

ΙΟΙ

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

Ονοματολογία

Picornaviruses

Rhabdoviruses

Herpes viruses, HIV

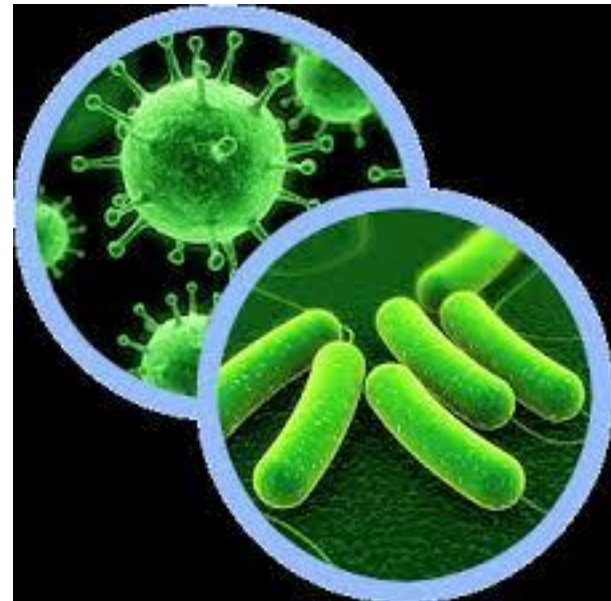
Coxsackie viruses

Αδενοϊοί

DNA / RNA ιοί

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

Viremia, recombination



Ιική μόλυνση. Τροπισμός. Ταχεία αναπαραγωγή (early phase, late phase, eclipse period, latent period). Μετάδοση: burst size, διακυτταρικά μέσω συγκυτίων.

Περιγραφή

Κάψα / καψομερή

Envelope (επιφανειακά αντιγόνα)

Γενετικό υλικό DNA ή RNA (μονόκλωνο, ή δίκλωνο)

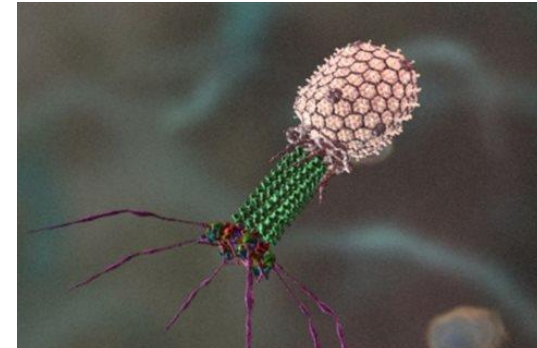
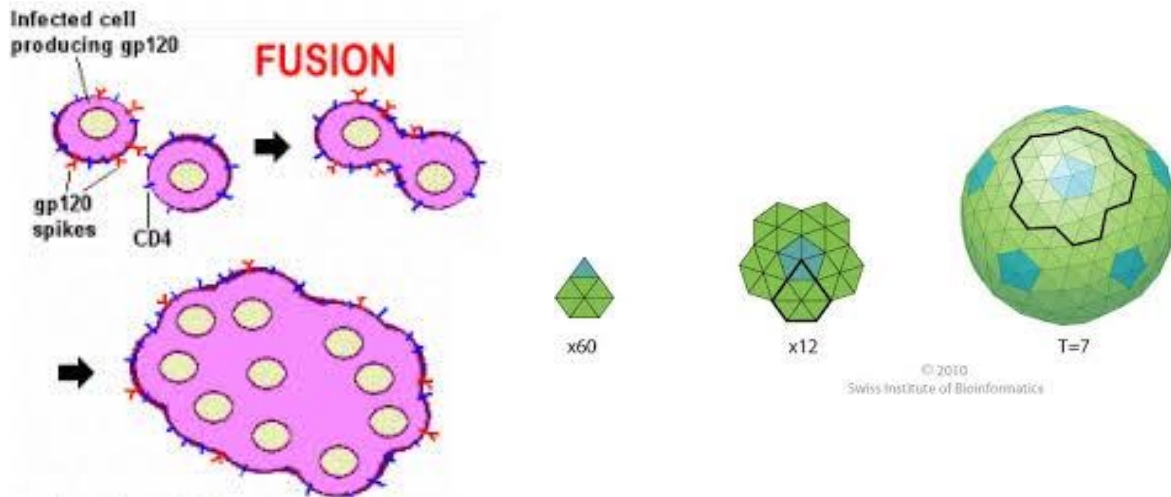
+RNA (sense RNA) → +mRNA

-RNA (antisense RNA) δεν είναι μολυσματικός παράγοντας (-RNA → +mRNA)

(+/-) RNA → +mRNA

+RNA retroviruses → -DNA → (+/-) DNA → +mRNA

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



Influenza, flu, grip, grippe

Ασυμπτωματική - θανατηφόρος λοίμωξη του αναπνευστικού (250-500000 θάνατοι/έτος, 36.000 θάνατοι στις ΗΠΑ) κυρίως από ευπαθείς ομάδες.

Μακροφάγα + Τ-λεμφοκύτταρα => επιπλοκές

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

Επιδημίες – Πανδημίες: [411 πΧ Ιπποκράτης, 430 πΧ Θουκυδίδης] Spanish flu (H1N1, 1918, 20 000 000 θάνατοι), Asian flu (H2N2, 1957), Hong Kong flu (H3N2, 1968), bird flu (H5N1, 2005, Tamiflu resistant!!!), swine flu (H1N1, 2009), H7N9 (bird flu, 2013).



Εμβολιασμός – πρόληψη νόσησης (60% επιτυχής)
Φαρμακευτική αγωγή

- **Συμπτωματική θεραπεία:** OTC medications, παρακεταμόλη, ασπιρίνη
- **Αντιγριπικά φάρμακα**



Ο ιός Influenza A παρουσιάζει υψηλή νοσηρότητα και συχνότητα μεταλλάξεων

Αντιγονικό drift: σταδιακές μεταλλάξεις- ετήσιες επιδημίες

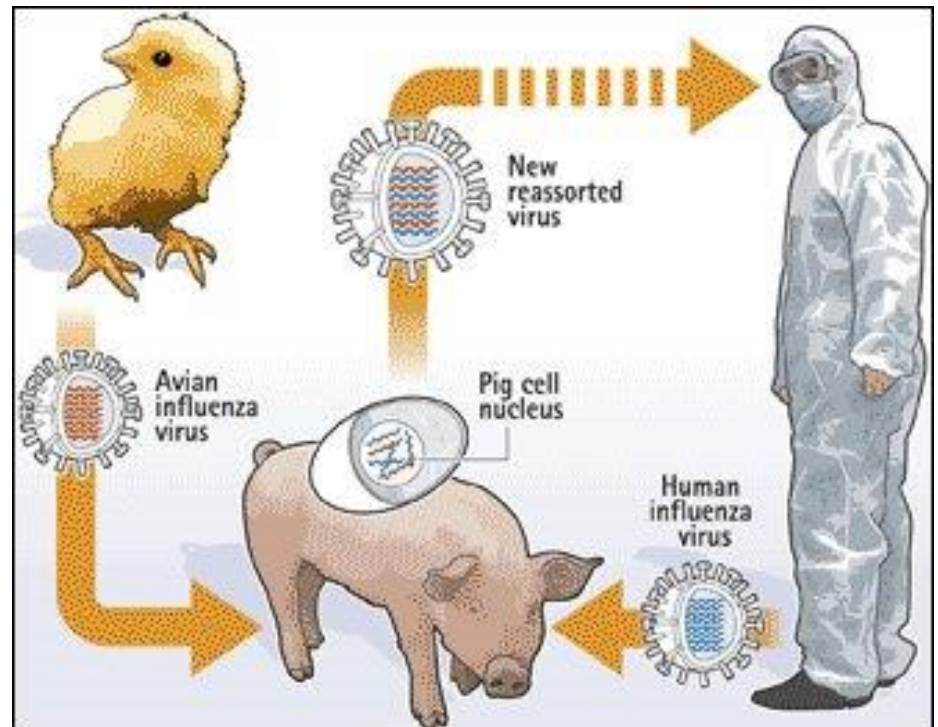
Αντιγονικό shift: υβριδικό γονίδιο HA και απουσία αντιγονικής μνήμης => πανδημίες.
Τα υδρόβια πουλιά λειτουργούν ως φυσικές αποθήκες του ιού **Influenza A** και περιοδικά μεταδίδουν τη λοίμωξη στα θηλαστικά.

Πολυδύναμο εμβόλιο (WHO): παρασκευάζεται κάθε χρόνο ως cocktail προσφάτως απομονωμένων παθογόνων στελεχών. Υποχρεωτικό για τις ομάδες υψηλού κινδύνου (έγκυες, ηλικιωμένοι, διαβητικοί, καρδιοπαθείς, ασθματικοί).

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

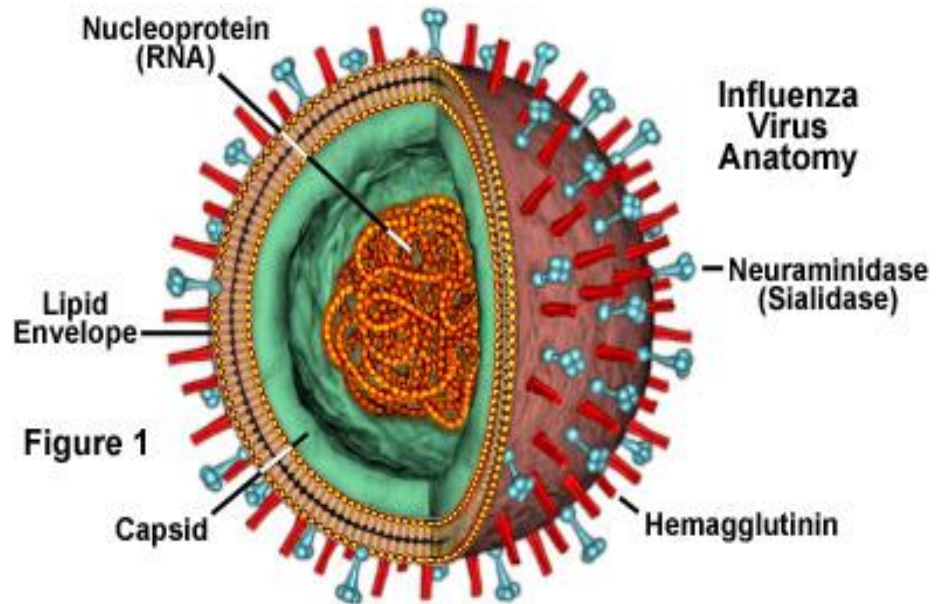
Ο ιός **Influenza C** είναι ελάχιστα παθογόνος, μόνο για παιδιά και ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.

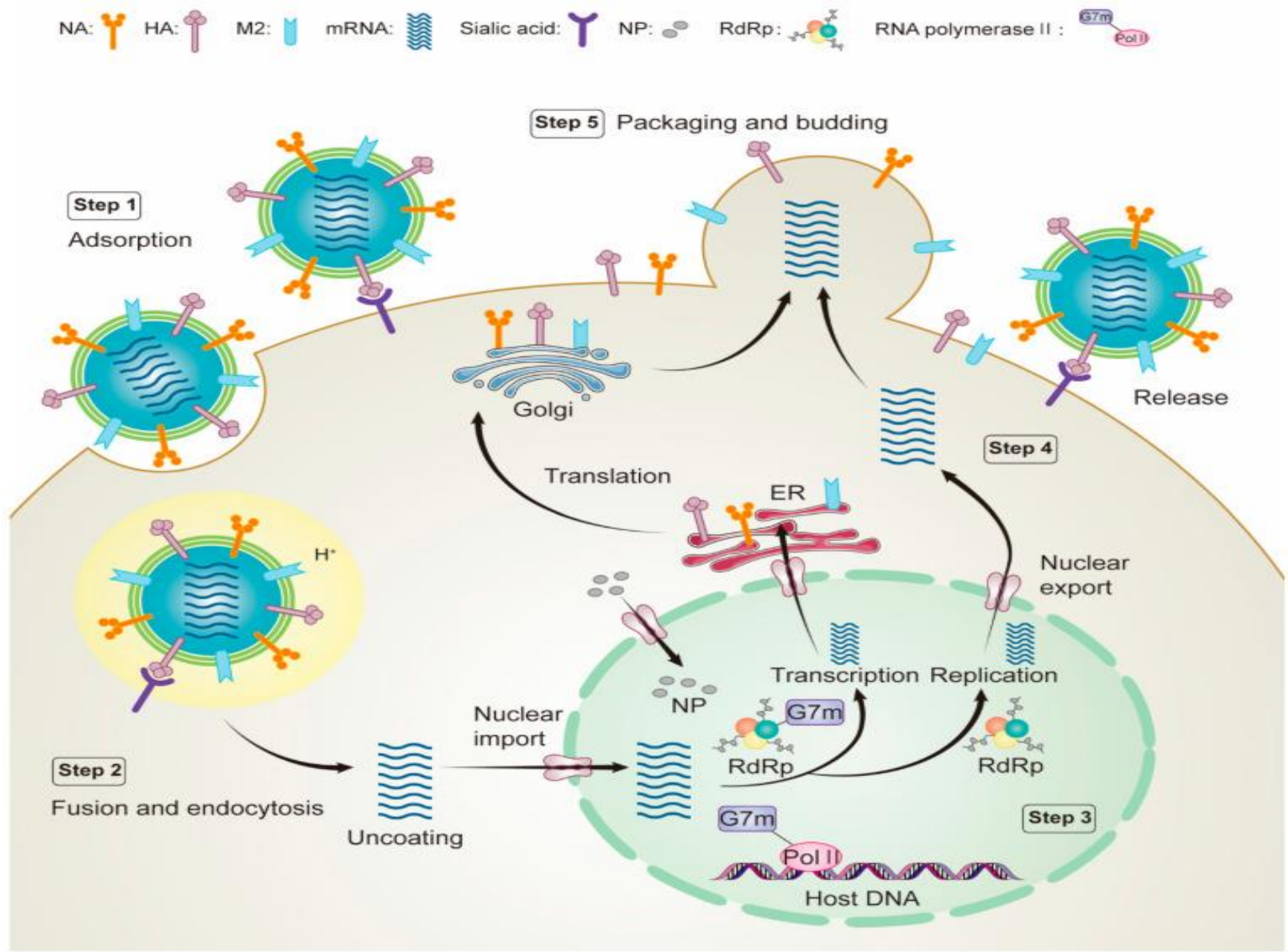
Ο ιός **Influenza D** δεν έχει μελετηθεί επαρκώς.



