). Είναι λιπόφιλα και χωρίς ομάδες που ιονίζονται ισχυρά στο φυσιολογικό pH.
- (3) Ελαχιστοποίηση ανεπιθύμητων ενεργειών** (ποσοστό/ σοβαρότητα). Μελέτη μεταβολισμού απαραίτητη.
- (4) Ευκολία σύνθεσης και μορφοποίησης** του σκευάσματος (μείωση του αναγκαίου κόστους).

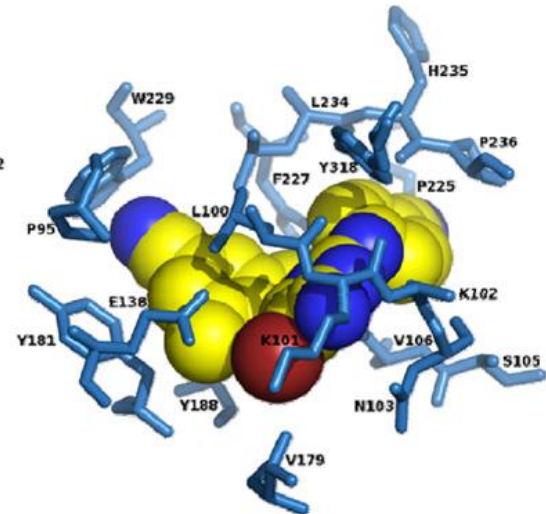
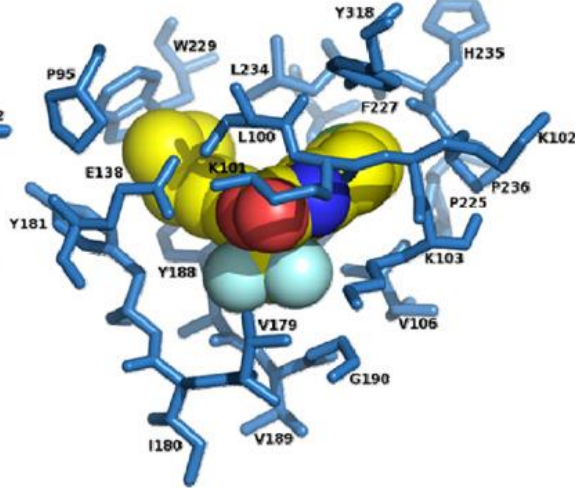
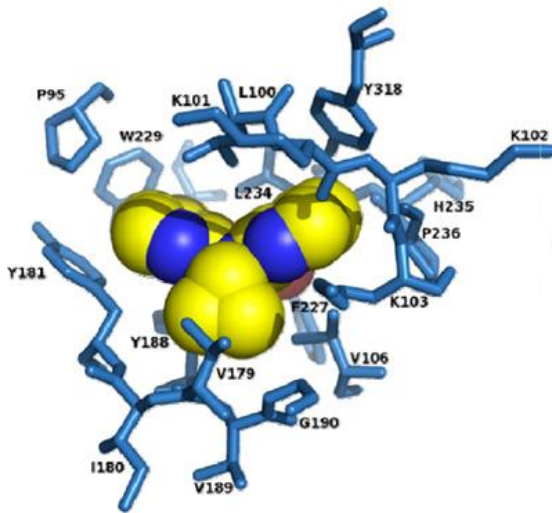
**ΠΡΟΒΛΗΜΑ:** ανάπτυξη αντοχής => **τα NNRTIs χρησιμοποιούνται μόνο σε συνδυαστικά χημειοθεραπευτικά σχήματα.**

Ο πολλαπλασιασμός του HIV δημιουργεί τη βάση για την εμφάνιση μεταλλάξεων και παρουσιάζει αναλογίες με ένα παιχνίδι σκακιού. Η στρατηγική σχεδιασμού οφείλει να λάβει υπόψη όλες τις πιθανές κινήσεις και τις εκάστοτε συνέπειες. Το φαρμακευτικό ιστορικό είναι σημαντικό, γιατί χρειάζονται συνολικά ~5 διαδοχικές μεταλλάξεις για να καταστεί ο ιός ανθεκτικός σε μια ορισμένη κατηγορία φαρμάκων.

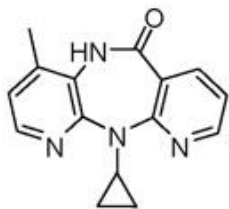
A



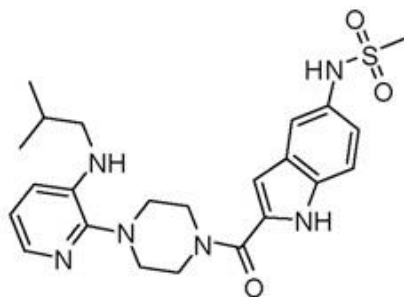
B



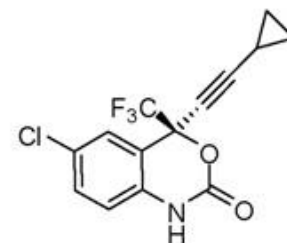
**Σχεδιασμός αναστολέων επόμενης γενιάς:** μεταβολικά σταθερότεροι, πρέπει να διατηρούν δραστηριότητα έναντι των συνηθέστερων μεταλλαγμένων στελεχών → χαρακτηριστική **αύξηση της ευκινησίας** για ισχυρότερο binding και αντιμετώπιση των μεταλλάξεων.



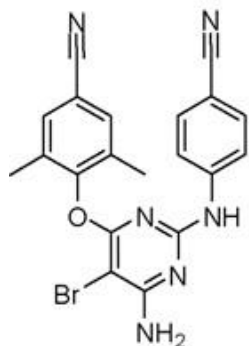
Nevirapine (BI-RG-587;  
Viramune®)



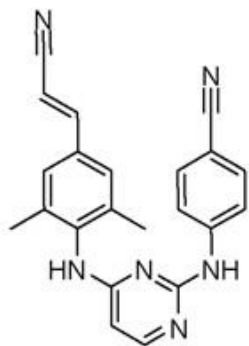
Delavirdine (U-90152; Rescriptor®)



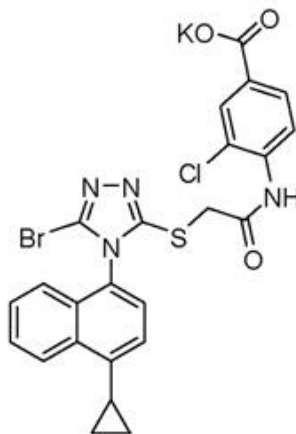
Efavirenz (DMP266;  
Stocrin™; Sustiva™)



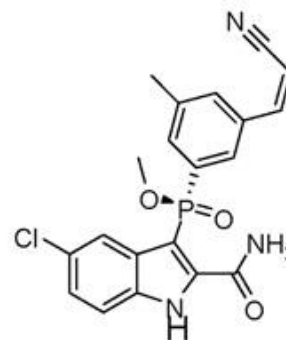
Etravirine (TMC125;  
Intence™)



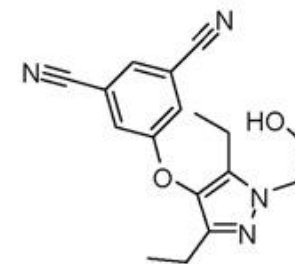
Rilpivirine (TMC278)



RDEA806

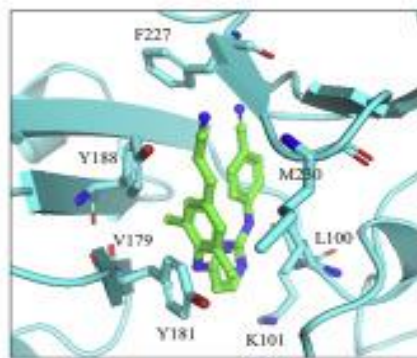
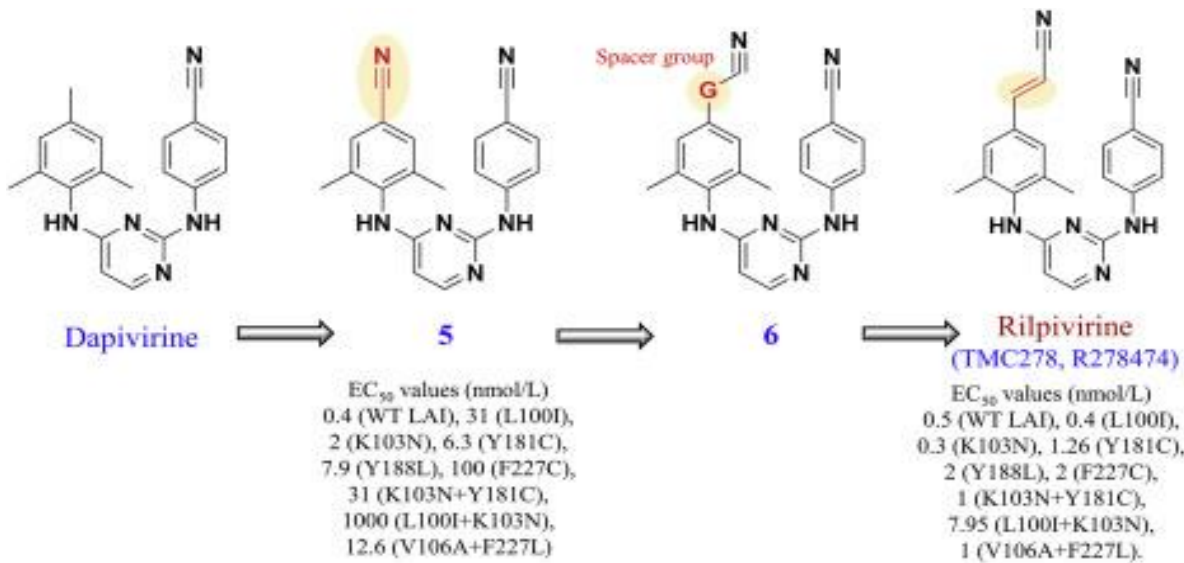


IDX899

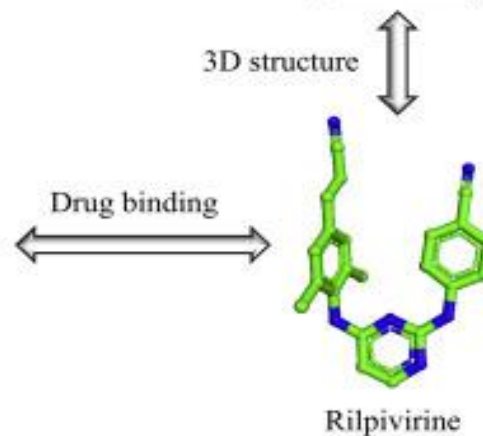


Lersivirine (UK-453061)

**Πρώτη και δεύτερη γενιά των NNRTIs**



HIV-1 reverse transcriptase

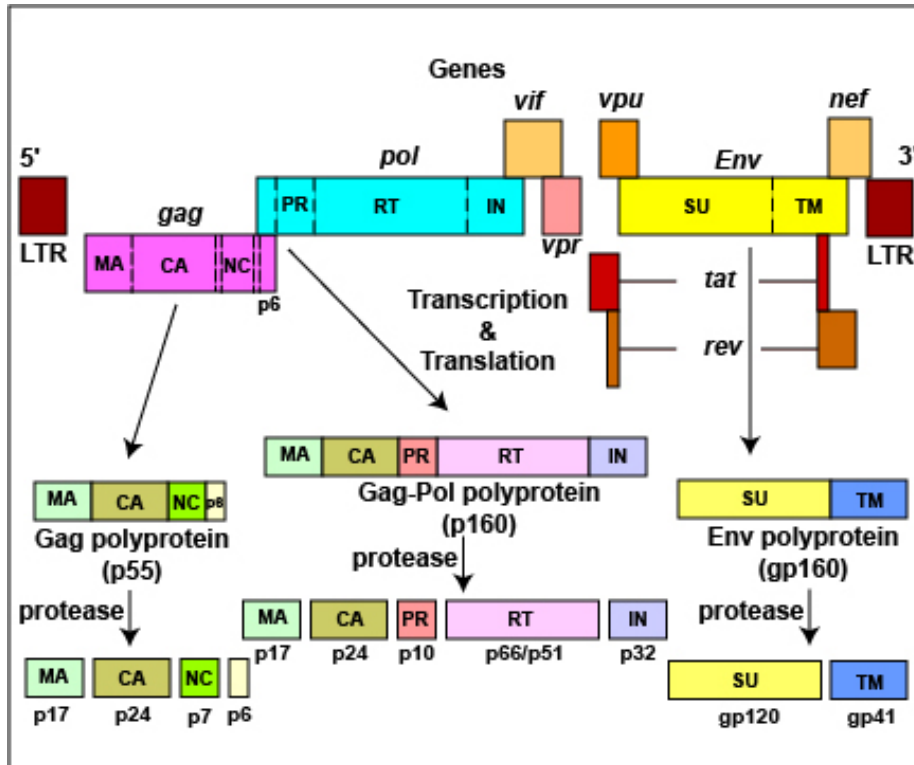


Με εισαγωγή του επιμήκους Ε-κυανοβινυλικού υποκαταστάτη στο **Dapivirine** προέκυψε το **Rilpivirine** που είναι μεταβολικά σταθερό και εξαιρετικά δραστικό (IC<sub>50</sub> 1nM σε wt και μεταλλαγμένα στελέχη).