11 ικές πρωτεΐνες

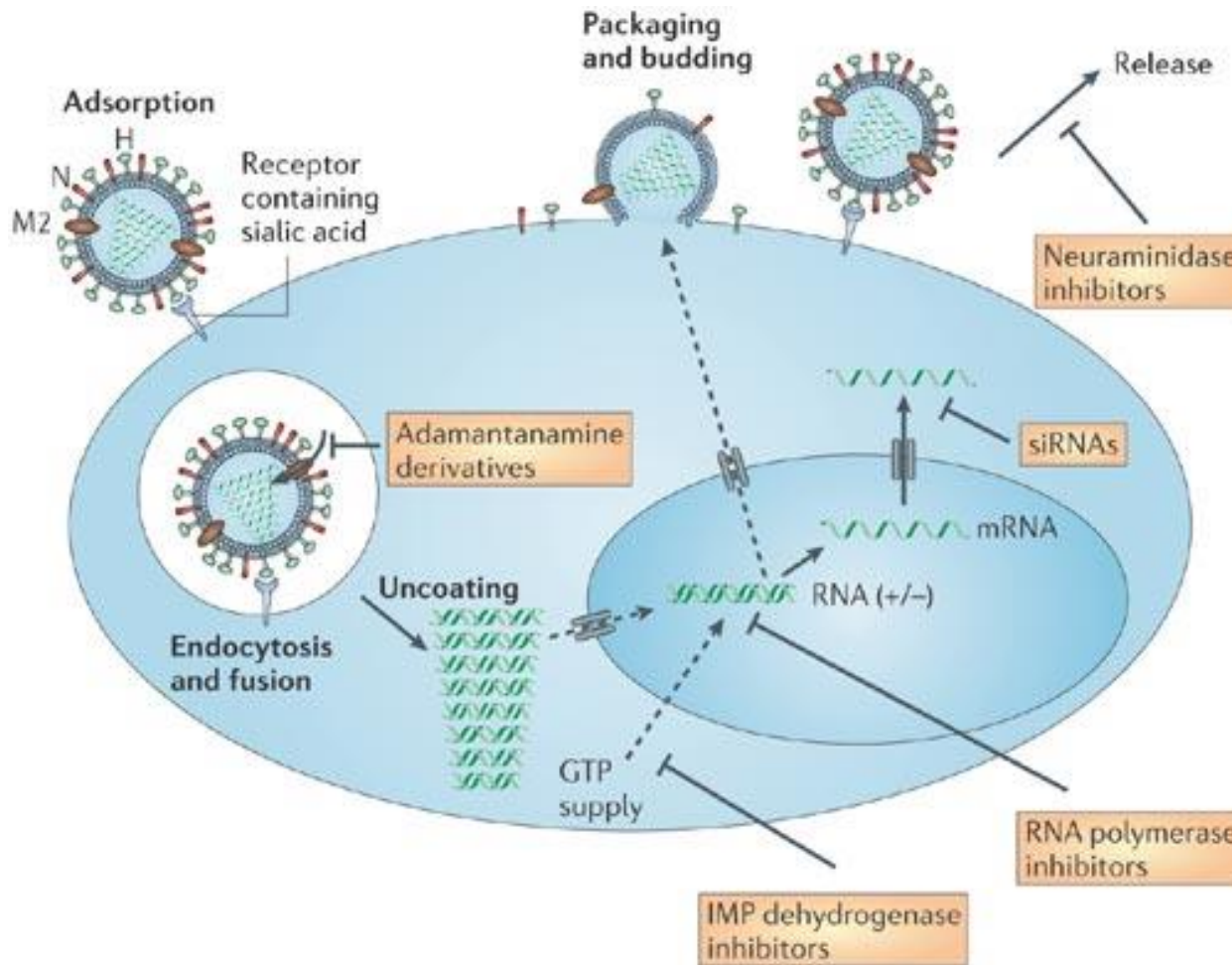
- **Αντιγόνα επιφανείας: Αιμαγλουτινίνη (HA), Νευραμινιδάση (NA)** – η **NA** ως σιαλιδάση επιτρέπει την κίνηση του ιού επί του βλεννογόνου. Προς το παρόν εντοπίστηκαν 18 υποτύποι **HA** και 11 υποτύποι **NA**.
- **Πρωτεΐνες μήτρας (Matrix proteins):** Η **M1** επικάθεται εσωτερικά του φακέλου και περικλείει την κάψα, ενώ η **M2** λειτουργεί ως ιοντικός διάυλος πρωτονίων και επάγει τον αποχωρισμό M1 / νουκλεοπρωτεϊνών.
- **Νουκλεοκαψίδιο (nucleocapsid):** περικλείει 8 (influenza A και B) ή 7 (influenza C) μονόκλινα ελικοειδή **-RNA** συμπλεκόμενα με τις νουκλεοπρωτεΐνες (**viral ribonucleoprotein particles, vRNPs**) → βιοσύνθεση 12 πολυπεπτιδίων (1-2/segment)
- **RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RdRp):** Ετερογενές σύμπλοκο που αποτελείται από 3 υπομονάδες: polymerase basic proteins 1 και 2 (**PB1, PB2**) και polymerase acidic protein (**PA**).





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 συμμετοχή του ξενιστή.



H2 inhibitors

Arbidol

M2 inhibitors

Amantadine

Rimantadine

Neuraminidase inhibitors

Zanamivir

Oseltamivir

Peramivir

Laniramivir octanoate

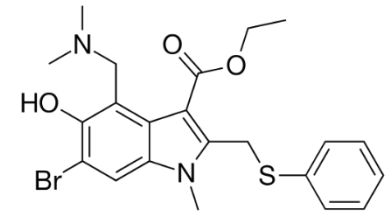
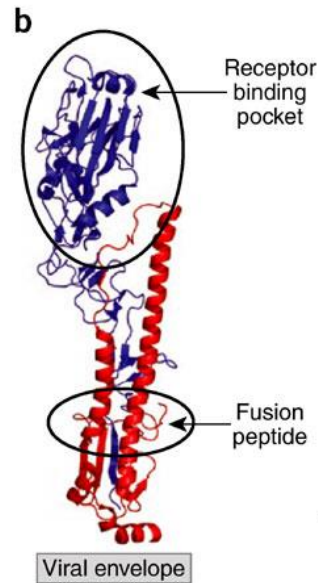
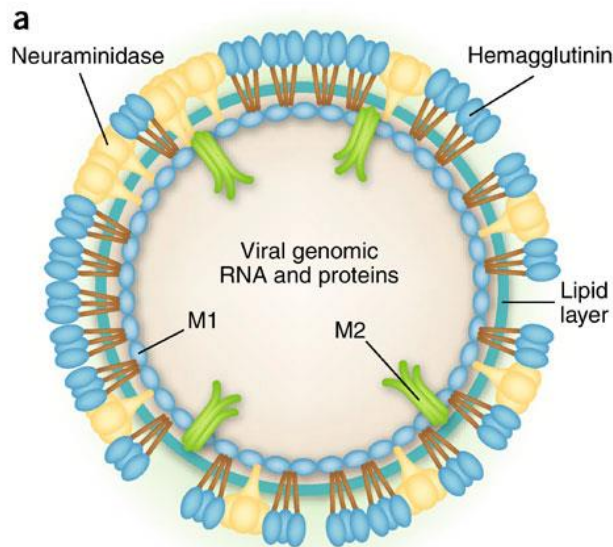
Polymerase inhibitors

Ribavirin

Favipiravir

Baloxavir marboxil

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΑΙΜΑΓΛΟΥΤΙΝΙΝΗΣ (HA)



HA1
S
/
S
HA2

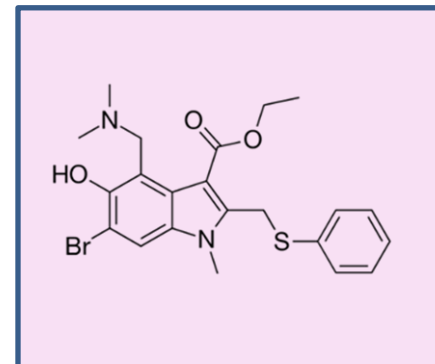
Arbidol
IC₅₀: 2-21μM

Με την πρόσδεση της **ομοτριμερούς πρωτεΐνης HA** σε **κυτταρικούς υποδοχείς** τελικούς σε σιαλικό οξύ αρχίζει η διαδικασία ενδοκύτωσης/απέκδυσης του γενετικού υλικού του ιού, με συμμετοχή και της M2.

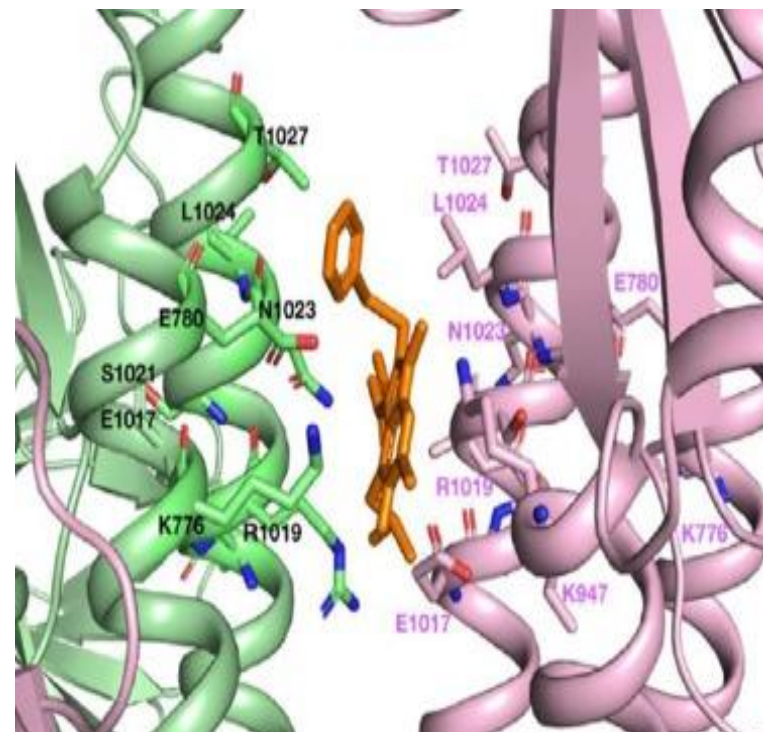
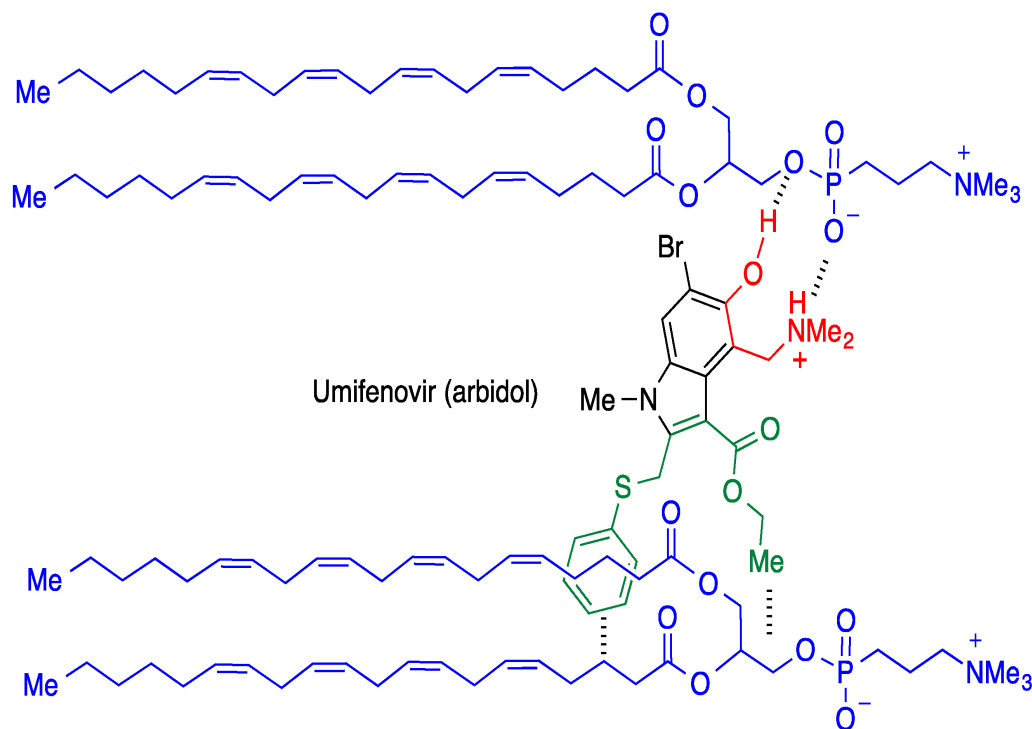
Λόγω του όξινου pH του ενδοσώματος μεταβάλλεται η διαμόρφωση της HA: η διάσπαση του δισουλφιδικού δεσμού **HA1-S-S-HA2** που ενώνει τα δύο τμήματα της είναι μη αντιστρεπτή αντίδραση και ακολουθείται από την αλληλεπίδραση του *N*-τελικού τμήματος HA2 με τις μεμβράνες του ενδοσώματος. **Το HA2 χαρακτηρίζεται ως πεπτίδιο ενσωμάτωσης (fusion peptide).**

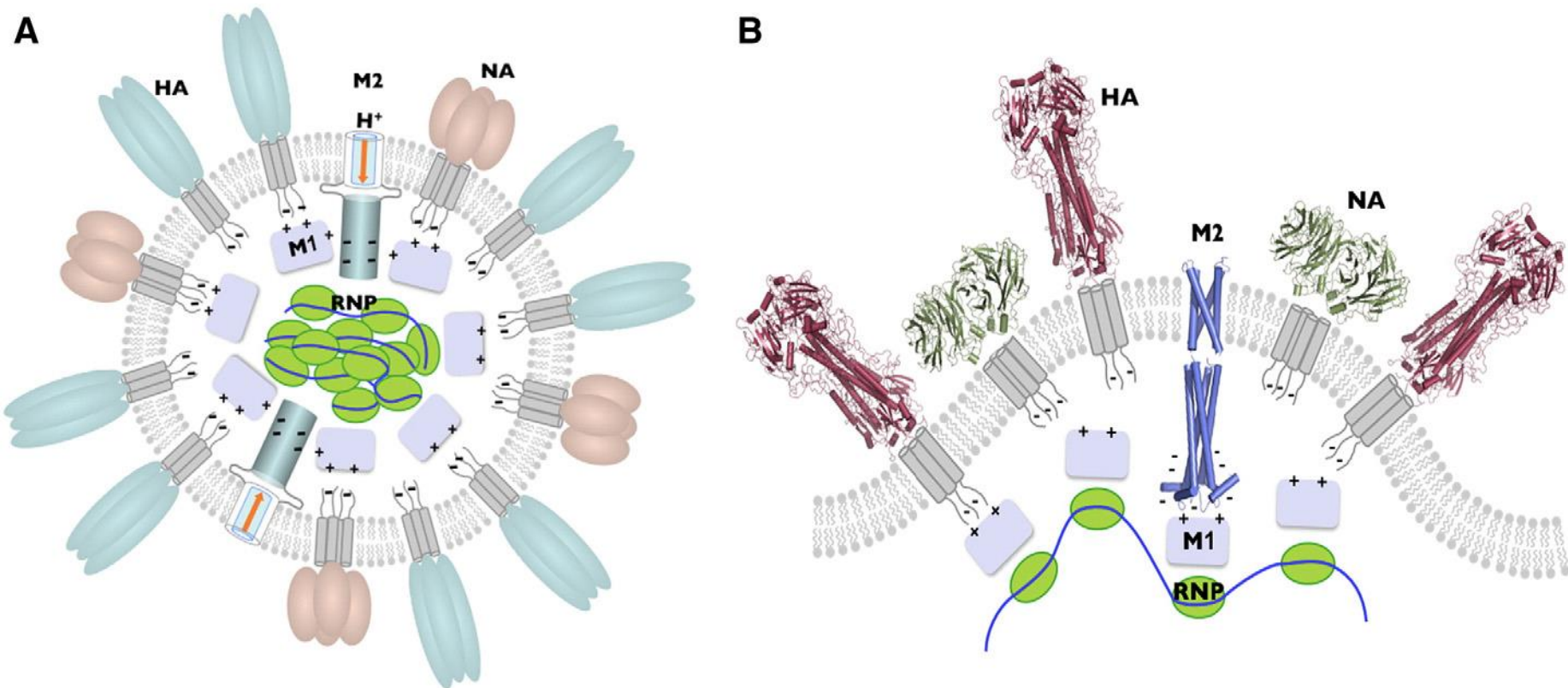
Το Arbidol (Umifenovir) συνδέεται στην μεσεπιφάνεια HA1-HA2 και ενισχύει την πρόσδεση της HA στους κυτταρικούς υποδοχείς, αυξάνοντας την σταθερότητα της HA στο όξινο περιβάλλον.

Η διμεθυλαμινοομάδα του **Arbidol** σχηματίζει δεσμό τύπου άλατος με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ το υπόλοιπο μόριο αναπτύσσει αλληλεπιδράσεις με αμινοξέα (κυρίως υπόλοιπα τρυπτοφάνης) μεμβρανικών πρωτεϊνών, ενισχύοντας σημαντικά την αλληλεπίδραση της HA με την κυτταρική μεμβράνη. Κατά συνέπεια, αναστέλλονται οι διαμορφωτικές αλλαγές της HA, που είναι αναγκαίες για την απέκδυση του γενετικού υλικού του ιού.



Το **Arbidol (Umifenovir)** είναι δραστικό έναντι ιών influenza A και B καθώς και έναντι άλλων RNA ιών, όπως ο HCV και ο SARS-CoV-2. **Κυκλοφορεί για τη θεραπείαλώσεων του αναπνευστικού σε Ρωσία και Κίνα.** Εμφάνιση αντοχής.

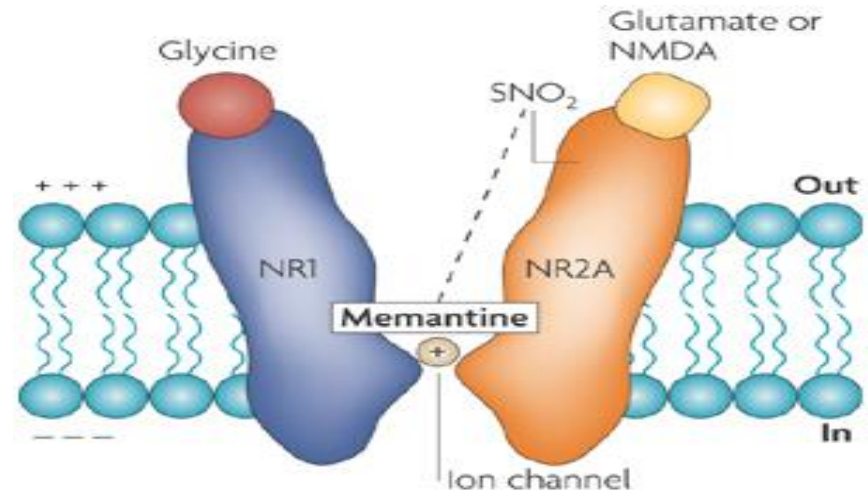
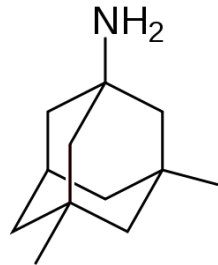
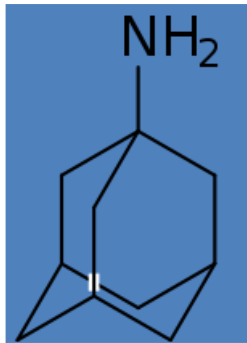




Αναστολείς της λειτουργίας της M2 – δραστικοί μόνο έναντι influenza A

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.

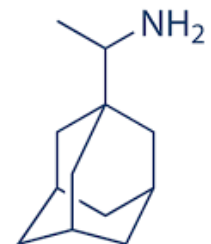
Οι M1 και M2 θα λάβουν αργότερα μέρος και στην **υκή ωρίμανση (maturation)** και τη διαδικασία σχηματισμού του νέου envelope (αποκάλυψη υδρόφοβου τμήματος της κυτταρικής μεμβράνης και απομάκρυνση των πρωτεϊνών του ξενιστή).

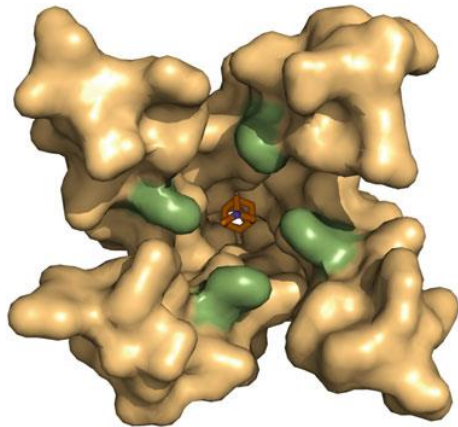


Αδαμανταναμίνες: Τα φάρμακα **Amantadine** και **Rimantadine** αναστέλλουν την αγωγιμότητα της M2 επειδή **σταθεροποιούν την κλειστή διαμόρφωση του διαύλου**.

To Amantadine (1-αδαμανταναμίνη): είναι καλά ανεκτό, αλλά μπορεί να εμφανίσει παρενέργειες από το ΚΝΣ (ζάλη, εφιάλτες, παραισθήσεις). Το δομικό του ανάλογο **memantine** χορηγείται στη νόσο Alzheimer's.

To Rimantadine [1-(1-αδαμαντυλο)αιθαναμίνη]: είναι καλύτερα ανεκτό, με λιγότερες παρενέργειες από το ΚΝΣ.



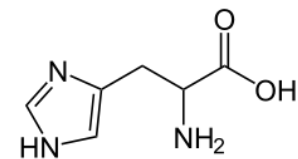


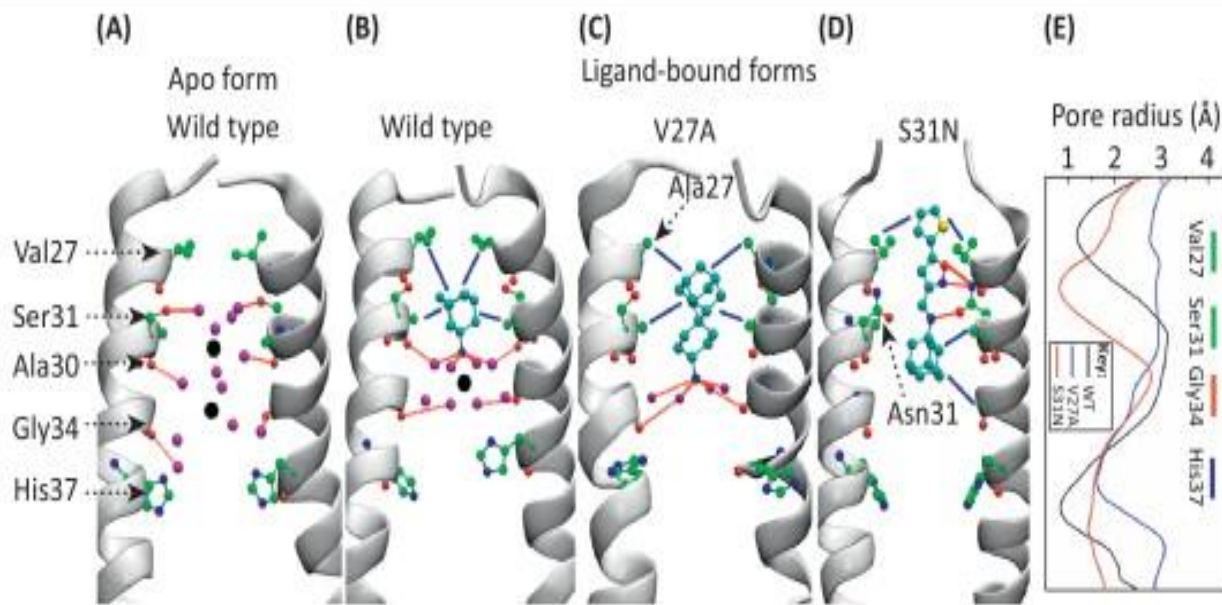
Η M2 είναι ομοτετραμερής διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Κάθε υπομονάδα της διαθέτει ένα καλά ελικωμένο αμινοτελικό άκρο (αμινοξέα 1-23), διαμεμβρανικό τμήμα (α. 24-46) και καρβοξυτελικό άκρο (α. 47-97), που αλληλεπιδρά με την M1. Οι αδαμανταναμίνες δεσμεύονται στη διαμεμβρανική περιοχή.

- Το **Amantadine** (IC_{50} 16 μ M) αλληλεπιδρά κυρίως στο τμήμα μεταξύ **Val27 - His37**
- Το **Rimantadine** (IC_{50} 11 μ M) δεσμεύεται σε μια διαφορετική, «αλλοστερική» θέση (ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με Asp44 και λιπόφιλες με Leu40, Ileu41, Leu43)

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”.

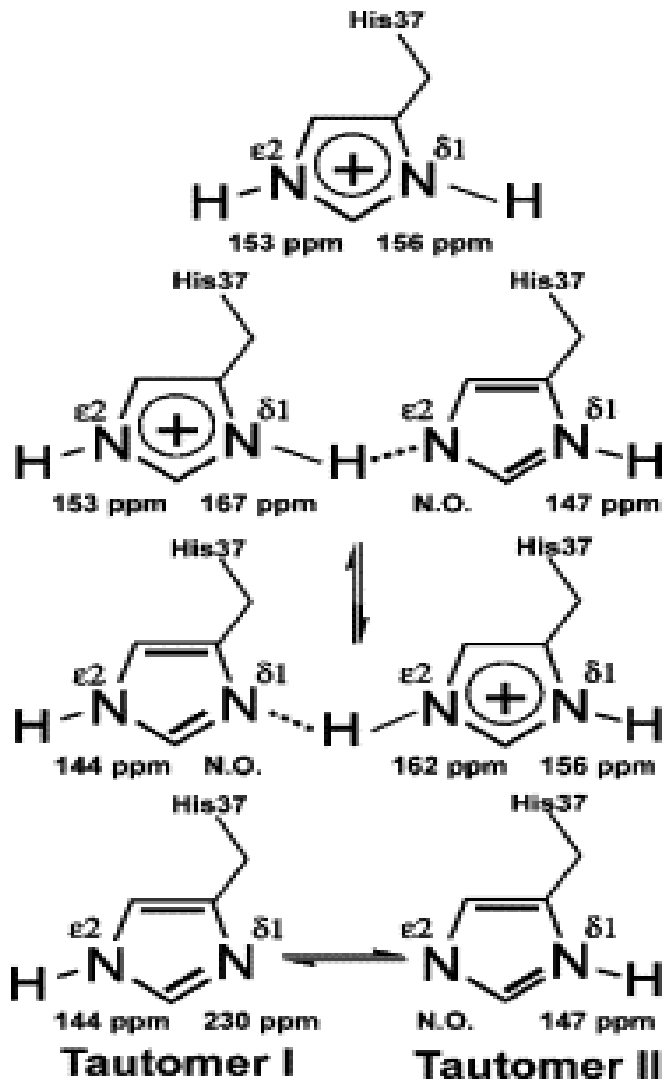




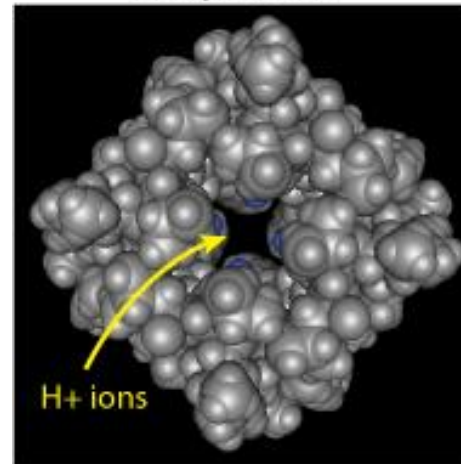
Απουσία φαρμάκου: ο διάυλος πάνω από την **His37** είναι «σταθερός» επειδή περιτοιχίζεται από καλά σχηματισμένες έλικες και καταλαμβάνεται από μόρια H₂O.

Παρουσία φαρμάκου: η φορτισμένη NH₃⁺ του **Amantadine** αναπτύσσει ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ενώ το **ογκώδες λιπόφιλο αδαμαντάνιο** αναπτύσσει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, κυρίως με την Val27 και συνδεόμενο «φράσσει τον διάυλο».