Η ευκινησία του μορίου είναι σημαντική για τη διατήρηση των αλληλεπιδράσεων σε στελέχη που λόγω μεταλλάξεων αντικαθιστούν αμινοξέα.

Ευκολία σύνθεσης και λήψης του δραστικού Ε-ισομερούς

## Αναστολείς της HIV πρωτεάσης

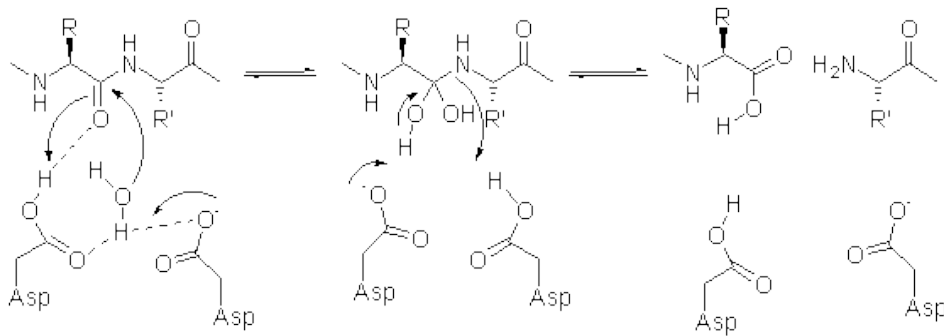


Το γενετικό υλικό του HIV περιέχει γονίδια όπως τα *gag* και *gag-pol*, που μεταφράζονται σε πρόδρομες πολυπρωτεΐνες στα ανώριμα ιικά σωματίδια.

Οι πολυπρωτεΐνες διασπώνται σε συγκεκριμένες θέσεις από μια ιική ασπαρτική πρωτεάση προς μικρότερες, λειτουργικές και δομικές πρωτεΐνες του ώριμου ιικού σωματίου.

Με τον τρόπο αυτό παράγονται οι **δομικές πρωτεΐνες** p7, p9, p17 και p24, και **λειτουργικά ένζυμα**, όπως η αντίστροφη μεταγραφάση.

## Αναστολείς της HIV πρωτεάσης

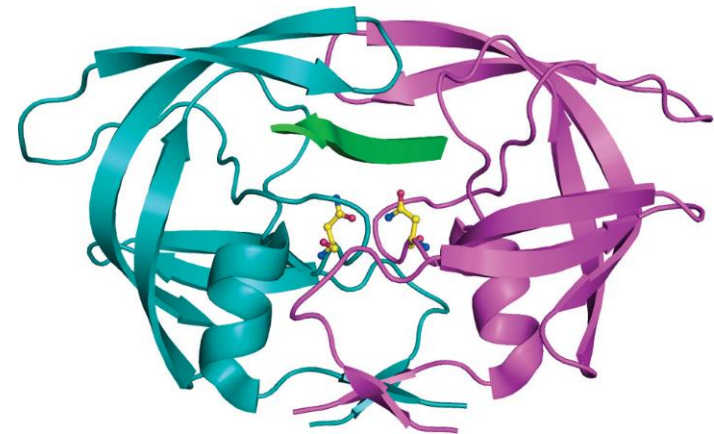
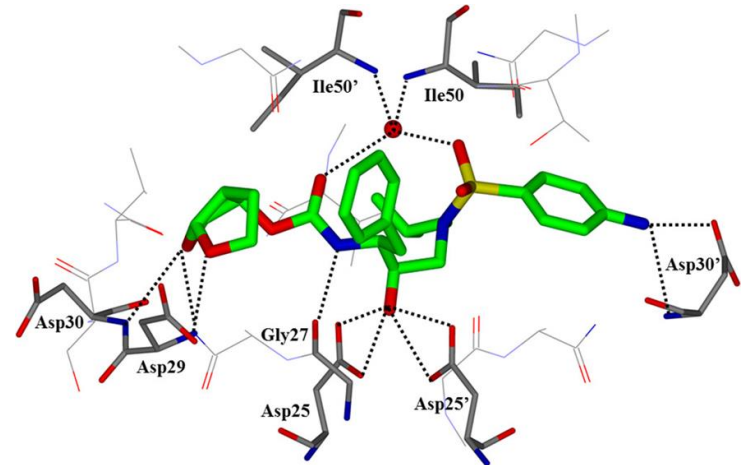


Η HIV πρωτεάση είναι ομοδιμερής ασπαρτική πρωτεάση, με 2 συντηρημένα Asp στο ενεργό κέντρο. Ενώ το ένα Asp δεσμεύεται με το πεπτιδικό καρβονύλιο που θα υδρολυθεί, το άλλο καθιστά το  $H_2O$  ισχυρότερο πυρηνόφιλο, διευκολύνοντας την υδρόλυση.

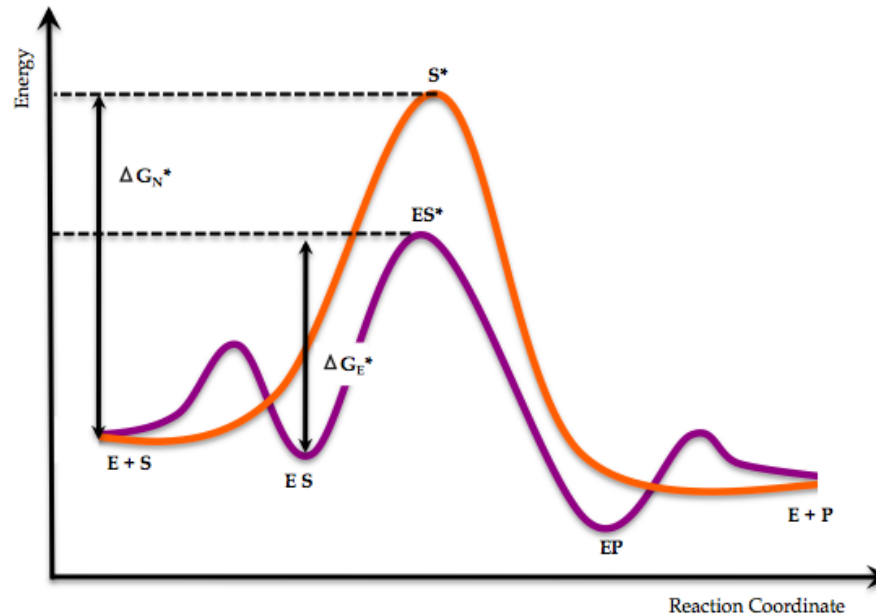
Υδρολύει σε 9 θέσεις, τελικά ως προς προλίνη, ή φαινυλαλανίνη. Το ενεργό κέντρο εντοπίζεται μεταξύ των υπομονάδων.

Οι ανθρώπινες ασπαρτικές πρωτεάσες είναι διαφορετικές και διαθέτουν μόνο ένα Asp στο ενεργό κέντρο.

Αναπτύχθηκαν πεπτιδικοί, πεπτιδομιμητικοί και μη πεπτιδομιμητικοί αναστολείς.



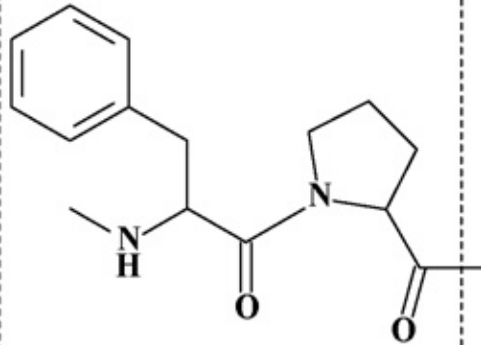
Οι αναστολείς της HIV πρωτεάσης σχεδιάστηκαν ως μη υδρολύσιμα  
ισομερή του transition-state.



**Transition state mimics** – περισσότερο εφικτά με την πρόοδο υπολογιστικής χημείας, συνθετικής χημείας, ενζυμολογίας, κρυσταλλογραφίας και απεικονιστικών τεχνικών.