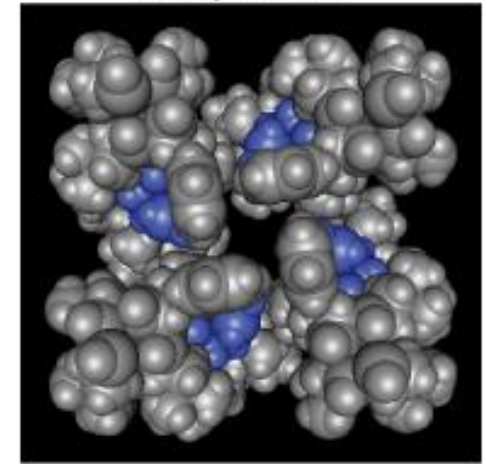
Παρουσία του **Amantadine** εμποδίζεται ο σχηματισμός διμερών His - HisH⁺ και αναστέλλεται η αγωγιμότητα του διαλύου



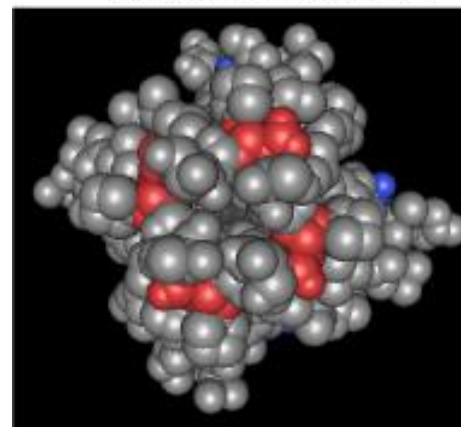
M2 open, front



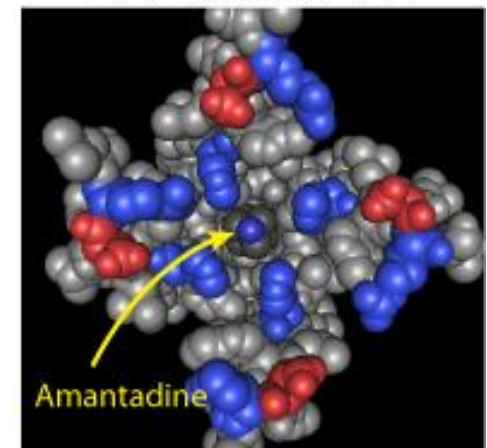
M2 open, back

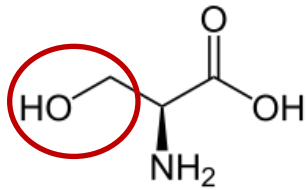


M2 + amantadine, front

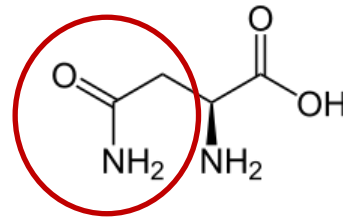


M2 + amantadine, back





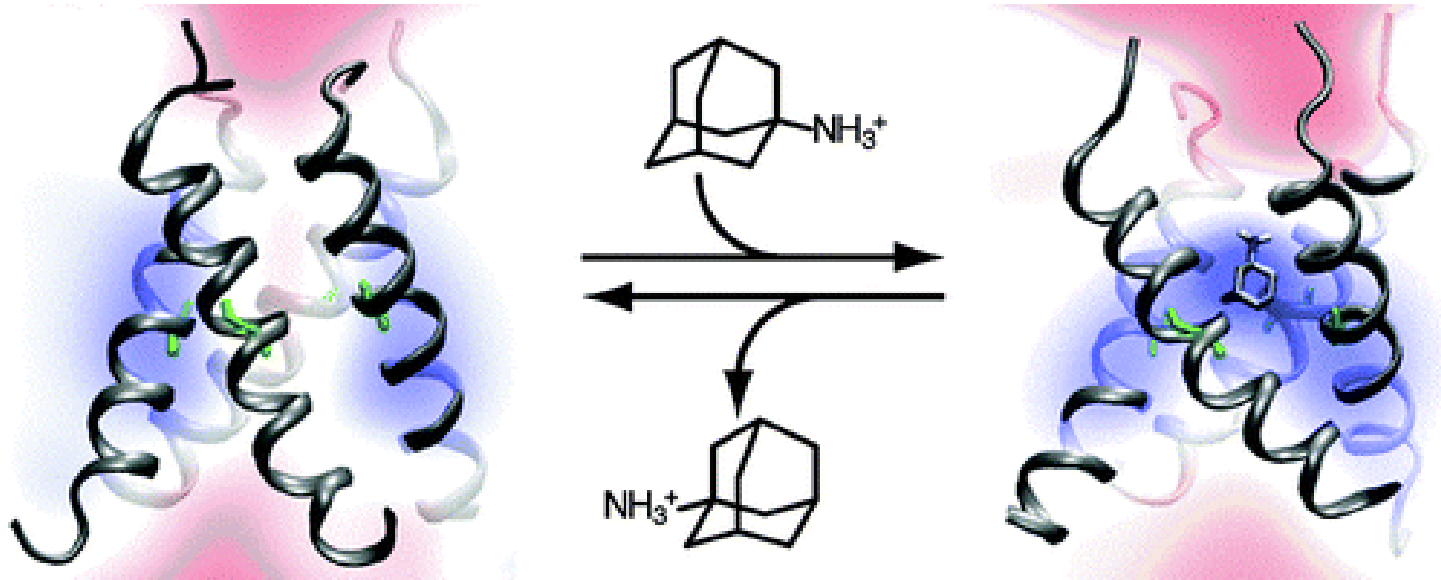
Serine, S



Asparagine, N

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

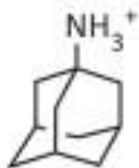
Το 95% των μεταλλαγμένων στελεχών είναι **S31N**: Ο ογκώδης υποκαταστάτης της Asp εμποδίζει την ανάπτυξη των χαρακτηριστικών υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ αδαμαντανίου και της Val27.



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

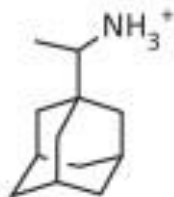
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ: διατήρηση της αγωγιμότητας του διαύλου και της λειτουργικότητας του ενζύμου, παρουσία του φαρμάκου = ανεπαρκής αναστολή της λειτουργίας του διαύλου.

(A)



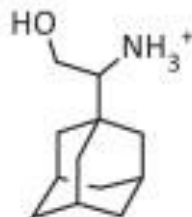
Amantadine [9]

(B)



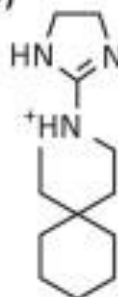
Rimantadine [9]

(C)



Compound A4 [64]

(D)



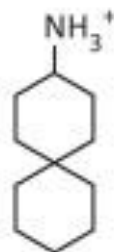
BL-1743 [67]

(E)



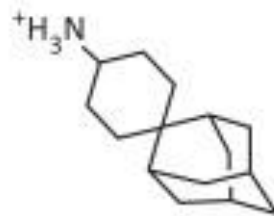
3-azaspiro[5.5]undecane [53]

(F)



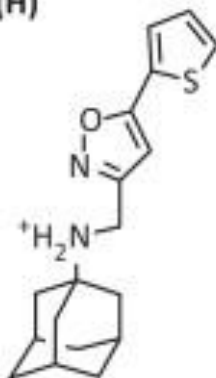
Spiro[5.5]undecan-3-amine [52]

(G)



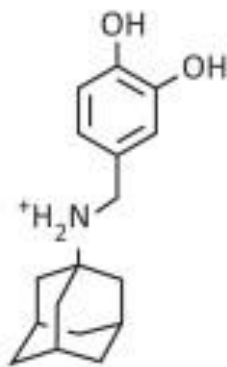
Compound 9 [58]

(H)



M2WJ332 [41]

(I)



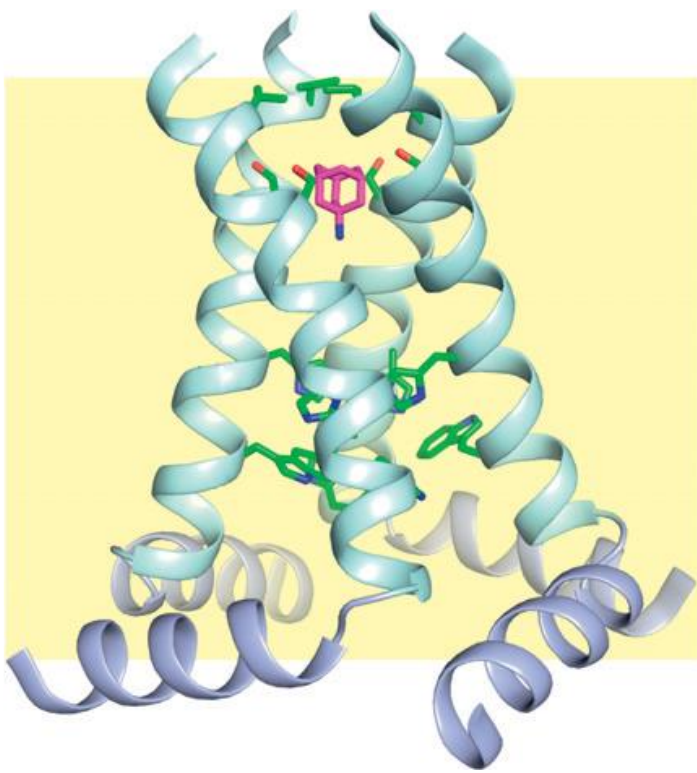
Compound 44 [68]

Drug design

Ο διάυλος είναι «ευκίνητος» και αντέχει την αύξηση του μεγέθους των αναστολέων, που εκτοπίζουν περισσότερα μόρια H₂O

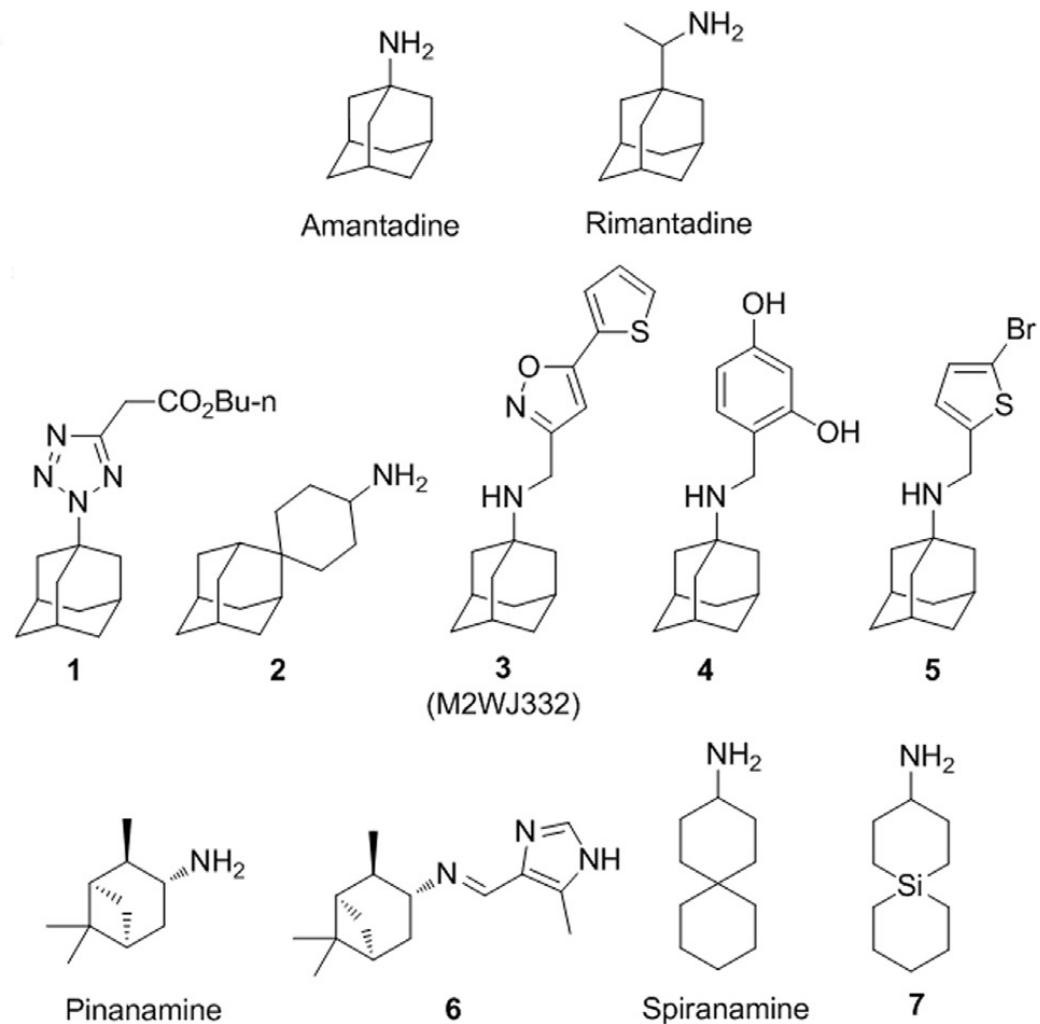
Το λιπόφιλο τμήμα πρέπει να παραμείνει αλικυκλικό, ενώ η αύξηση του μεγέθους του διατηρεί τη δραστηριότητα στα μεταλλαγμένα στελέχη

Η εισαγωγή (ετερο) αρωματικού υποκαταστάτη στην αμινομάδα ενισχύει τη δραστηριότητα: τα ετεροάτομα και το «βενζυλικό» μεθυλένιο αλληλεπιδρούν με αμινοξέα του διαύλου.



- 1: δραστικό στα μεταλλαγμένα **S31N**
- 2: δραστικό στα μεταλλαγμένα L26F και V27A
- 3: δραστικότερο στα μεταλλαγμένα στελέχη - αναστέλλει τα **S31N**

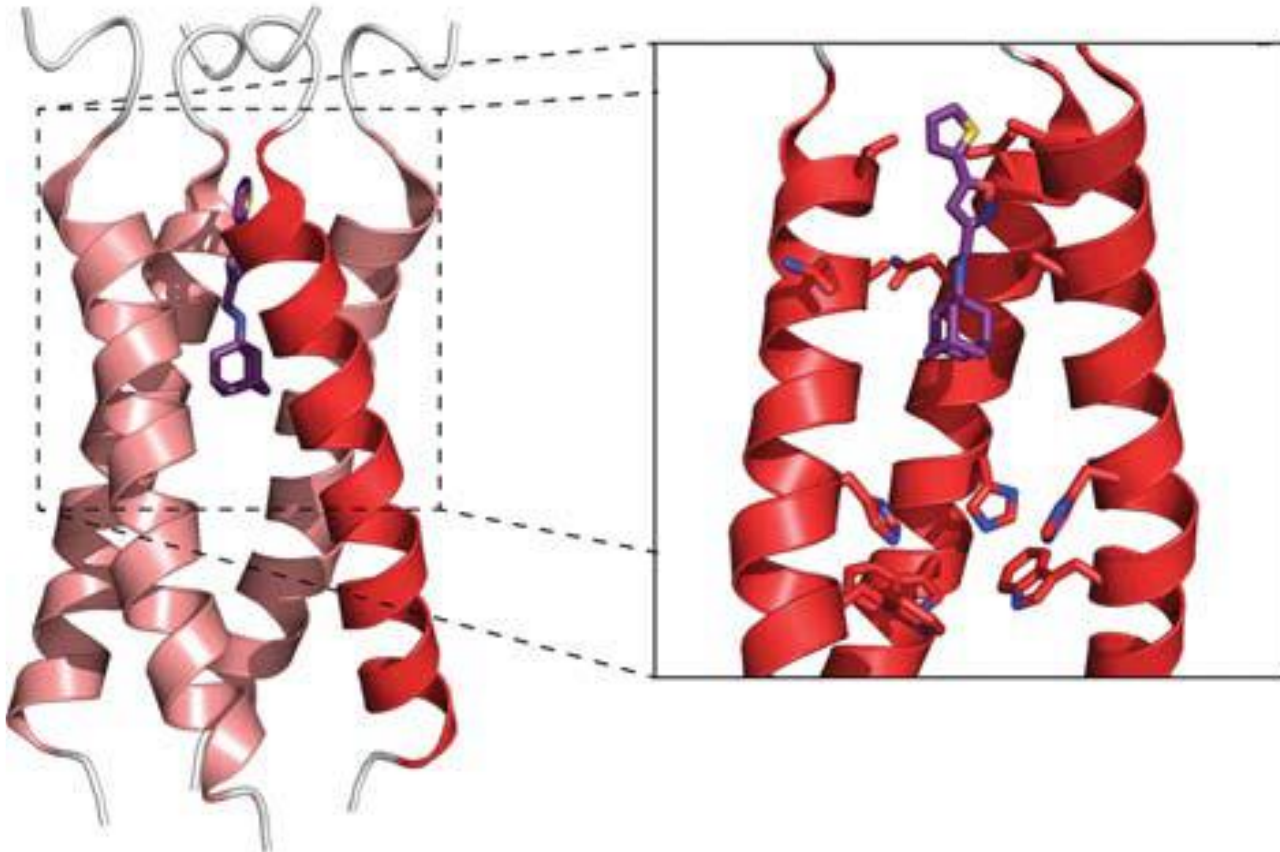
5: διαφορετικός τρόπος σύνδεσης (flip-flop binding mode) επιτρέπει την αναστολή μεταλλαγμένων και άγριων στελεχών (wild type).