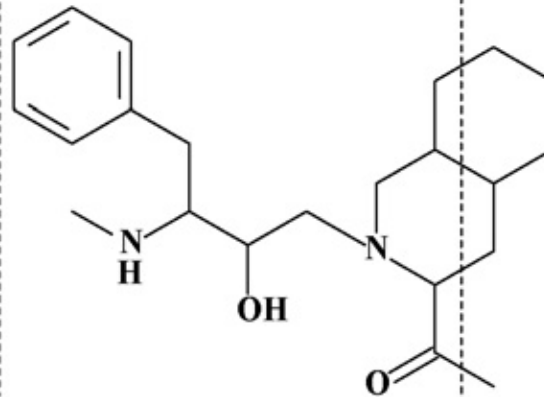
Substrate



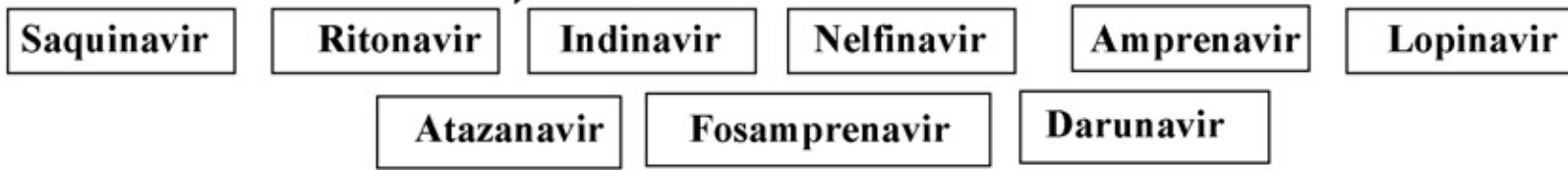
peptidic bond

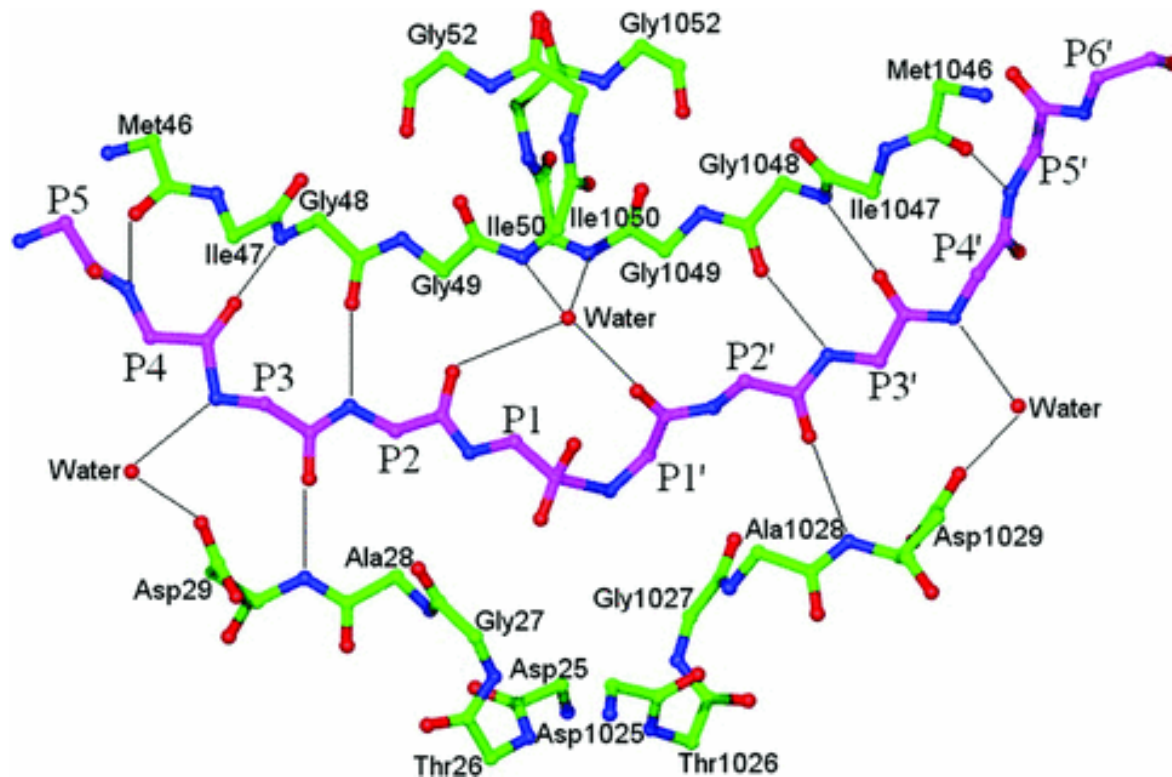
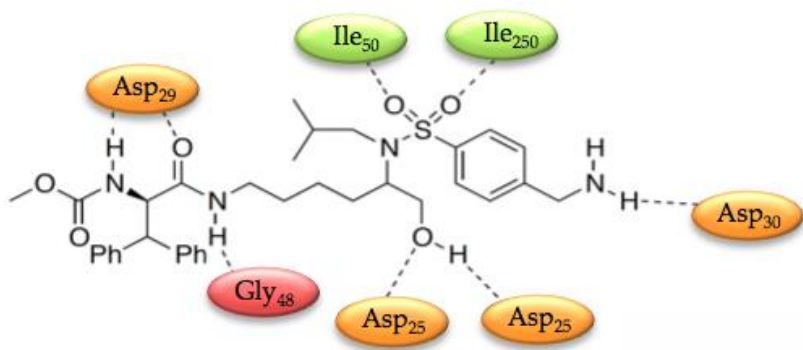
Αν ο πεπτιδικός δεσμός  $-NH-CO-$  αντικατασταθεί από υδροξυαιθυλενομάδα  $(-CH_2-CH(OH)-)$ , η HIV πρωτεάση δεν θα μπορέσει να υδρολύσει.

Inhibitor

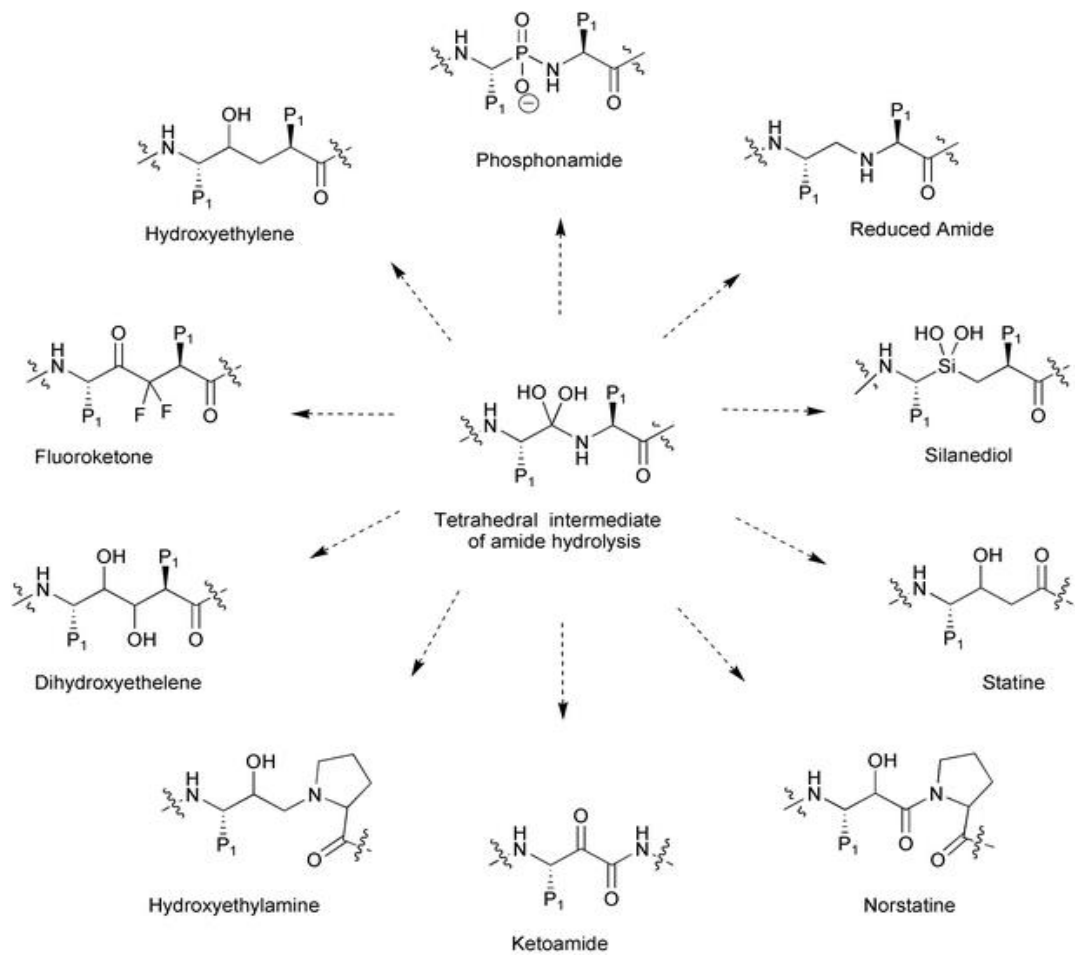


hydroxyethylene bond

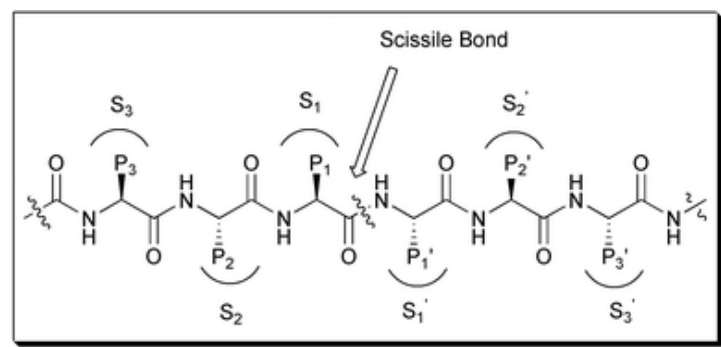




Μελέτη της γεωμετρίας του ενεργού κέντρου – **min περιοχή αναγνώρισης: 7 αμινοξέα εκατέρωθεν του P1-P'1**. Διακρίνεται το **tetracoordinated structural water** που δεσμεύεται με τις δύο **Ileu** και το stretching του πεπτιδικού δεσμού εκτός επιπέδου.



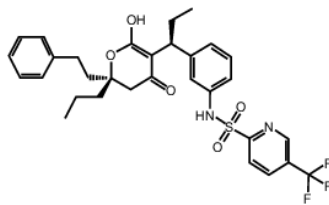
Λιπόφιλοι υποκαταστάτες του αναστολέα δεσμεύονται σε παρακείμενες κοιλότητες του ενζύμου, ενώ το backbone αναπτύσσει εκτεταμένο δίκτυο δ.Η με αμινοξέα του ενεργού κέντρου, για να περιορίσει τη δυνατότητα μεταλλάξεων και την εμφάνιση επαγόμενης αντοχής, αφού η **γεωμετρία της καταλυτικής περιοχής πρέπει να διατηρηθεί για να διατηρηθεί η λειτουργικότητα του ενζύμου.**



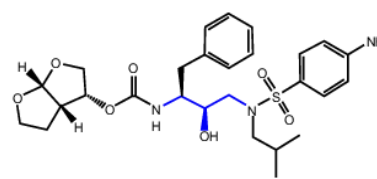
Τα μόρια των πεπτιδομιμητικών αναστολέων διαθέτουν ένα **κεντρικό μη υδρολύμενο ισοστερές του transition-state** (2-υδροξυαιθυλαμίνη στο Saquinavir).

Στο ίδιο μόριο, η επιλογή της τετραϋδροισοκινολίνης συνεισφέρει στην υδατοδιαλυτότητα και τη μείωση των βαθμών ελευθερίας (επιθυμητή η σχετική ακαμψία).

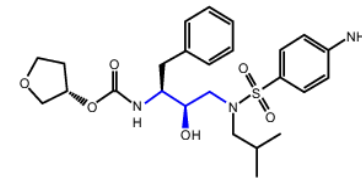
Οι αναστολείς της HIV πρωτεάσης αποτελούν το 40% των διαθέσιμων αντι-HIV φαρμάκων.