Παραδείγματα δραστικών παραγώγων 2^{ης} γενιάς

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

Υπάρχει ενδιαφέρον για αξιοποίηση της πληροφορίας ότι αυτή η θέση σύνδεσης περιστοιχίζεται από τις 4 «αλλοστερικές θέσεις» που μπορούν να υποδεχτούν προσδέματα ακόμη μεγαλύτερα της ριμανταδίνης.



V27

N31

H37

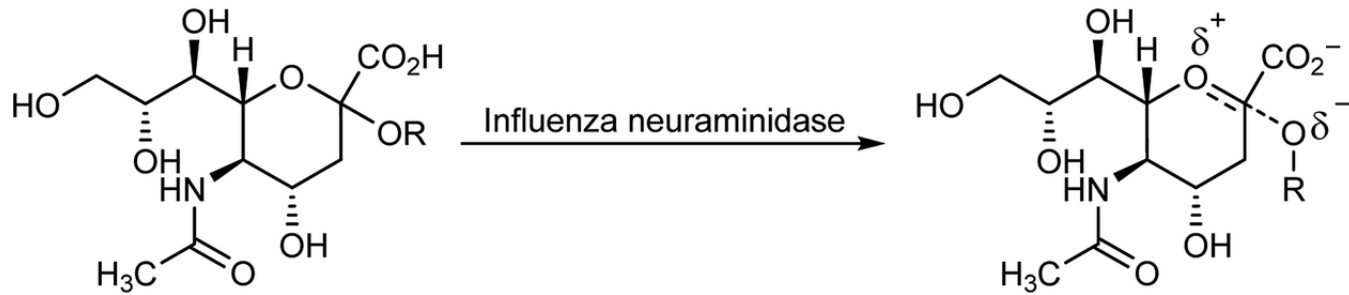
W47

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΝΕΥΡΑΜΙΝΙΔΑΣΗΣ (ΝΑ)

Η τετραμερής γλυκοπρωτεΐνη νευραμινιδάση δρα ως σιαλιδάση:

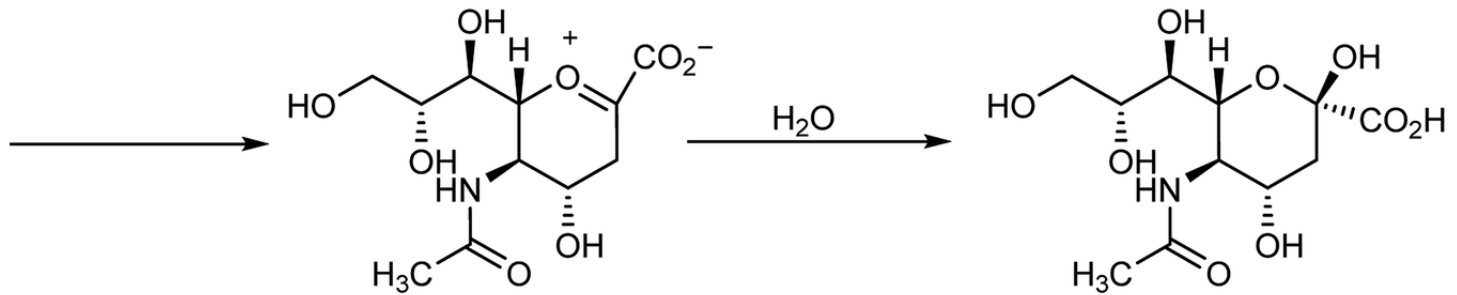
- **βοηθά στην απελευθέρωση των νέων ιϊκών σωματίων**, που εξερχόμενα του κυττάρου δεσμεύονται επί των ειδικών κυτταρικών υποδοχέων HA: διασπά το τελικό N-ακετυλονευραμιδικό οξύ της γλυκοπρωτεΐνης του υποδοχέα
- **αναστέλλει τη δέσμευση των νέων ιϊκών σωματίων** σε διάφορες κυτταρικές επιφανειακές γλυκοπρωτεΐνες, που αν και δεν είναι υποδοχείς HA, 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

ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΝΕΥΡΑΜΙΝΙΔΑΣΗΣ (NA): το ένζυμο λειτουργεί ως σιαλιδάση



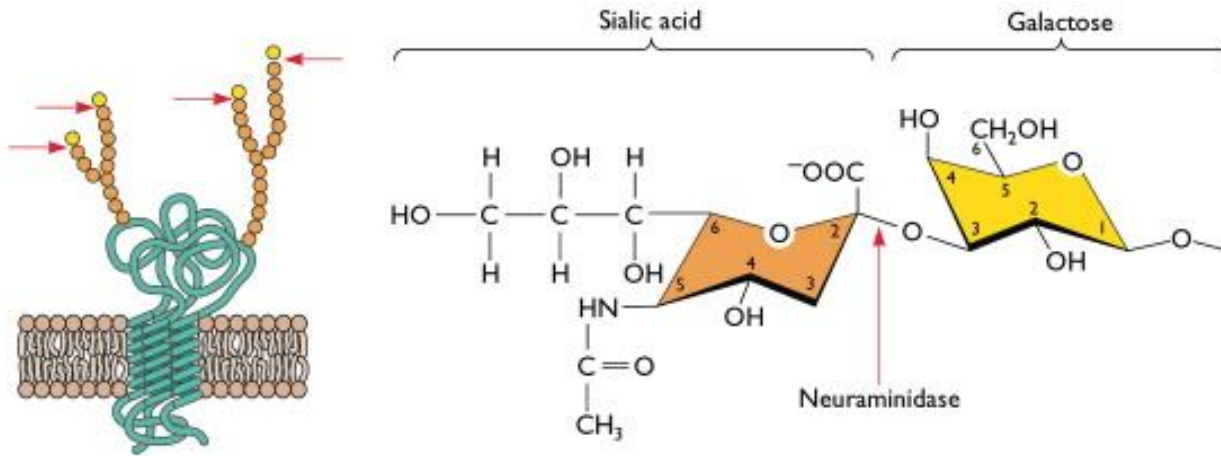
Sialyl α -glycoside
R= Glycoprotein

[Transition State]



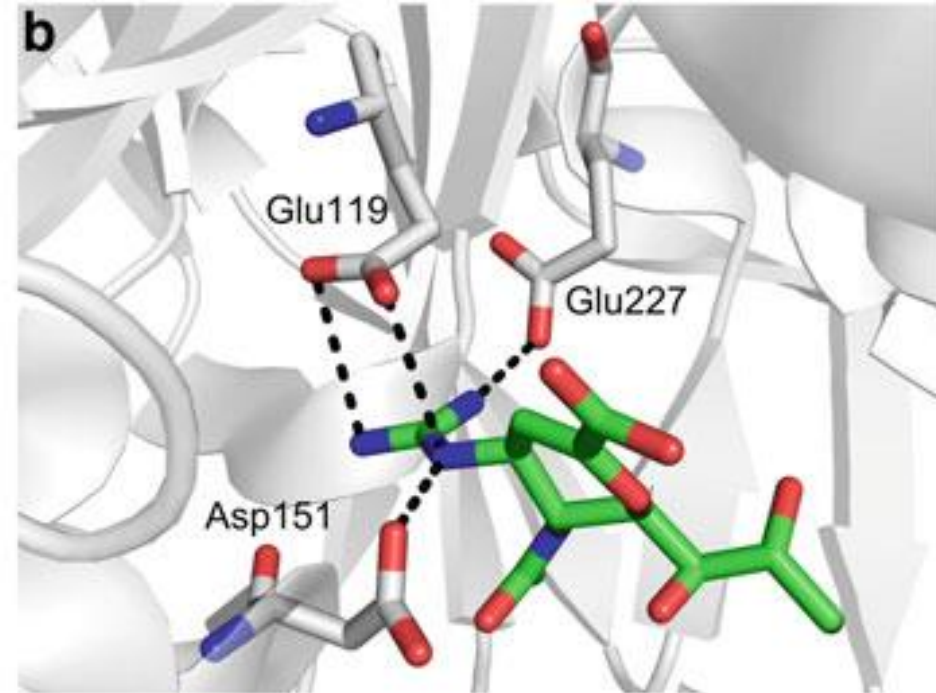
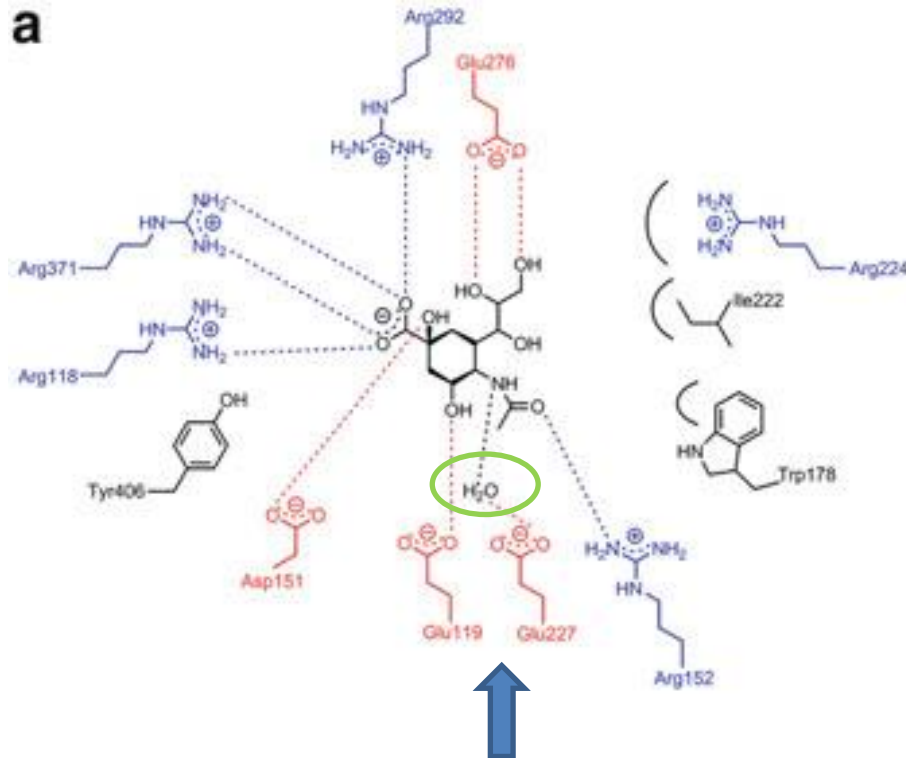
Oxonium Intermediate

Sialic Acid

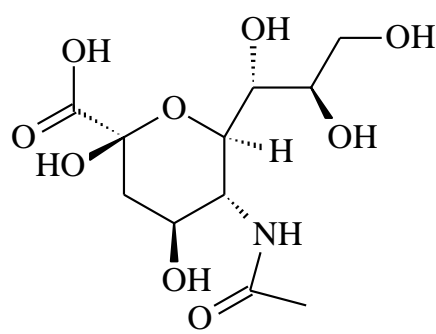


Το σιαλικό οξύ είναι μονοσακχαρίτης με καρβοξύλιο στην 1-θέση → σύνδεση με τρεις **Arg (118, 292 και 371)** της NA.

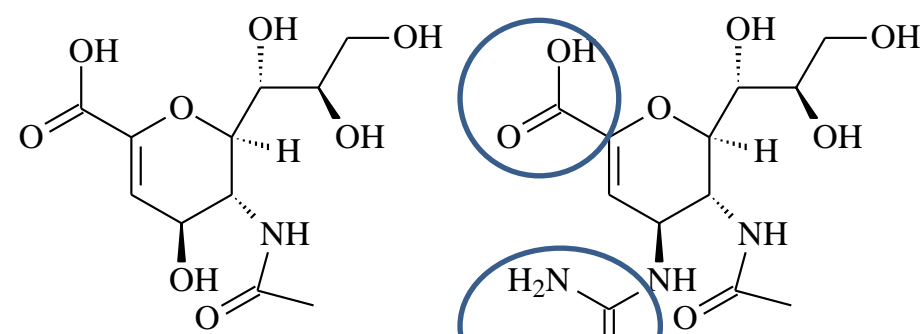
transition state-based inhibitors



Παράγωγα πυρανόζης: zanamivir

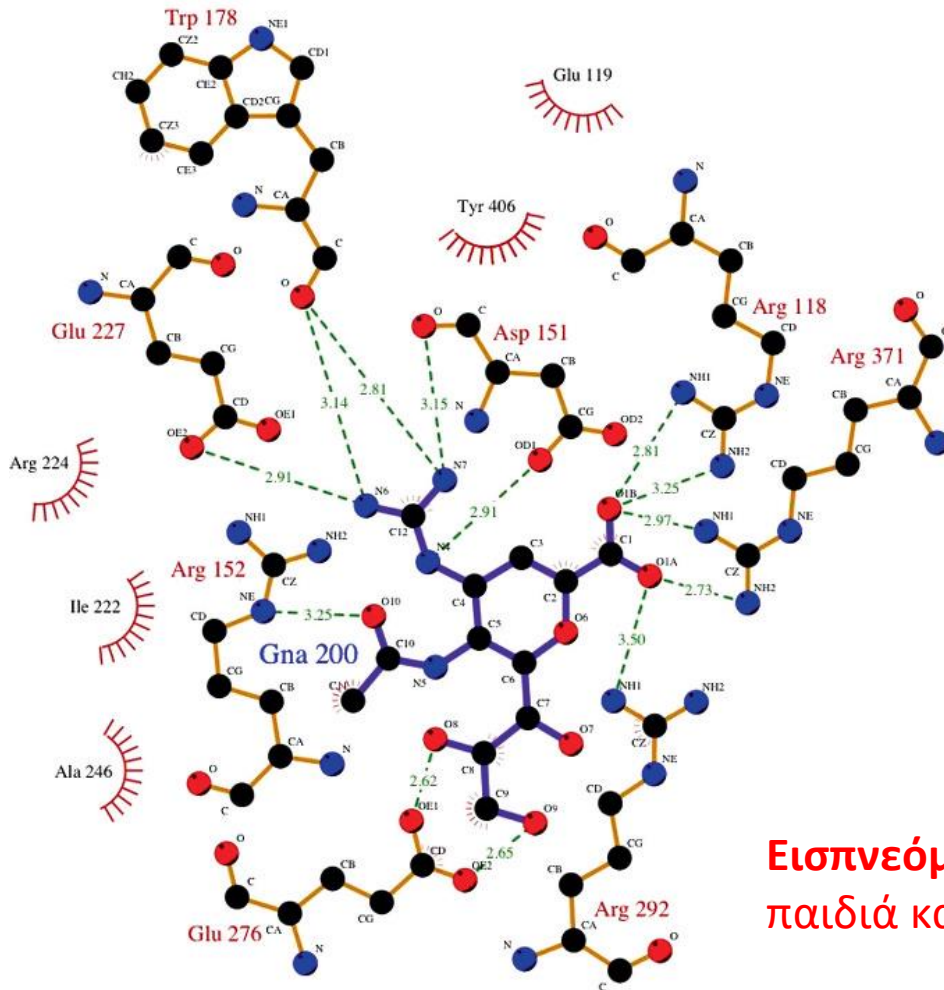


Sialic acid



Neu5Ac2en

Zanamivir



Το 2,3-διϋδρο-2-δεοξυ-*N*-ακετυλονευραμιδικό οξύ, ο πρώτος ισχυρός αναστολέας της ΝΑ ασκεί αντιϊική δράση *in vitro*, αλλά είναι αδρανής *in vivo*.

Το 4-ΟΗ αποτελεί σημαντική θέση γλυκουρονίωσης: αντικαταστάθηκε από γουανιδινομάδα (Zanamivir) που αλληλεπιδρά ισχυρά με **3 όξινα αμινοξέα** (Glu119, Asp151, Glu227) και με πεπτιδικά καρβοξύλια (Asp151 και Trp178) + εντροπικό κέρδος από την εκτόπιση 1 μορίου νερού + εκλεκτικότητα έναντι ανθρώπινων γλυκοϋδρολασών.

Τα 8-ΟΗ και 9-ΟΗ στην αλυσίδα τύπου γλυκερόλης αναπτύσσουν δ.Η με το Glu276.

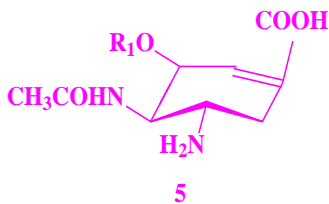
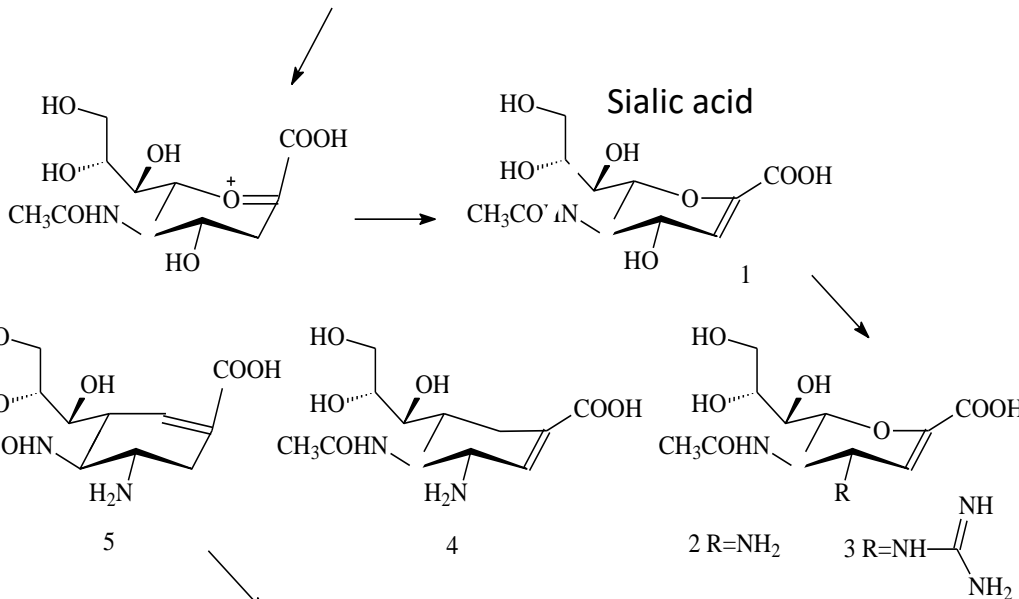
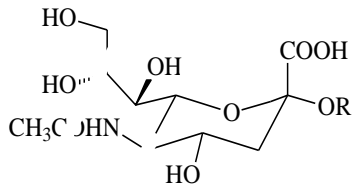
Εισπνεόμενη φ/τ μορφή: προβληματική χορήγηση σε παιδιά και ηλικιωμένους. **Ενέσιμο.**

Παράγωγα κυκλοεξενίου: Oseltamivir per os

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

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

5: Oseltamivir καρβοκυκλικό ανάλογο βιοδιαθέσιμο από το στόμα



Clinical candidate

Ενώ το πυρανικό O δεν φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο, η ανάπτυξη δεσμού άλατος του καρβοξυλίου με 3 Arg ευνοεί τη λήψη διαμόρφωσης ψευδο-boat.

R1=αλκύλιο → Μπορεί να αντικατασταθεί η υδρόφιλη γλυκερόλη από αλκυλαιθέρα? Παρουσία O + εξισορρόπηση λιποφιλίας, δυνατότητα SAR: αλλαγή μήκους + όγκου (διακλάδωση) του υποκαταστάτη.

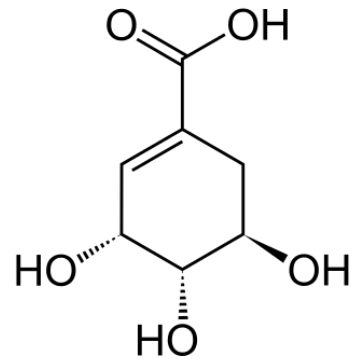
Για R1= -CH(CH₂CH₃)₂ → παράγωγο με IC₅₀ 6.3 μM (1000 φορές δραστικότερο του amantadine έναντι influenza A).

A + B δραστικό. Θεραπευτικό εύρος 10 000.

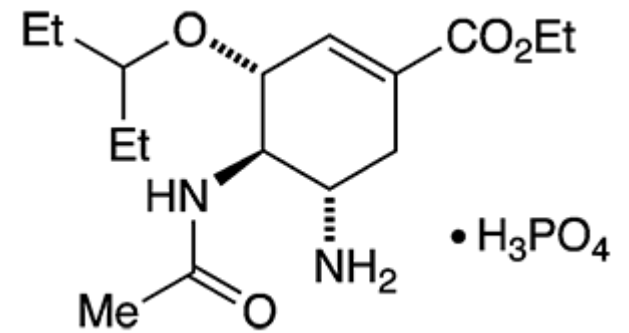
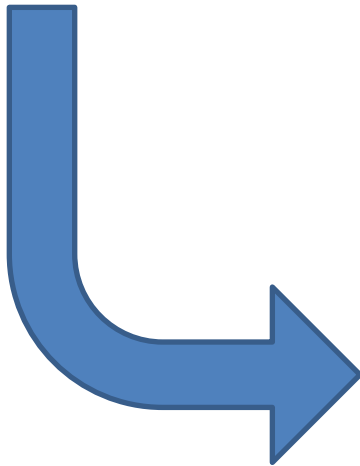
Ο αιθυλεστέρας του Oseltamivir χορηγείται ως προφάρμακο:

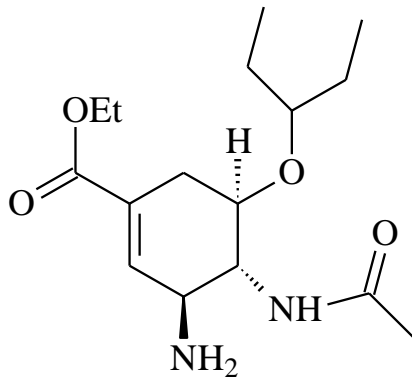
Τα Zanamivir και Oseltamivir αποδείχθηκαν ιδιαίτερα αποτελεσματικά:

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

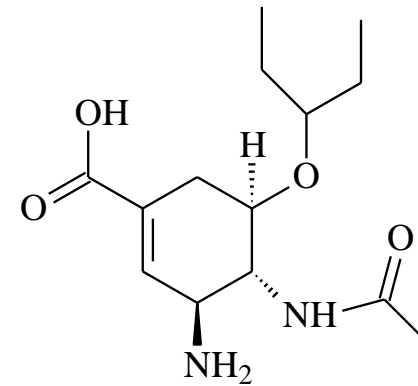


Shikimic acid

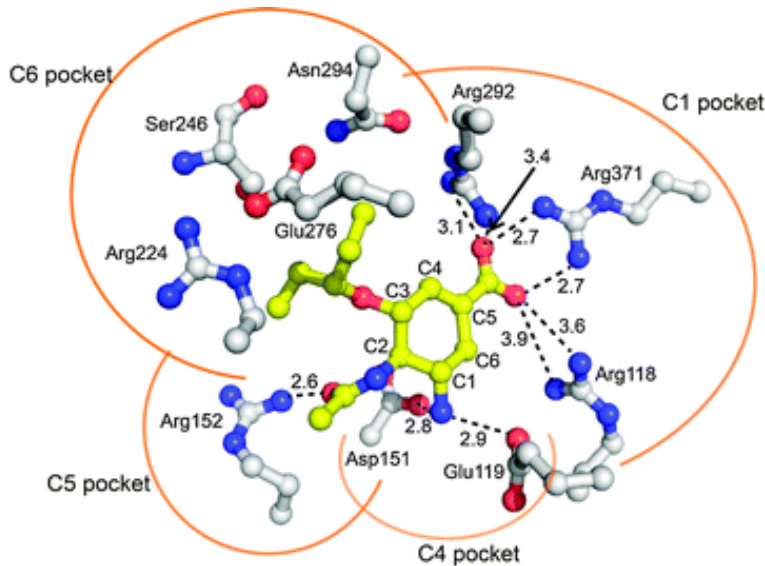
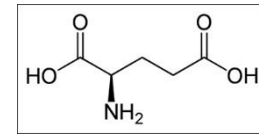




OSELTAMIVIR (προφάρμακο)



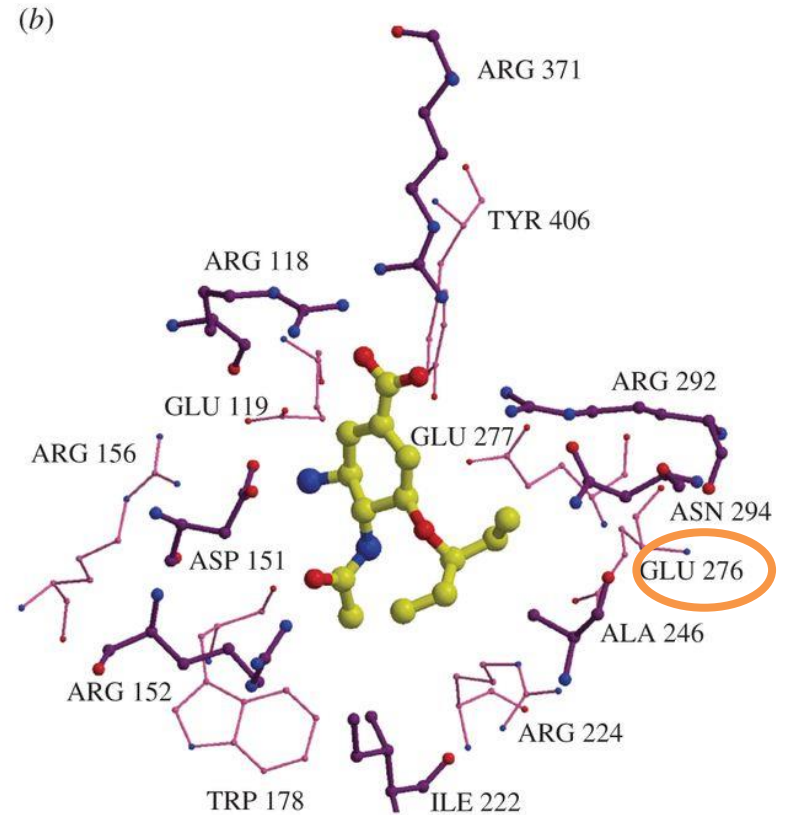
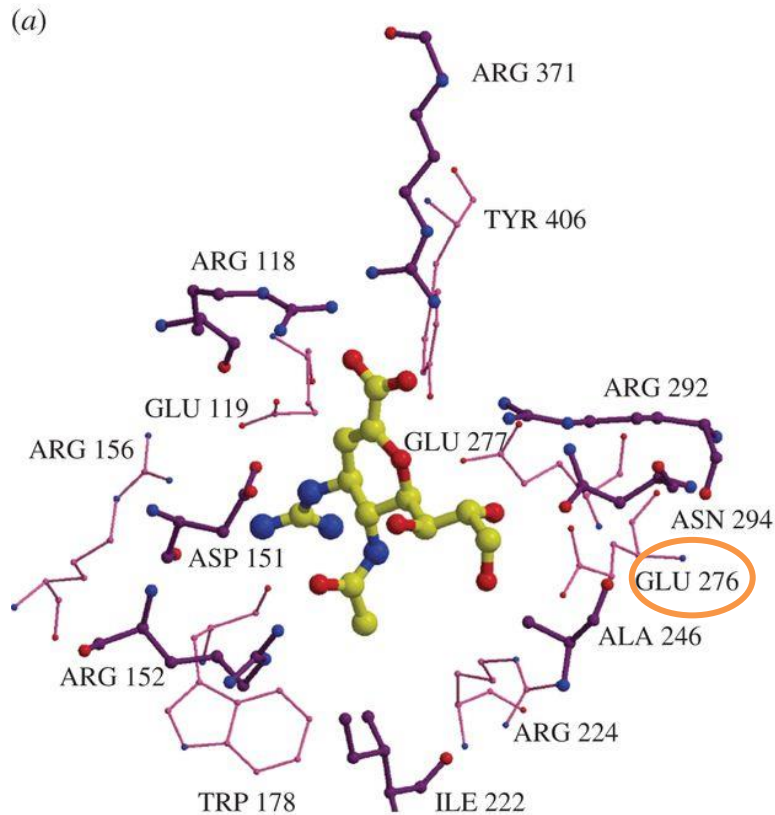
η δραστική μορφή



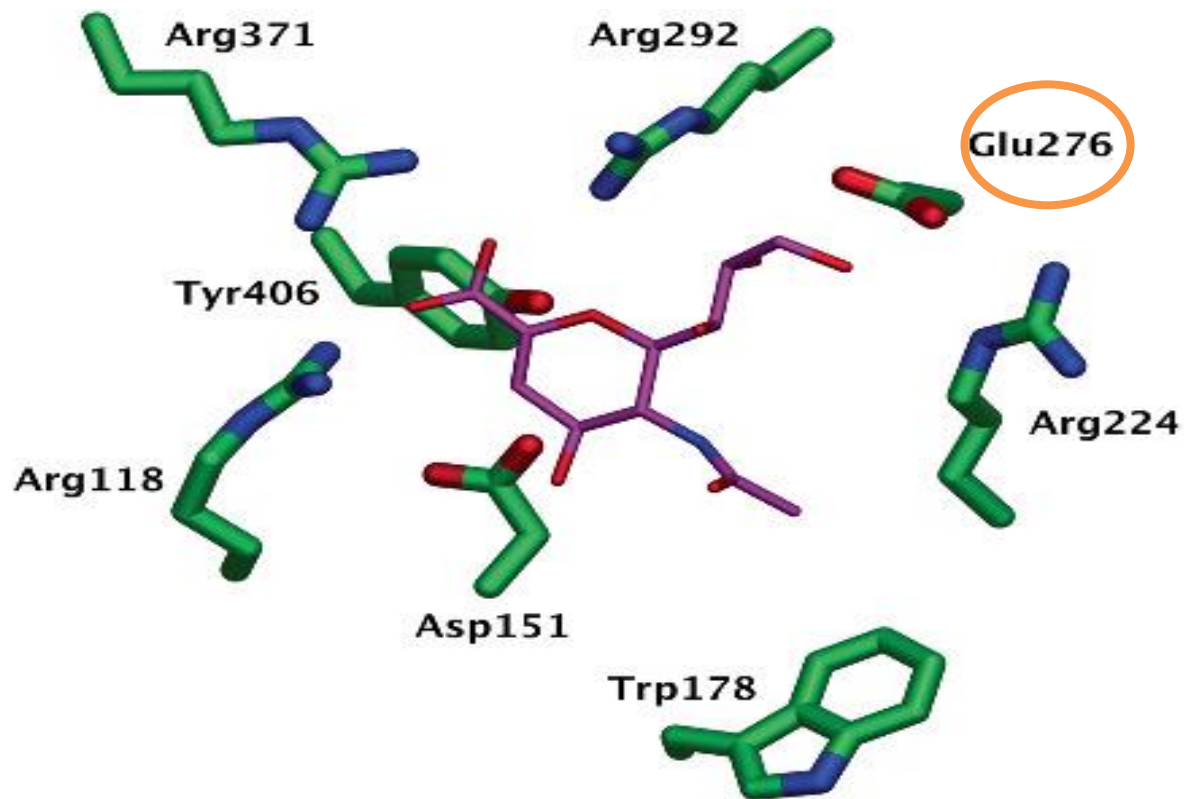
Στο **Osetamivir** διατηρείται το μοτίβο αλληλεπιδράσεων του **Zanamivir**. Επιπλέον, η **ισοπεντυλοξυ- ομάδα αναπτύσσει υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (με το Glu276)**, που βρίσκεται στα όρια του ενεργού κέντρου και αλλάζει ελαφρώς διαμόρφωση όταν συνδέεται το φάρμακο.