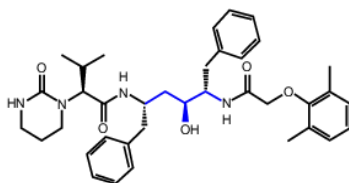
Tipranavir



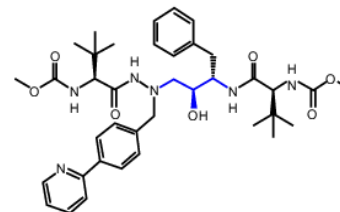
Darunavir



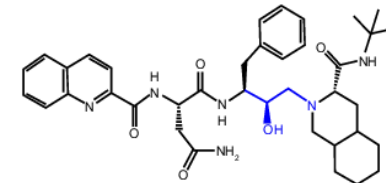
Amprenavir



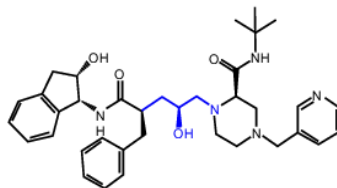
Lopinavir



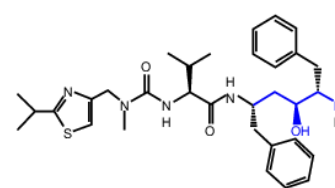
Atazanavir



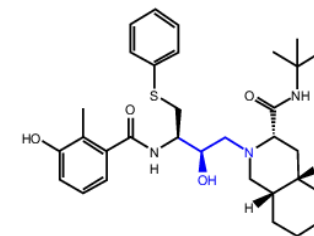
Saquinavir



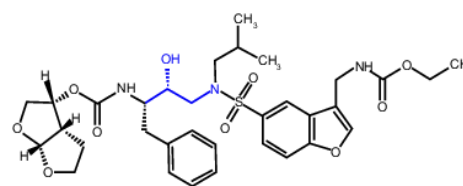
Indinavir



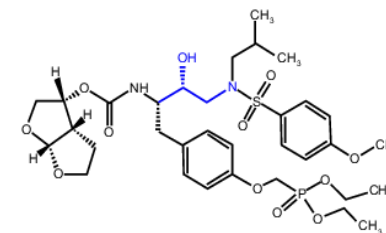
Ritonavir



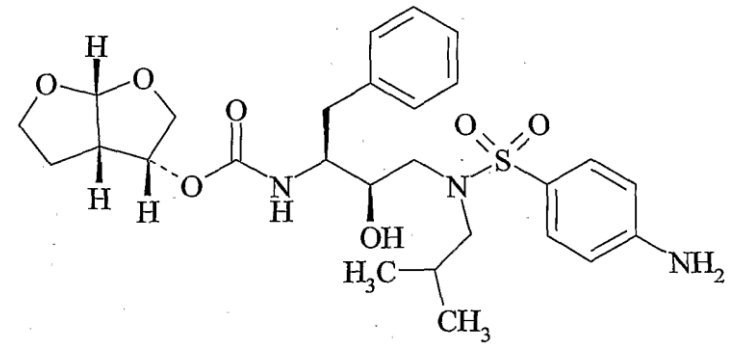
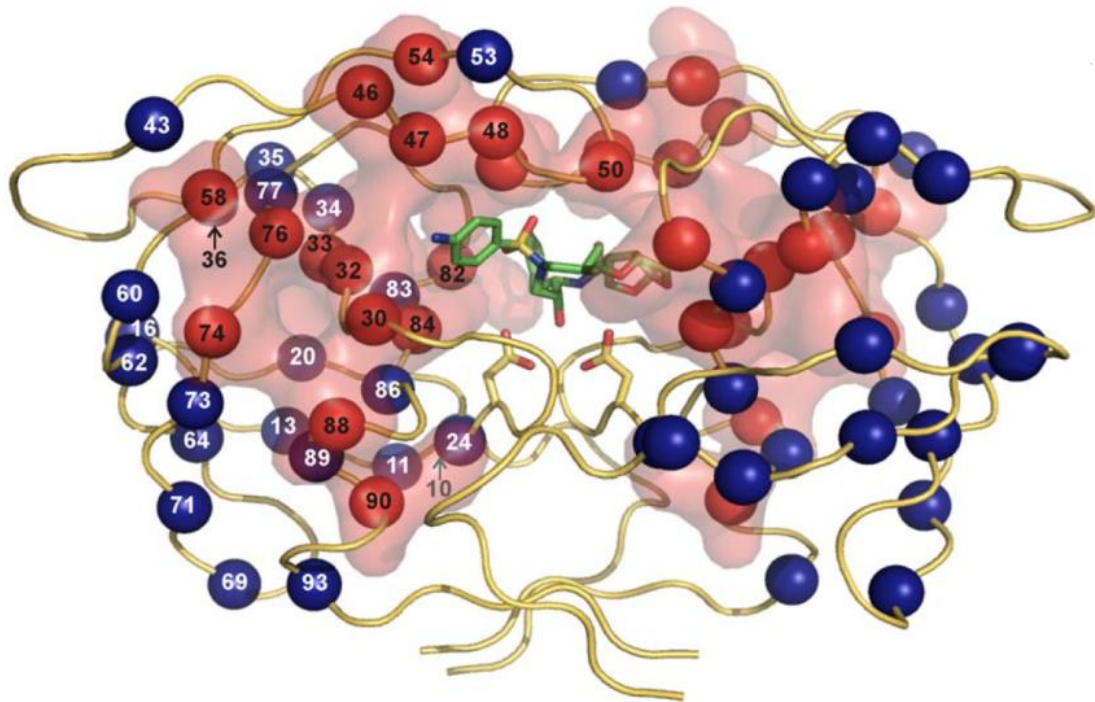
Nelfinavir



SPI-256

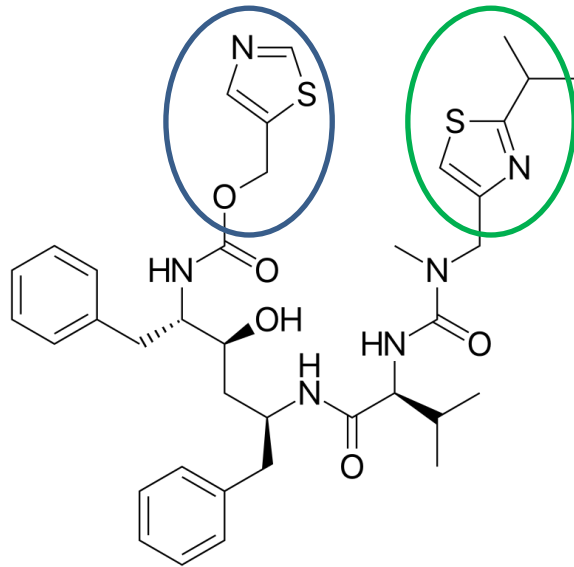


GS 8374

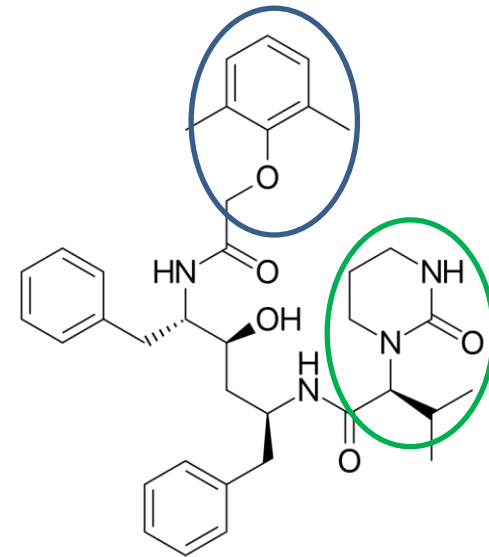


Μελέτη του τρόπου σύνδεσης του ισχυρότερου αναστολέα (Darunavir) στο ενεργό κέντρο της πρωτεάσης.

**Σχεδιασμός αναστολέων επόμενων γενεών:** Με μπλε σφαίρες φαίνονται οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με την χορήγηση των κλινικά διαθέσιμων αναστολέων.



ritonavir



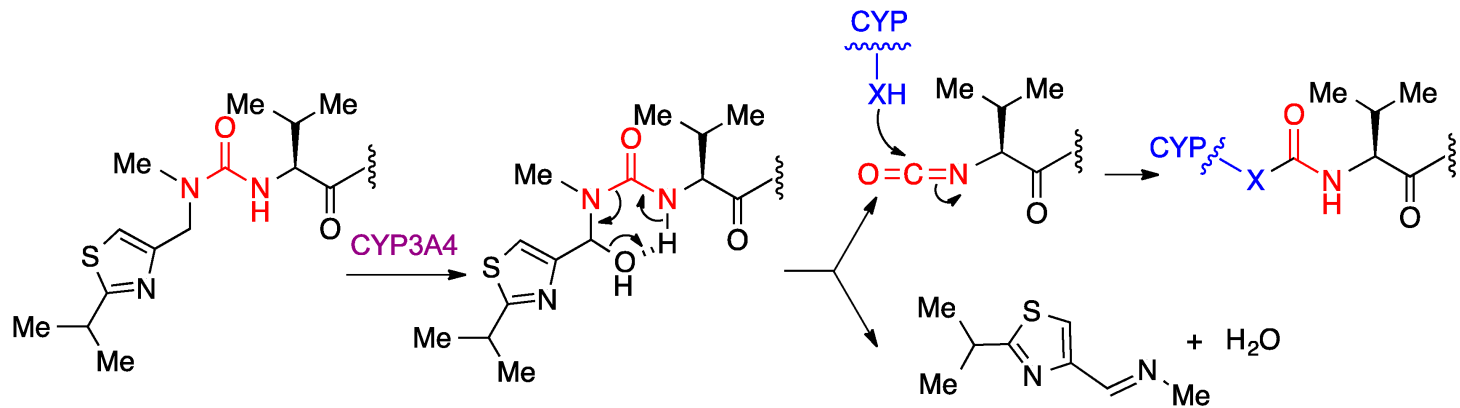
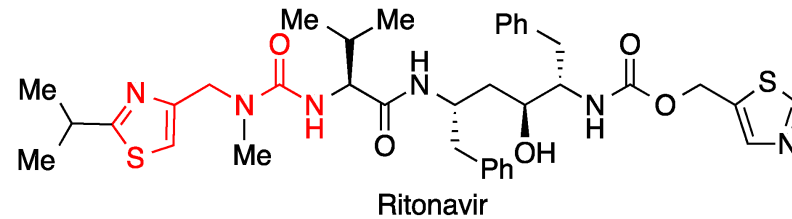
lopinavir

## Ανάπτυξη αντοχής – μεταβολική σταθεροποίηση

### Ο συνδυασμός Lopinavir + Ritonavir

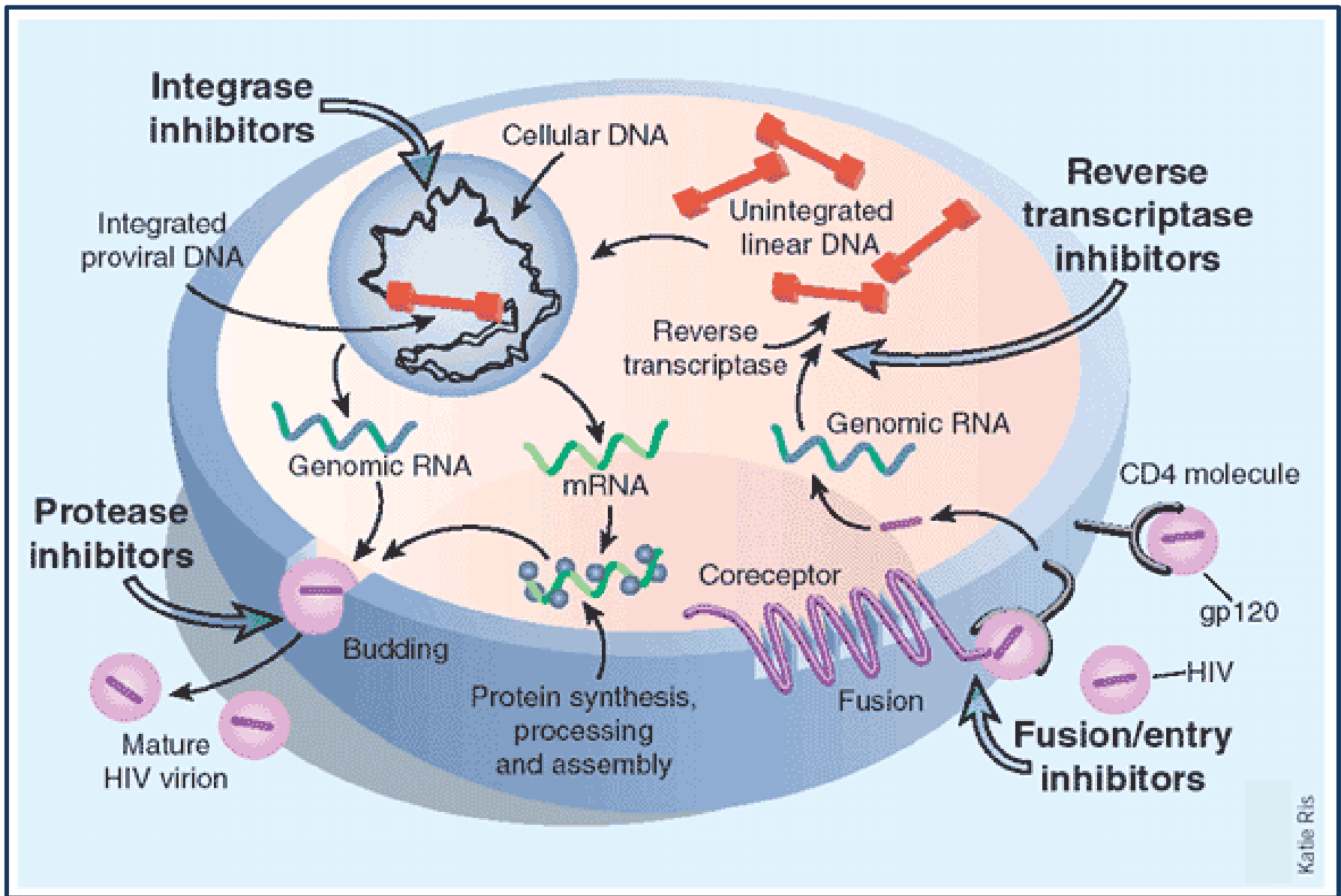
**To ritonavir** παρουσιάζει μικρή βιοδιαθεσιμότητα και έχει απωλέσει μέρος της δραστηριότητάς του στα μεταλλαγμένα στελέχη, όμως είναι ισχυρός αναστολέας του CYP3A4.

**To lopinavir** δομικό ανάλογο του ritonavir διατηρεί τη δραστηριότητά του έναντι ανθεκτικών στελεχών, απενεργοποιείται όμως τάχιστα μεταβολικά, απουσία του Ritonavir.



### Το Ritonavir αναστέλλει μη αντιστρεπτά το CYP3A4.

Αρχικά οξειδώνεται και διασπάται σε ισοκυανικό ενδιάμεσο που προσβάλλεται εύκολα από ομάδα του κυτοχρώματος προς σχηματισμό καρβαμιδικού εστέρα.

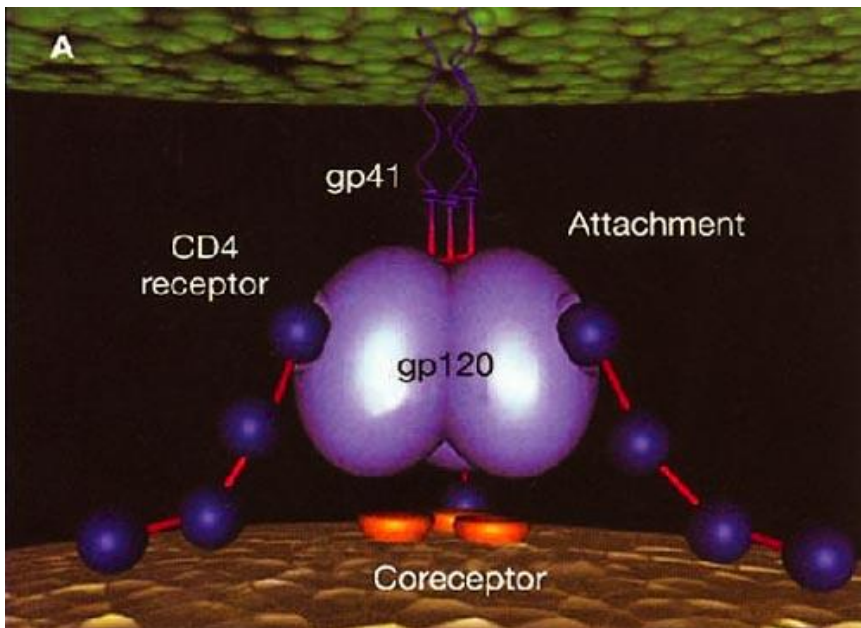
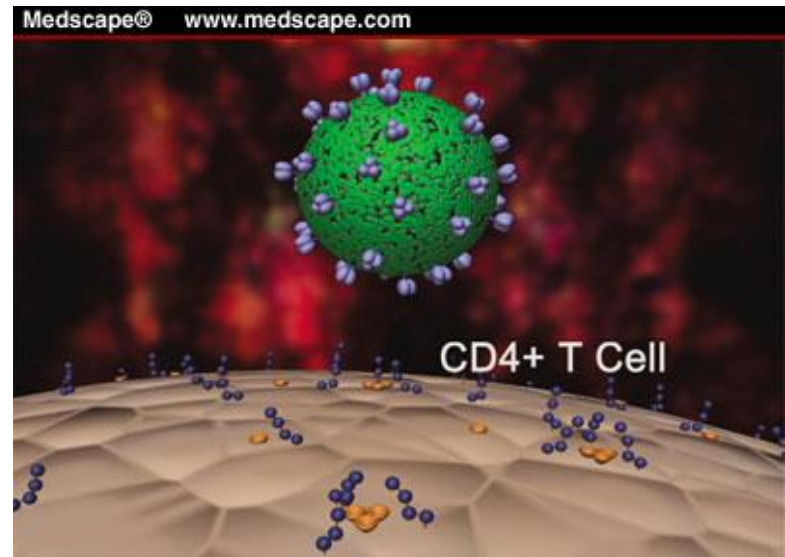


Katie Ris

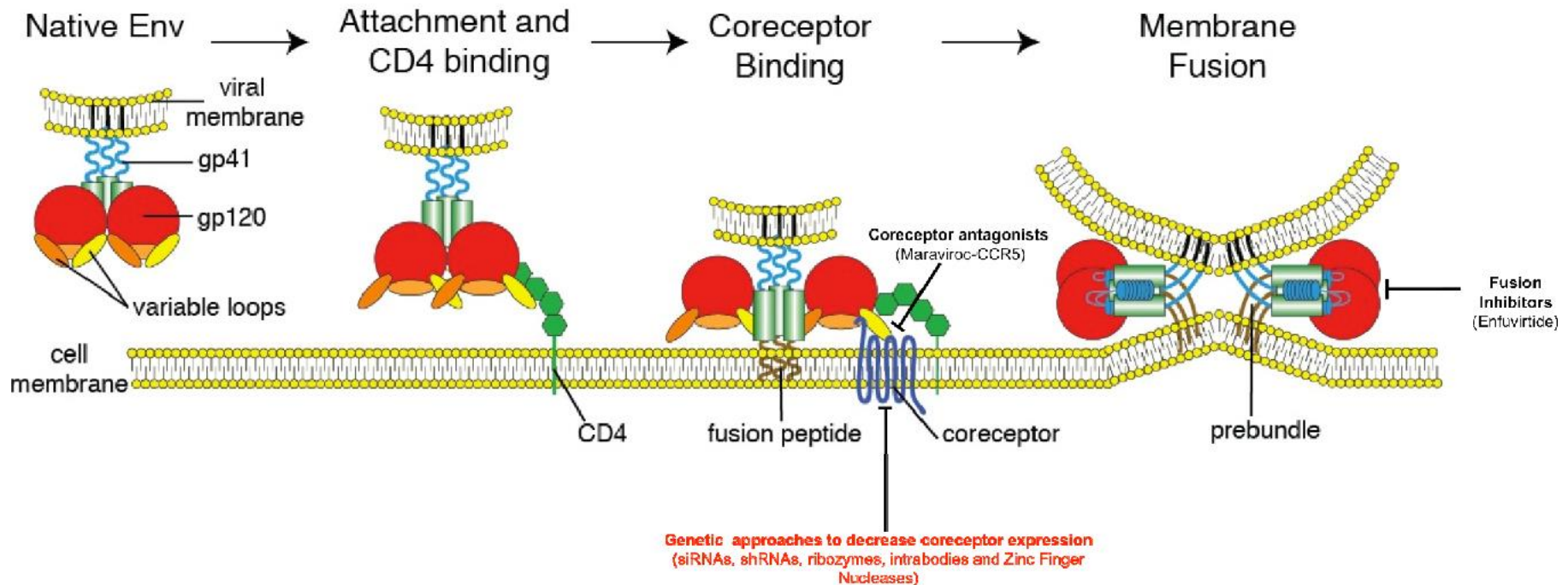
Η διαδοχική χημειοθεραπευτική επέμβαση αντιμετωπίζει ικανοποιητικά την υψηλή ικανότητα μετάλλαξης του HIV

## Αναστολείς της κυτταρικής διείσδυσης του HIV-1: (Entry inhibitors, EI) – Αναστολείς της gp41: enfuvirtide

Η επαφή του ιού με την επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης ευνοεί την προσκόλληση της gp120 στον υποδοχέα CD4 των Τ-λεμφοκυττάρων



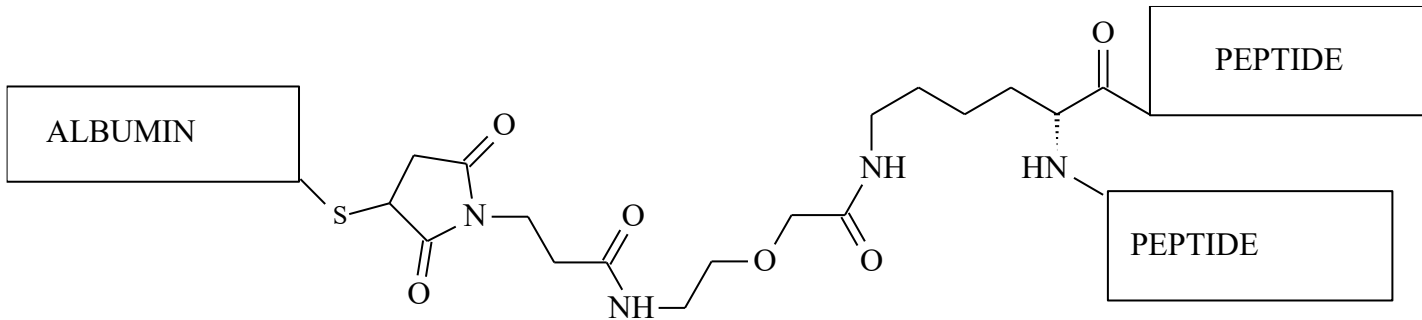
Η τριμερής gp120 υφίσταται μια σημαντική δομική αλλαγή, που επιτρέπει την αλληλεπίδραση της και με ένα συν-υποδοχέα, (πχ τον υποδοχέα κυτοκινών **CCR5**), με αποτέλεσμα την ισχυροποίηση της πρόσδεσης του ιού και την έναρξη της σύντηξης του ιικού φακέλου με την κυτταρική μεμβράνη.



*Antiviral Research Vol 85, Tilton J.C. and Doms R.W, "Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection," 91-100, Copyright 2009*

Η είσοδος του ιού περιλαμβάνει πολλά στάδια, αλλά είναι μια ειδική για τον ιό διαδικασία = εφικτός φαρμακευτικός στόχος, αναστολής ενός ή περισσότερων διαδοχικών βημάτων.