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

Με κατάλληλη μορφοποίηση το Osetamivir μπορεί να χορηγηθεί από το στόμα.



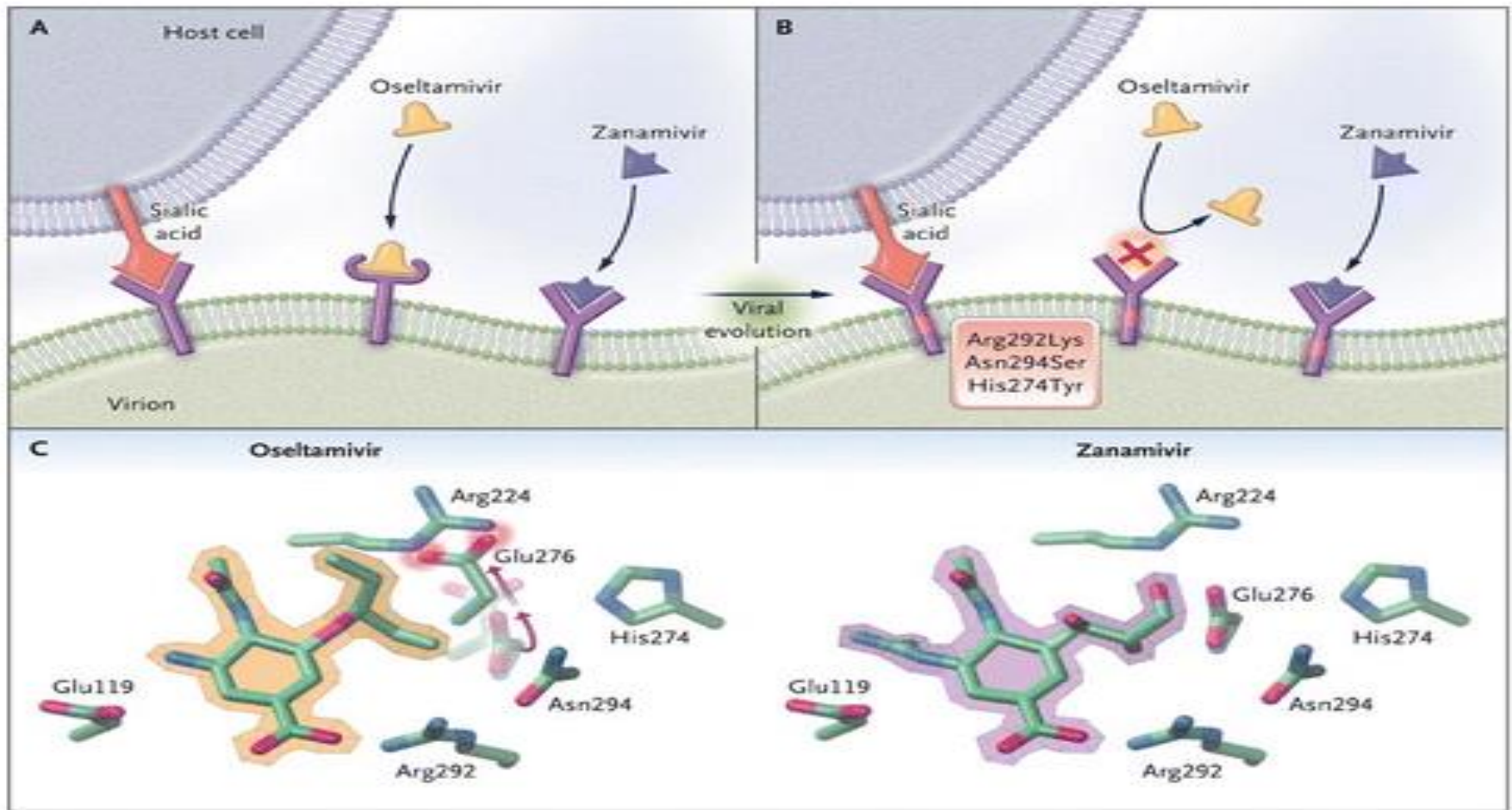
Κρυσταλλογραφική δομή (a) **Zanamivir** και (b) **Oseltamivir** στο ενεργό κέντρο της νευραμινιδάσης- διακρίνεται η αλλαγή διαμόρφωσης του **Glu276**



Ανάπτυξη αντοχής στο oseltamivir: η υδρόφοβη αλληλεπίδραση της ισοπεντυλοξυ- ομάδας του oseltamivir με το **Glu276** ευνοεί την εμφάνιση μεταλλάξεων: επειδή αυτό το αμινοξύ δεν συνδέεται με το φυσικό υπόστρωμα, μπορεί να μεταβληθεί χωρίς επιπτώσεις για την ενζυμική δράση.

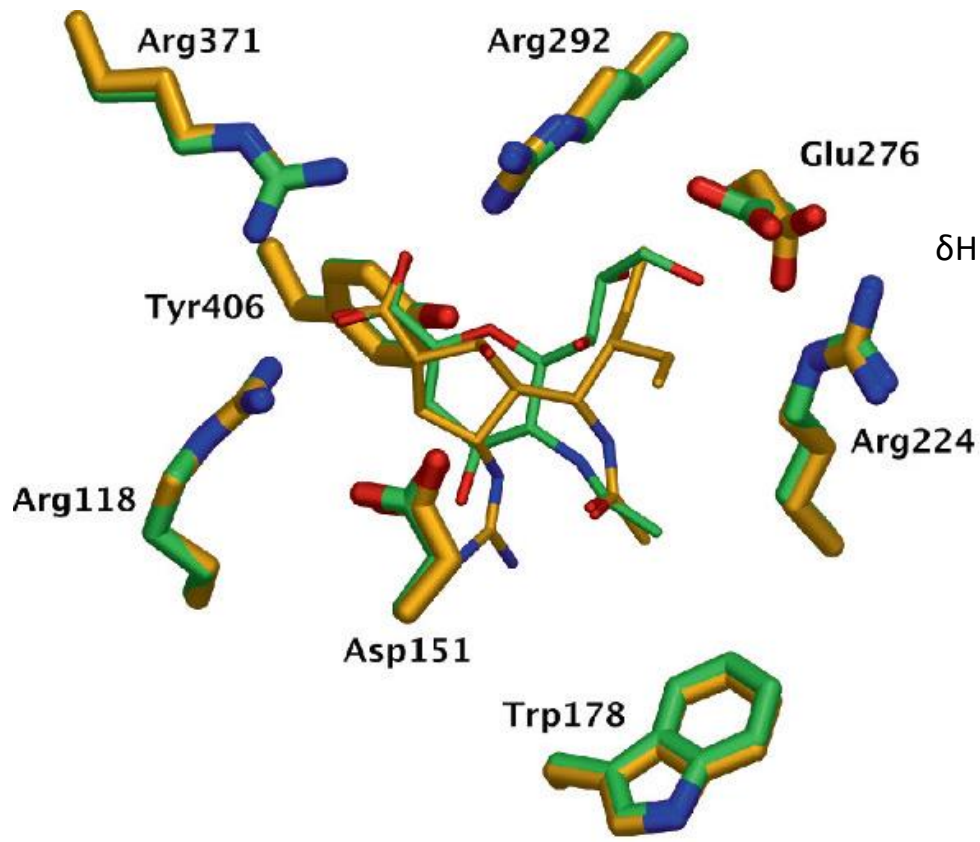
Συχνά ανιχνεύεται μεταλλαγμένο στέλεχος με αλλαγή γειτονικού αμινοξέος. Το **His274Tyr** δεν αναστέλλεται ικανοποιητικά από το φάρμακο, αλλά **πολλαπλασιάζεται αργά**. Όμως, με επί πλέον μεταλλάξεις ευνοείται η ανάπτυξη **παθογόνων στελεχών ανθεκτικών στο oseltamivir, που πολλαπλασιάζονται γρηγορότερα (Χ100) από το άγριο στέλεχος**.

Δυσκολότερα αναπτύσσεται αντοχή στο zanamivir.



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

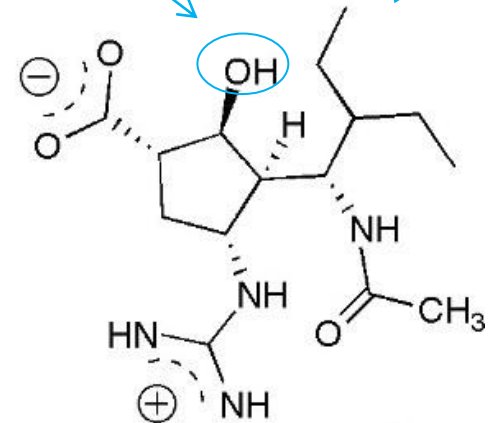
Το zanamivir που μοιάζει περισσότερο στο φυσικό υπόστρωμα, συνδέεται αυστηρά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου που δεν μεταλλάσσεται εύκολα. Η εμφάνιση φαρμακοάντοχων μεταλλάξεων είναι δυσκολότερη, όχι όμως αδύνατη.



Υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις όπως στο zanamivir

δη με 4-OH όπως το Neu5Ac2en

Υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις όπως στο oseltamivir

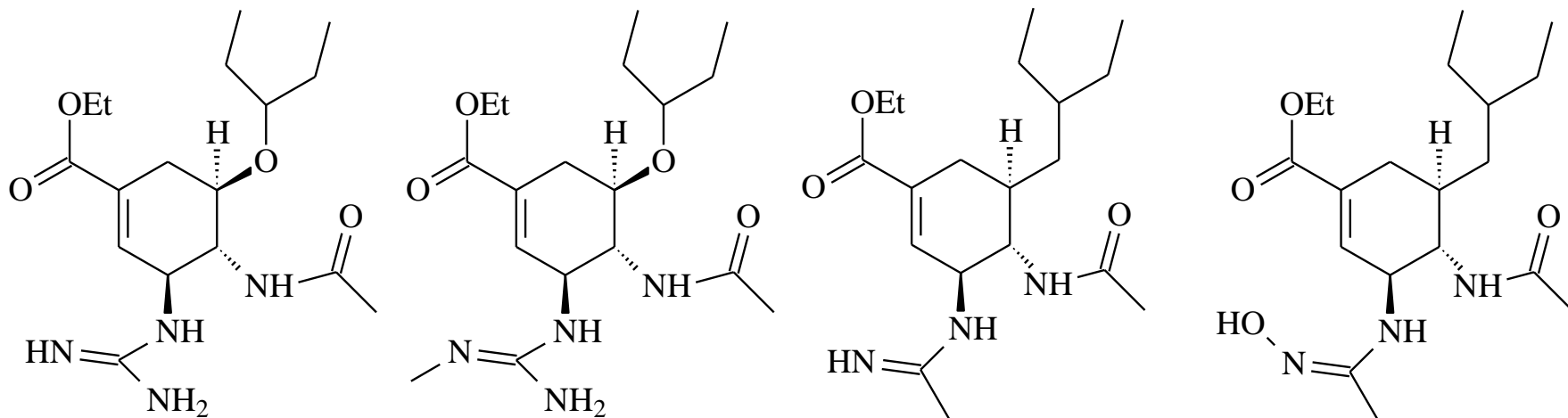


(peramivir)