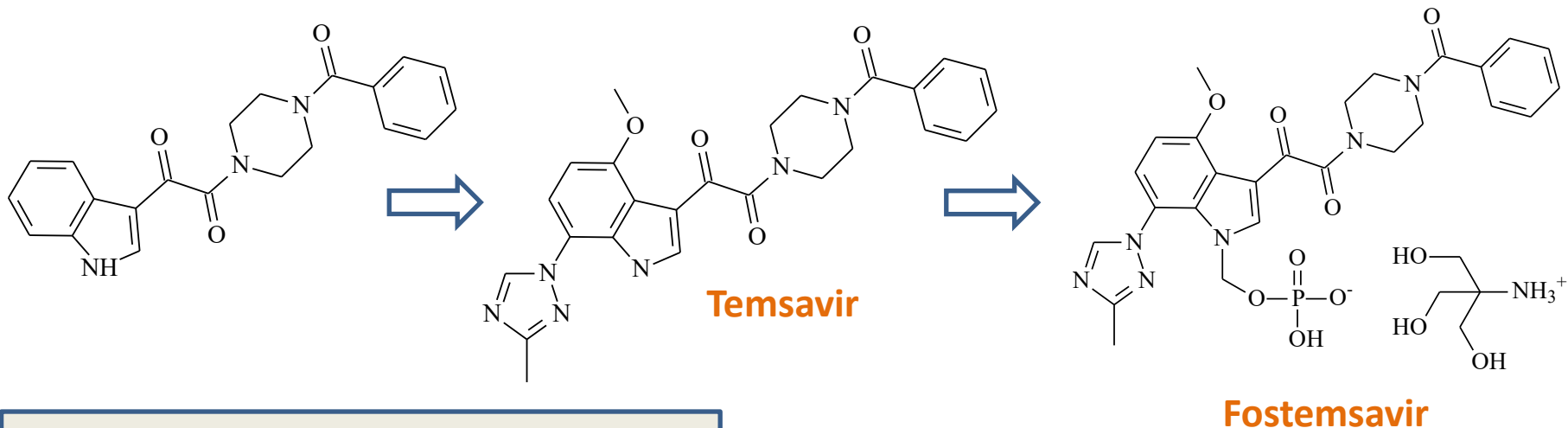




**Albuvirtide:** Σημαντική αύξηση του χρόνου ημιζωής του φαρμάκου σε 11–12 ημέρες έγινε εφικτή με τη σύνδεση του μέσω linker με αλβουμίνη.

Το δοσολογικό σχήμα βελτιώθηκε, αφού επιτρέπει τη χορήγηση του φαρμάκου με 1 ένεση /εβδομάδα.

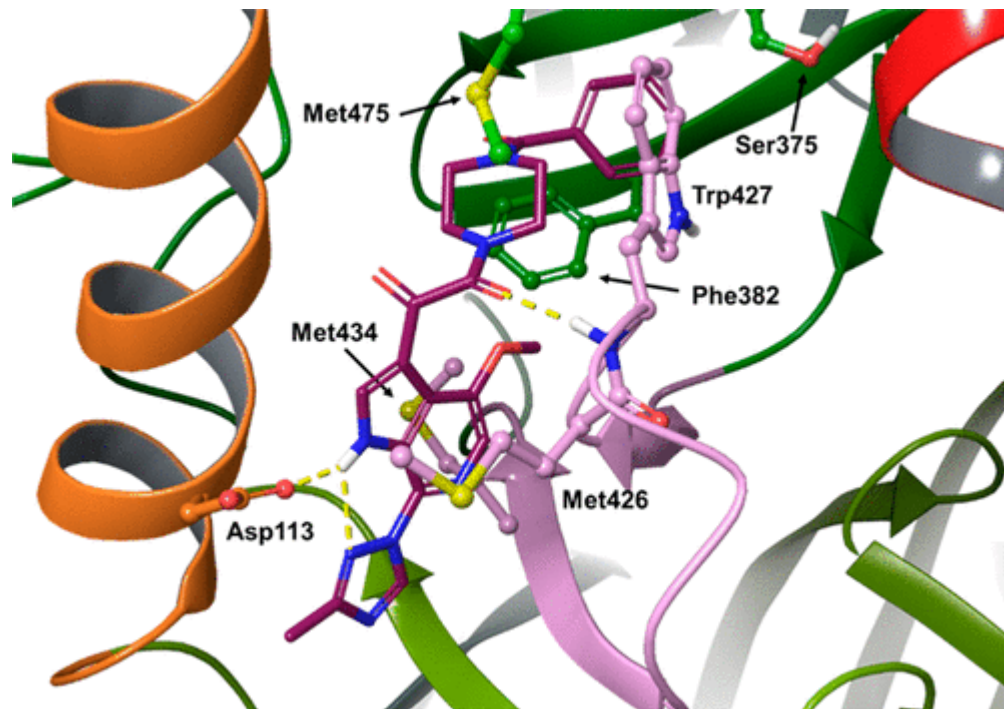
Εγκρίθηκε στην Κίνα, το 2018. Για ΗΠΑ/ Ευρώπη βρίσκεται ακόμη σε κλινικές δοκιμές.



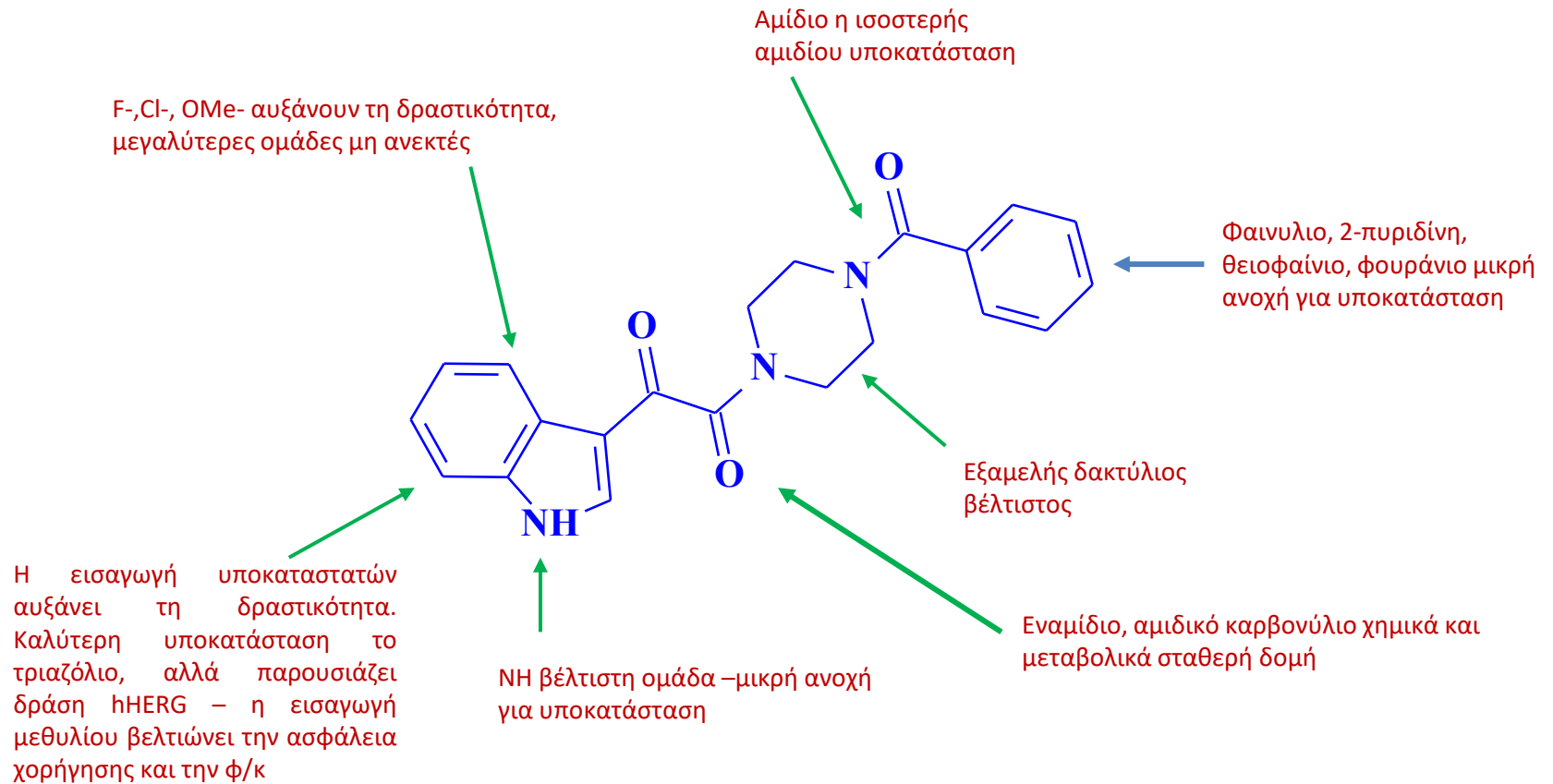
**Αναστολείς της κυτταρικής διείσδυσης του HIV-1. Αναστολείς της δέσμησης της gp120 στον CD4.**

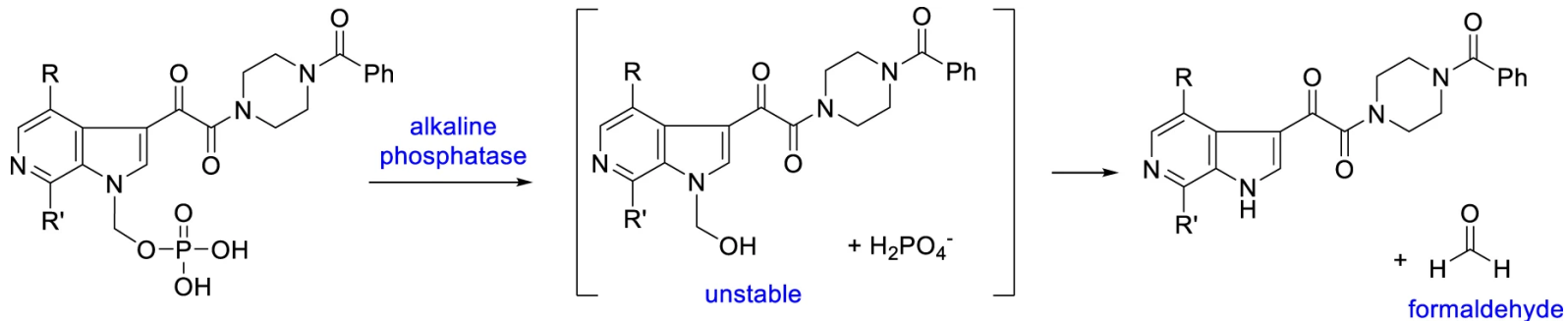
Το **Temsavir** είναι αλλοστερικός αναστολέας. Δεσμεύεται πλησίον της κοιλότητας του CD4 που υποδέχεται την ιική gp120 και σταθεροποιεί κλειστή διαμόρφωση της που δεν αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα CCR5.

Στην κρυσταλλογραφία φαίνονται υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και δH, με το βενζαμίδιο να καταλαμβάνει τη θέση μιας τρυπτοφάνης, κατά τη λήψη της ανοιχτής διαμόρφωσης. Σε υψηλές συγκεντρώσεις το φάρμακο συμπλέκεται πλήρως και στις 3 υπομονάδες (σύμπλοκο 3:3)



Η ανάπτυξη του φαρμάκου έγινε στη βάση σχέσεων δομής δράσης παραγώγων γλυοξαμιδίου για τη βελτιστοποίηση αντιικικής δράσης και φ/κ συμπεριφοράς





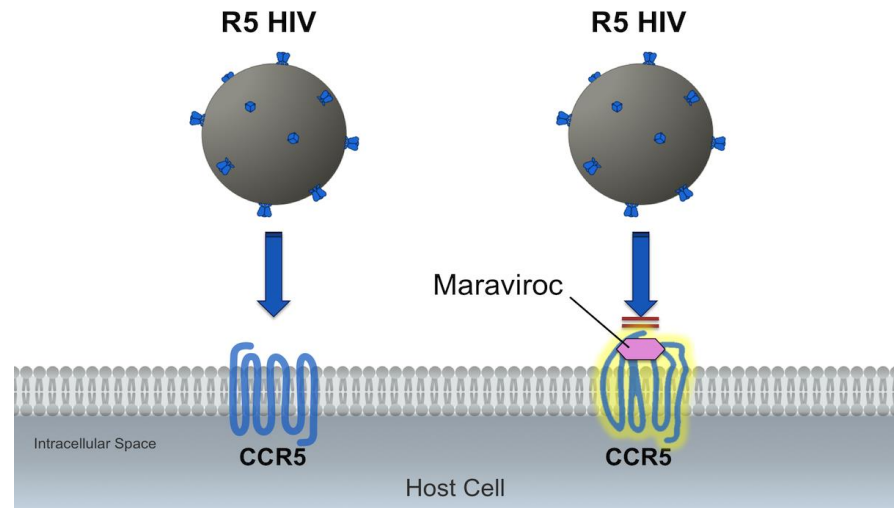
**Fostemsavir:** μετά από πολύχρονη ερευνητική προσπάθεια ανακαλύφθηκε, αναπτύχθηκε και κυκλοφόρησε σε μορφή ελεγχόμενης αποδέσμευσης το άλας του **φωσφονοξυμεθυλοπροφαρμάκου του Temsavir** (FDA appr 2020, EMEA 2021), που είναι υδατοδιαλυτό, σταθερό σε όξινο και ουδέτερο περιβάλλον, με βιοδιαθεσιμότητα OB >80% για χορήγηση από το στόμα.

Πρόκειται για πολύ αποτελεσματικό φάρμακο για τον έλεγχο του ιικού φορτίου σε ασθενείς.

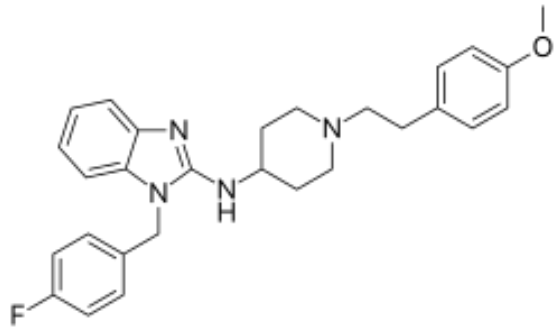
## Αναστολείς της διείσδυσης του HIV-1 – τροποποιητές του CCR5 Maraviroc

Το **Maraviroc** δρα ως αλλοστερικός τροποποιητής του υποδοχέα κυτοκινών CCR5, που παίζει ρόλο συν-υποδοχέα για την είσοδο του HIV στο κύτταρο και σχετίζεται με τον τροπισμό του ιού.

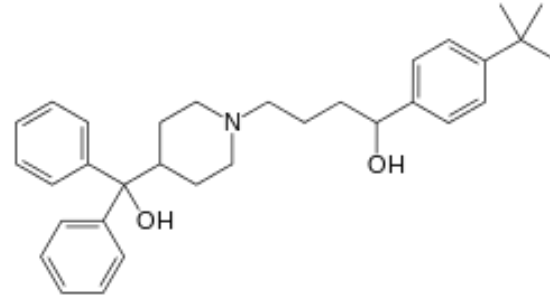
Σταθεροποιεί μια διαμόρφωση του CCR5 που δεν αναγνωρίζεται από την ιική gp120.



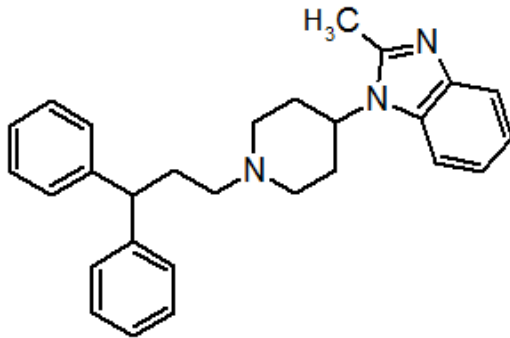
Κατά τη διαδικασία ανάπτυξης του φαρμάκου αντιμετωπίστηκε το πρόβλημα **διαφοροποίησης της αντι-ϊκής δράσης, έναντι της off-target αναστολής της α-υπομονάδας του τασεοεξαρτώμενου νευρωνικού και καρδιακού διαύλου καλίου hERG** (προϊόν του γονιδίου human Ether-a go-go Related Gene – γνωστό anti-target στην ανάπτυξη φαρμάκων) => κίνδυνος πρόκλησης σοβαρών κοιλιακών αρρυθμιών, ως και αιφνιδίου θανάτου.



Astemizole



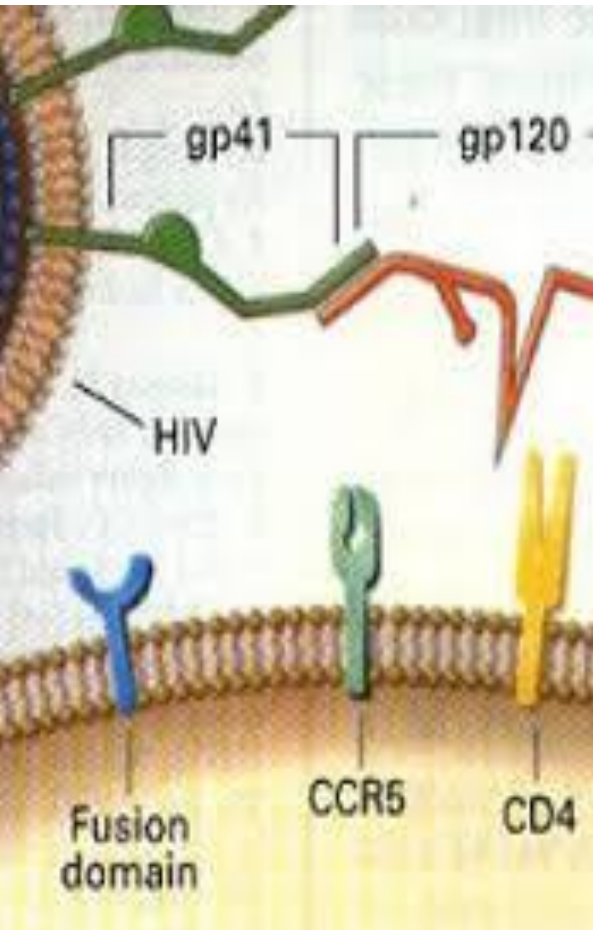
Terfenadine



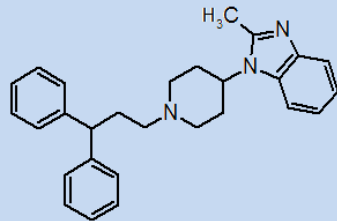
Maraviroc hit

Η αναστολή του hERG έχει προκαλέσει την απόσυρση φαρμάκων που είναι παράγωγα της θετικά φορτισμένης πιπεριδίνης (πχ terfenadine και astemizole).

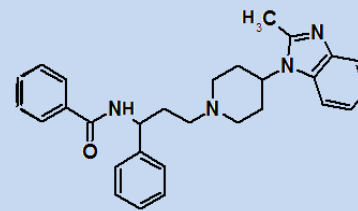
# Η διαδικασία ανάπτυξης του Maraviroc



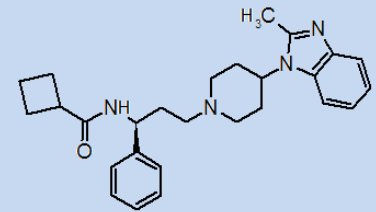
Hit: ασθενής σύνδεση, έλλειψη αντιϊκής δράσης – ταχύς μεταβολισμός



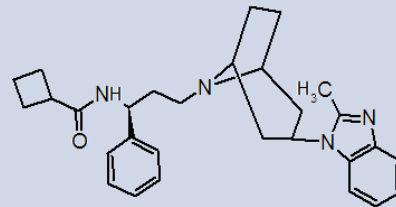
Εισαγωγή αμιδίου: μείωση λιποφιλίας, ασθενής αντιϊκή δράση, σχετική μεταβολική σταθερότητα (CYP2D6).



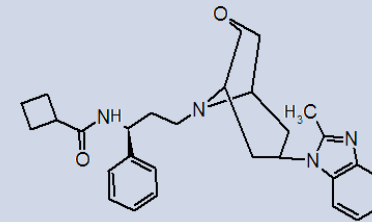
Επιλογή του δραστικότερου εναντιομερούς



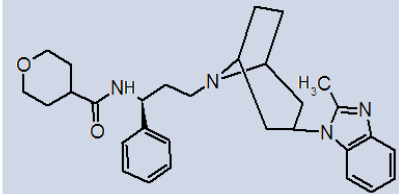
Η αζαδικυκλική αμίνη αυξάνει τη μεταβολική σταθερότητα (CYP2D6) - **99% αναστολή hERG**



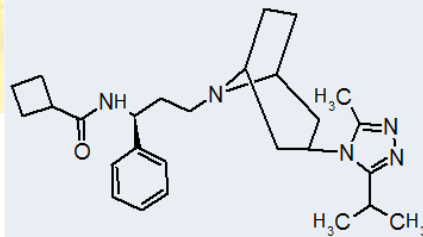
Μείωση αναστολής hERG, όμως **μειώνεται και η αντιϊκή δράση**



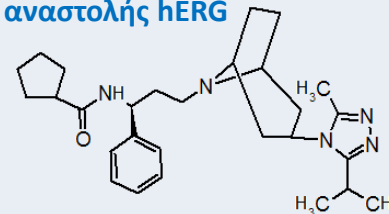
Μείωση αναστολής hERG + διατήρηση αντιϊκής δράσης **μικρή βιοδιαθεσιμότητα**



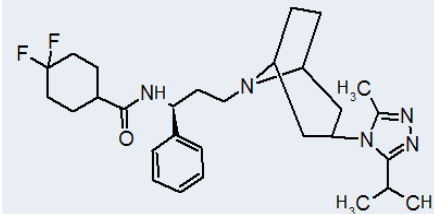
Μείωση λιποφιλίας, **αύξηση αναστολής hERG**



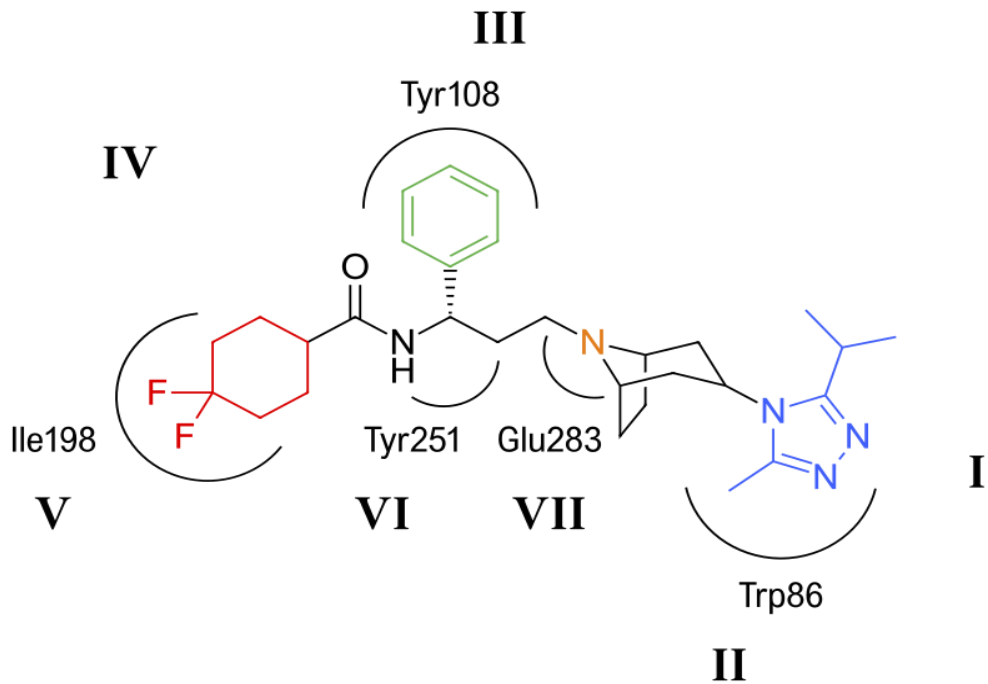
Ογκωδέστερος υποκαταστατης αμιδίου: αύξηση αντιϊκής δράσης, ελαχιστοποίηση αναστολής hERG



Η εισαγωγή των 4-gem-φθοριών εκμηδενίζει την αναστολή του hERG

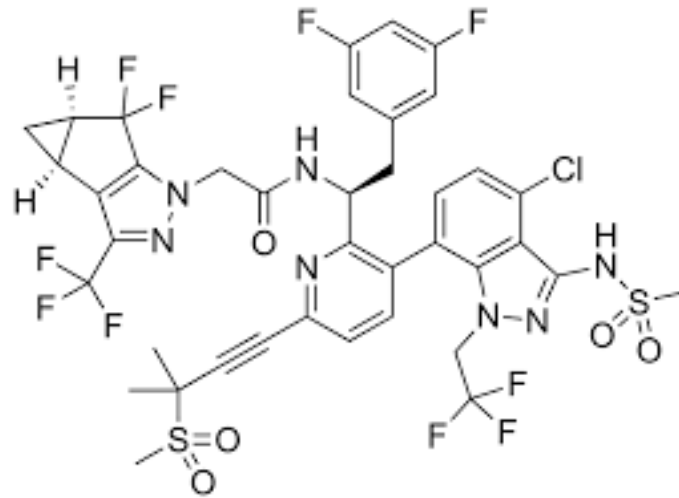


Το **Maraviroc** αποτελεί επιτυχημένο παράδειγμα αντι-ϊικού φαρμάκου που στοχεύει κυτταρικό υποδοχέα και όχι ιικό ένζυμο. Θεωρείται κατάλληλο για συνδυαστικά χημειοθεραπευτικά σχήματα, πχ με αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης και της HIV-πρωτεάσης.

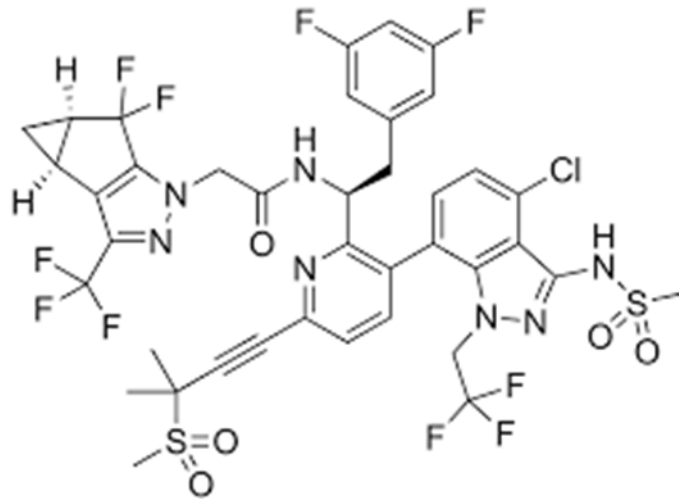


Χορηγείται μόνο μετά από τη διαπίστωση του τροπισμού των στελεχών (αναπτύχθηκε ειδικό διαγνωστικό test), καθώς δεν είναι αποτελεσματικό εάν ο ιός χρησιμοποιεί ως συν-υποδοχέα τον CXCR4.

Ο πρώτος αναστολέας της πρωτεΐνης του ιικού καψιδίου: **Lenacapavir**



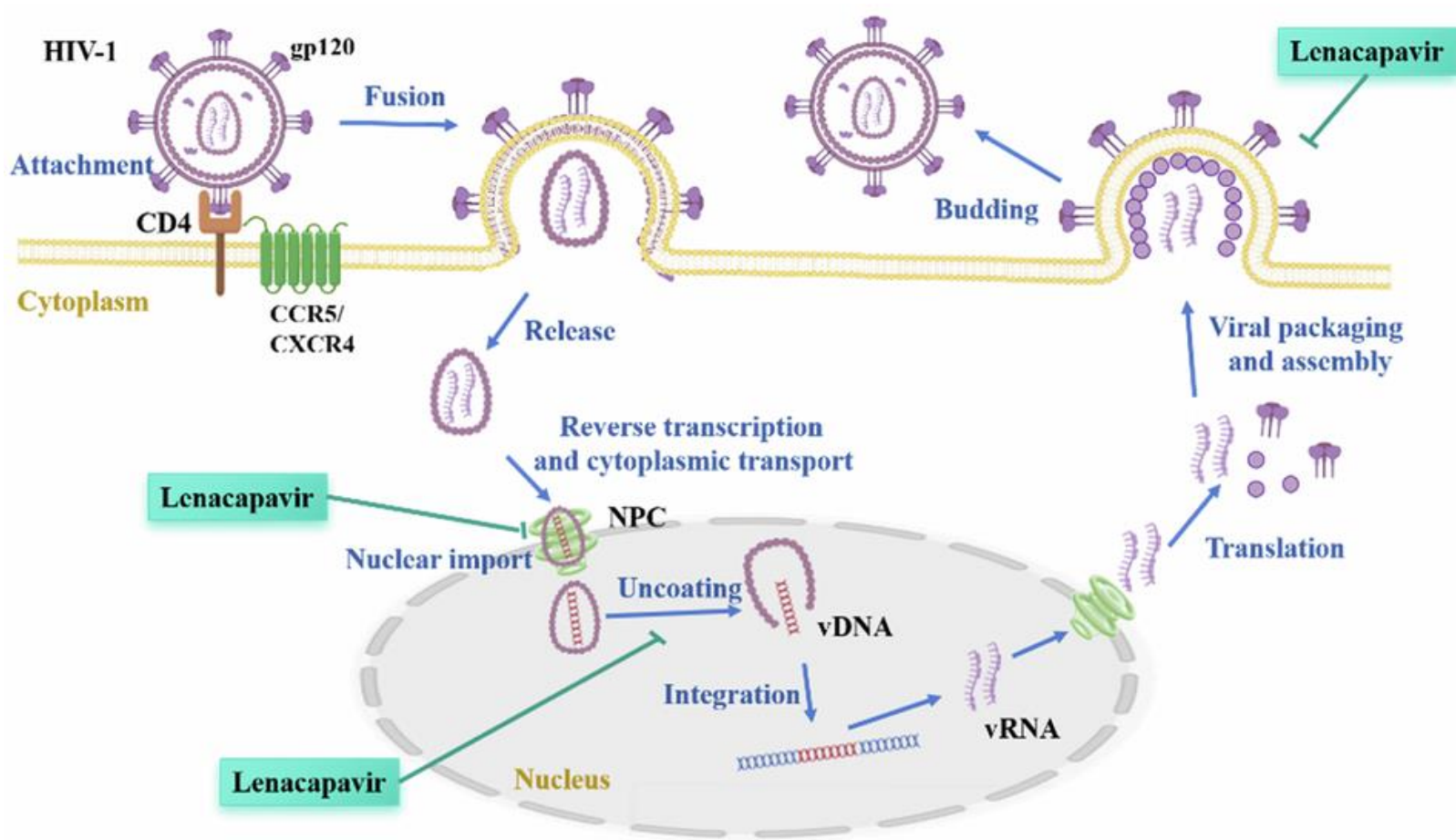
- Στοχεύει μια καλά συντηρημένη δομική πρωτεΐνη, αναστέλλοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών (PPI).
- Ενσωματώνει σταθερούς μεταβολικά δακτυλίους, πυραζόλιο και κυκλοπροπάνιο, επιτρέποντας την υποδόρια ή από το στόμα χορήγηση του κάθε 6 μήνες (σκευάσματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης).
- Αποτελεί το εγκεκριμένο φάρμακο με τα περισσότερα φθόρια (10), με εξαιρετικό θεραπευτικό εύρος.



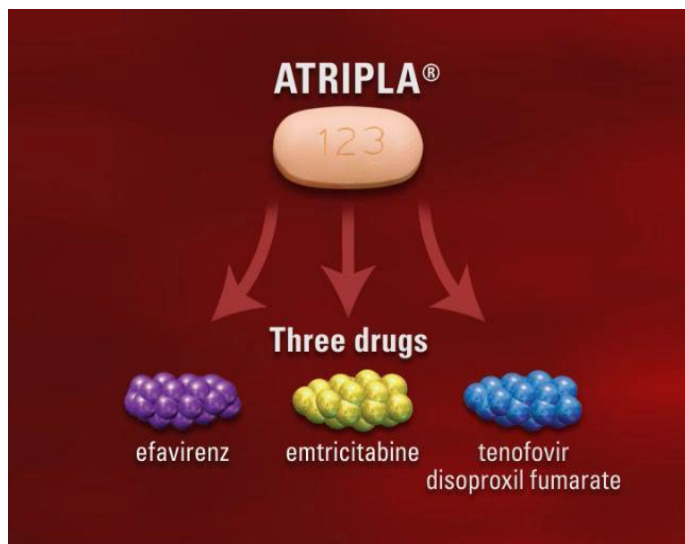
Η μεταβολική σταθερότητα αποτελεί πλεονέκτημα, κυρίως επειδή λαμβάνεται από ασθενείς που πιθανότατα λαμβάνουν κ.α. φάρμακα (ηπατικά ένζυμα/ αλληλεπιδράσεις).

Με MB 948 και πολύ υψηλή λιποφιλία, **παραβιάζει εμφανώς τον κανόνα 5 του Lipinsky** (MB <500, <5 δότες δH, <10 δέκτες δH, log P <5, λιγότεροι από 10 περιστρέψιμοι δεσμοί).

Ενσωματώνοντας σε πολλά σημεία **δομική πρωτοτυπία** χρησιμοποιείται ήδη ως πρότυπο κυρίως για τον σχεδιασμό αναστολέων του PPI.



Η πρόσδεση του HIV-1 στον υποδοχέα αρχίζει τη διαδικασία της σύντηξης και της εισόδου του ιού στο κύτταρο. Ακολουθεί η απελευθέρωση του ιού στο κυτταρόπλασμα και η εισβολή στον πυρήνα για τον πολλαπλασιασμό του με τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης. Η κάψα διευκολύνει την είσοδο στον πυρήνα και παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία σχηματισμού και απελευθέρωσης των νέων ιικών σωματίων. **To Lenacapavir στοχεύει πολλά βήματα του κύκλου ζωής του HIV-1.**



Η επιτυχής εφαρμογή της αντιρετροϊκής θεραπείας (antiretroviral therapy, ART) που **στοχεύει** στην **αναστολή του ιικού πολλαπλασιασμού, ανέδειξε τη χρησιμότητα της συνδυαστικής χημειοθεραπείας.**

Όμως, καθώς η ART δεν επιδρά στις εγκατεστημένες αποθήκες του ιού εντός των κυττάρων, είναι **αποτελεσματική μόνο όταν λαμβάνεται δια βίου**. Δεν θεραπεύει οριστικά, αλλά αναστέλλει την μετάδοση του ιού και προσφέρει στον ασθενή μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής.

Στις ανεπτυγμένες χώρες η ασθένεια αντιμετωπίζεται ως χρόνια μόλυνση και η χορήγηση των συνδυαστικών φαρμάκων **μείωσε κατά 60% - 80% την εισαγωγή στα νοσοκομεία** και τους θανάτους.