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

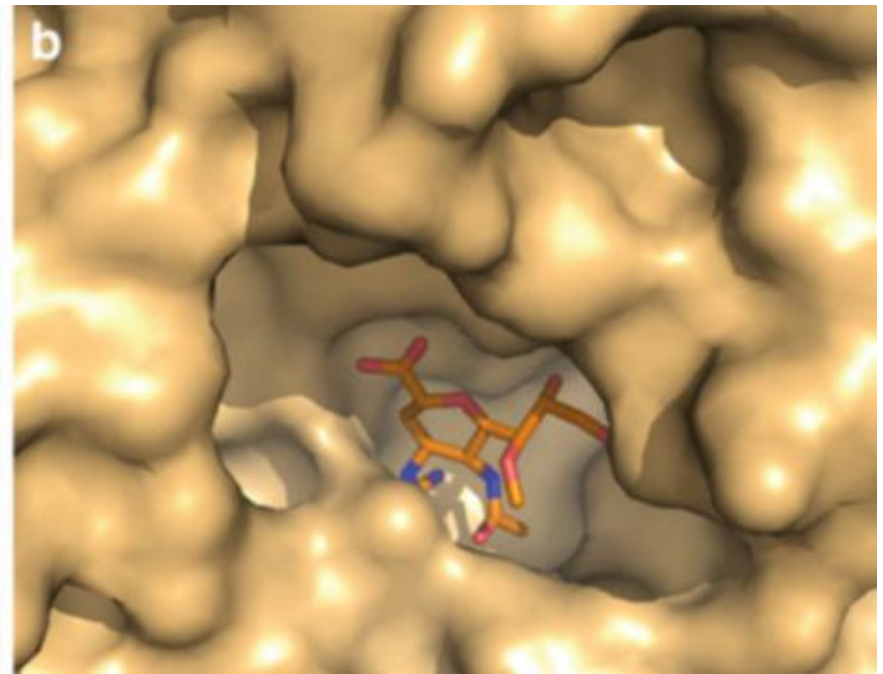
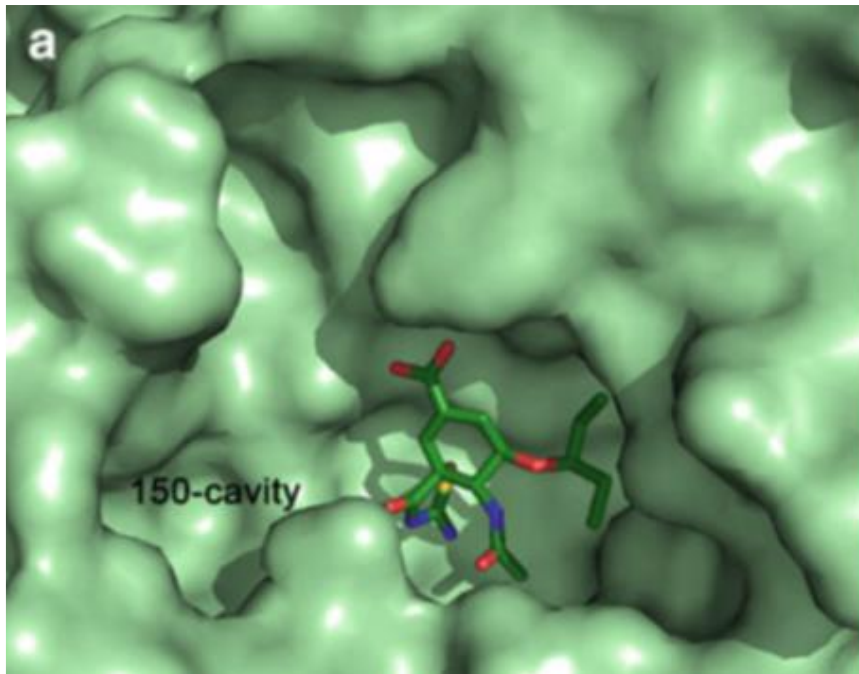
Μικρή βιοδιαθεσιμότητα => **κατάλληλο μόνο για ενδομυϊκή χορήγηση. Χορηγείται ενδονοσοκομειακά, σε ασθενείς με οξέα συμπτώματα.**



Overcoming resistance to neuraminidase inhibitors

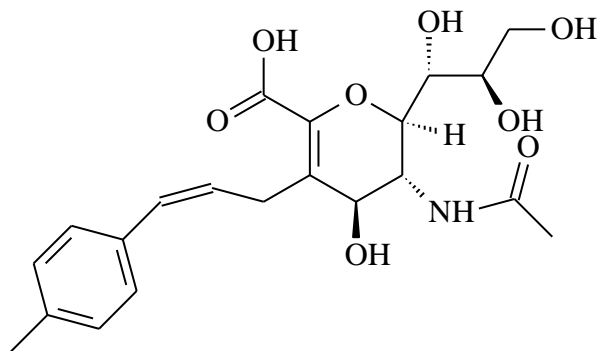
Οι ερευνητικές προσπάθειες συνεχίζονται: η αντικατάσταση της αμινομάδας του **Oseltamivir** με ομάδα γουανιδίνης, *N*-μεθυλογουανιδίνης, *N*-ακυλογουανιδίνης, αμιδίνης και αμιδοξίμης έδωσε πολύ δραστικά παράγωγα. Το τελευταίο παρουσιάζει βιοδιαθεσιμότητα για χορήγηση από το στόμα ίδια με του oseltamivir .

Υπάρχει **βάσιμη ανησυχία για την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών**, καθώς σχεδόν όλα τα απομονωθέντα στελέχη H1N1 το 2008 ήταν ανθεκτικά στο **Oseltamivir**. Επίσης, σε σποραδικά περιστατικά μόλυνσης με μεταλλαγμένα στελέχη H7N9 τα φάρμακα αυτά δεν ήταν αποτελεσματικά, ιδιαίτερα στα βαριά περιστατικά.

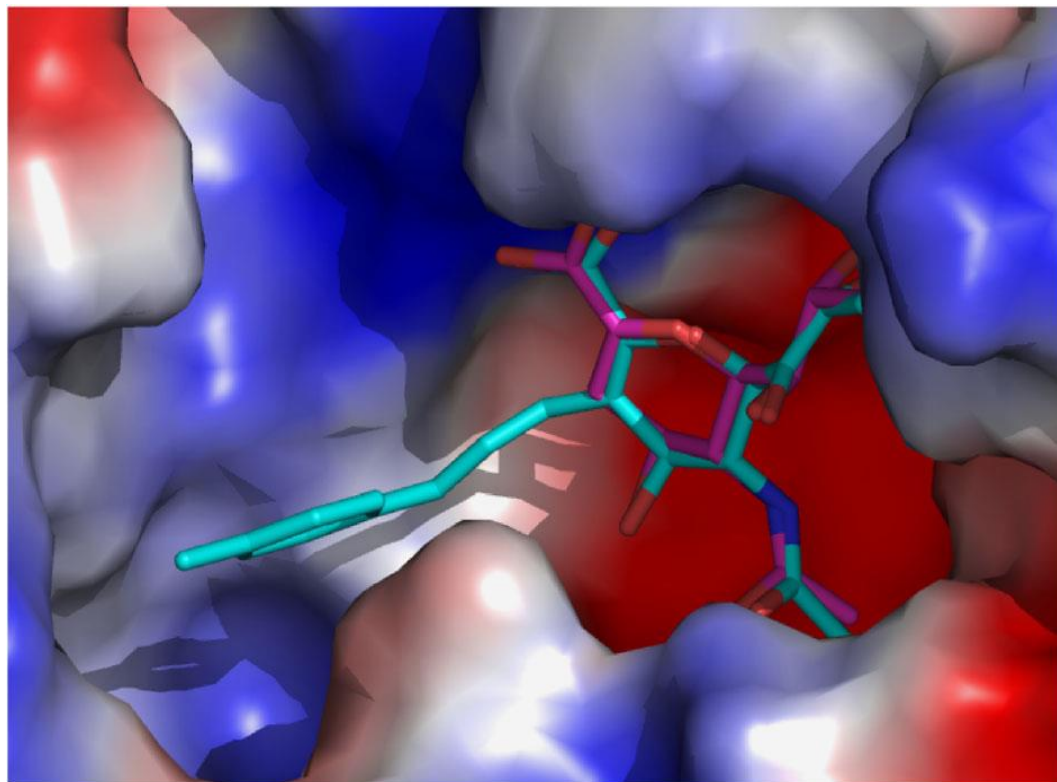
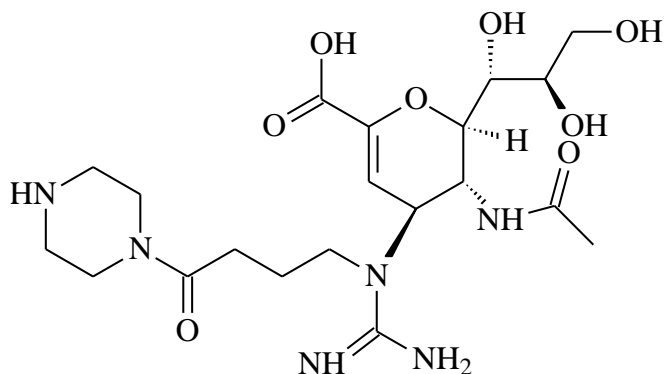


Αξιοποίηση κοντινών λιπόφιλων κοιλοτήτων Η σύνδεση σιαλικού οξέος ή άλλου προσδέματος στο ενεργό κέντρο της NA προϋποθέτει μετακίνηση μιας έλικας (έλικα 150, α.147-151) και την αποκάλυψη μιας γειτονικής υδρόφοβης κοιλότητας (κοιλότητα 150).

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

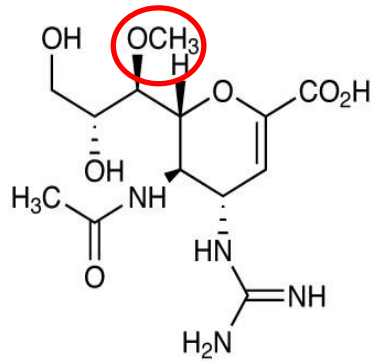


3-(p-tolyl)allyl-Neu5Ac2en

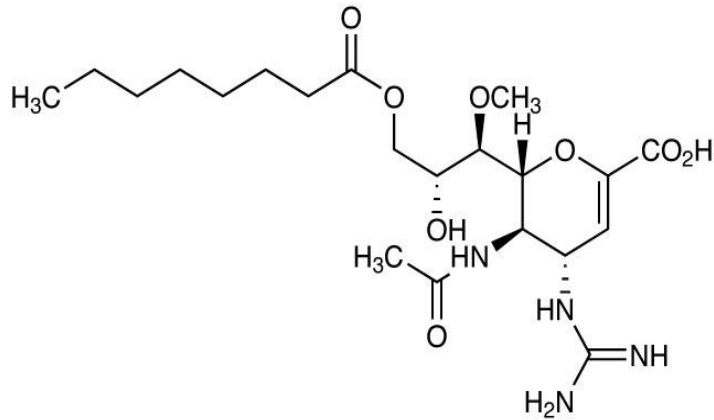


Η εισαγωγή μεγάλου υποκαταστάτη στην 3-θέση παραγώγου πυρανόζης ενισχύει τη δραστηριότητα αναστολέων της NA έναντι των ιών που διαθέτουν **NA τύπου I**: ο υποκαταστάτης εισέρχεται και συνδέεται στην κοιλότητα-150.

→ Επανέρχεται η υποκατάσταση με την βασική γουανιδίνη, τον ογκώδη υποκαταστάτη και την αλυσίδα τύπου γλυκερόλης. Ο συνδυασμός τους μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης μεταλλαγμένων στελεχών.



Laninamivir (R-125489)



Laninamivir prodrug (CS-8958)

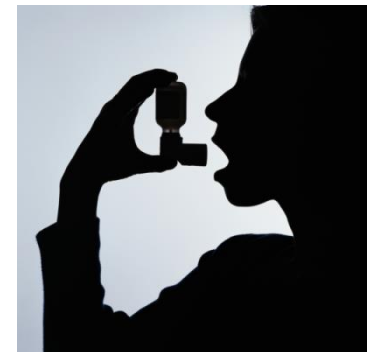
Laninamivir octanoate: προφάρμακο παραγώγου πυρανόξης, κατάλληλο για ψεκασμό. Ο λιπόφιλος εστέρας στην 9-θέση αποδίδει σταδιακά το δραστικό συστατικό (**laninamivir**) στους πνεύμονες, όπου δρα ως **ισχυρός αναστολέας της NA τύπου I**. Προσομοιάζει τον τρόπο σύνδεσης του **zanamivir** => δραστικό στα στελέχη **H274Y** - μικρή πιθανότητα φαρμακοάντοχων μεταλλάξεων.

Ασκεί **παρατεταμένη δράση**, διατηρώντας τα θεραπευτικά επίπεδα του **laninamivir** στους πνεύμονες για **τουλάχιστον 5 ημέρες**.

Εξαιρετικό για προφύλαξη (1 ψεκασμός εβδομαδιαίως).

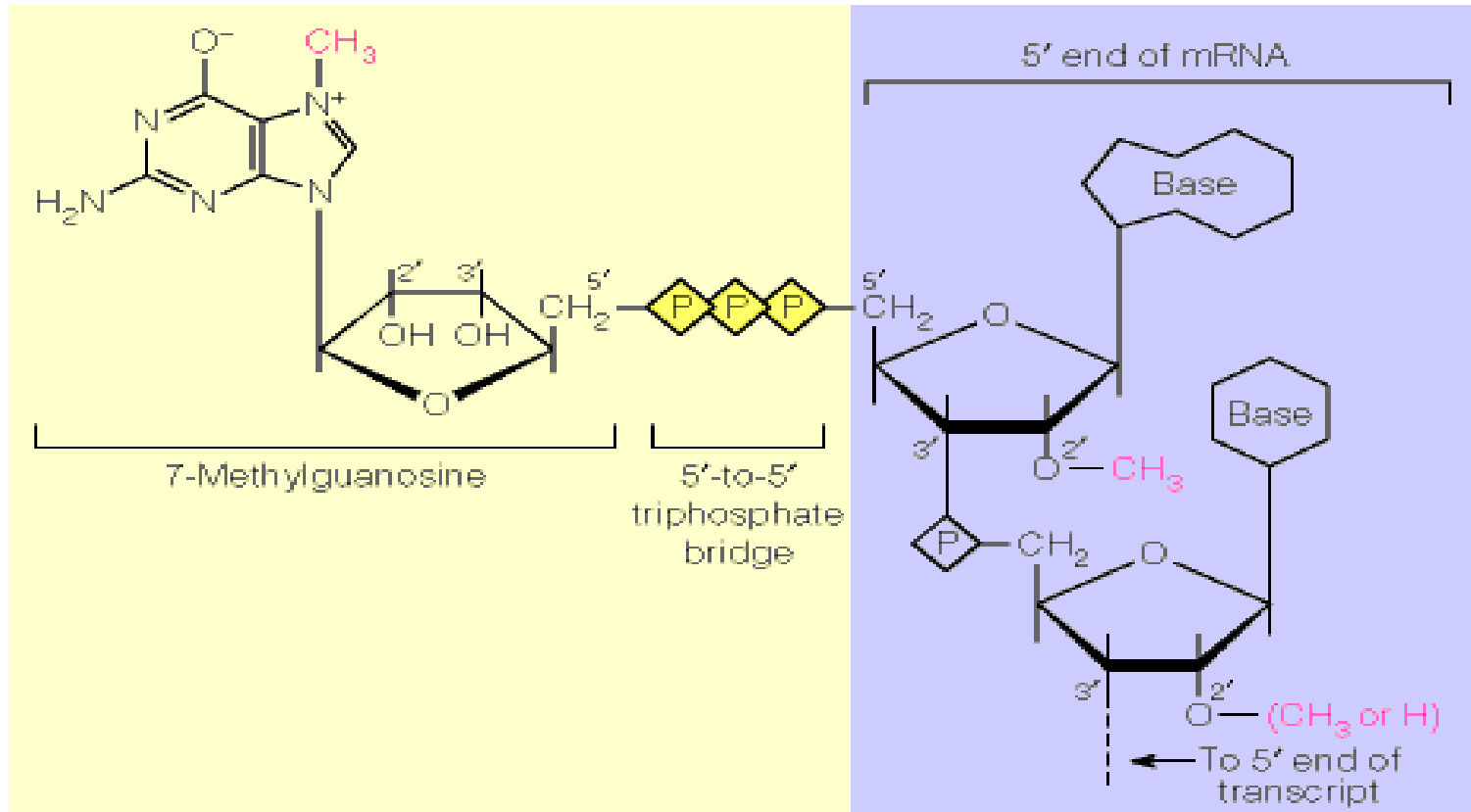
Διατίθεται σε συσκευασία 8 (ενήλικες) και 4 (παιδιά) ψεκασμών.

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

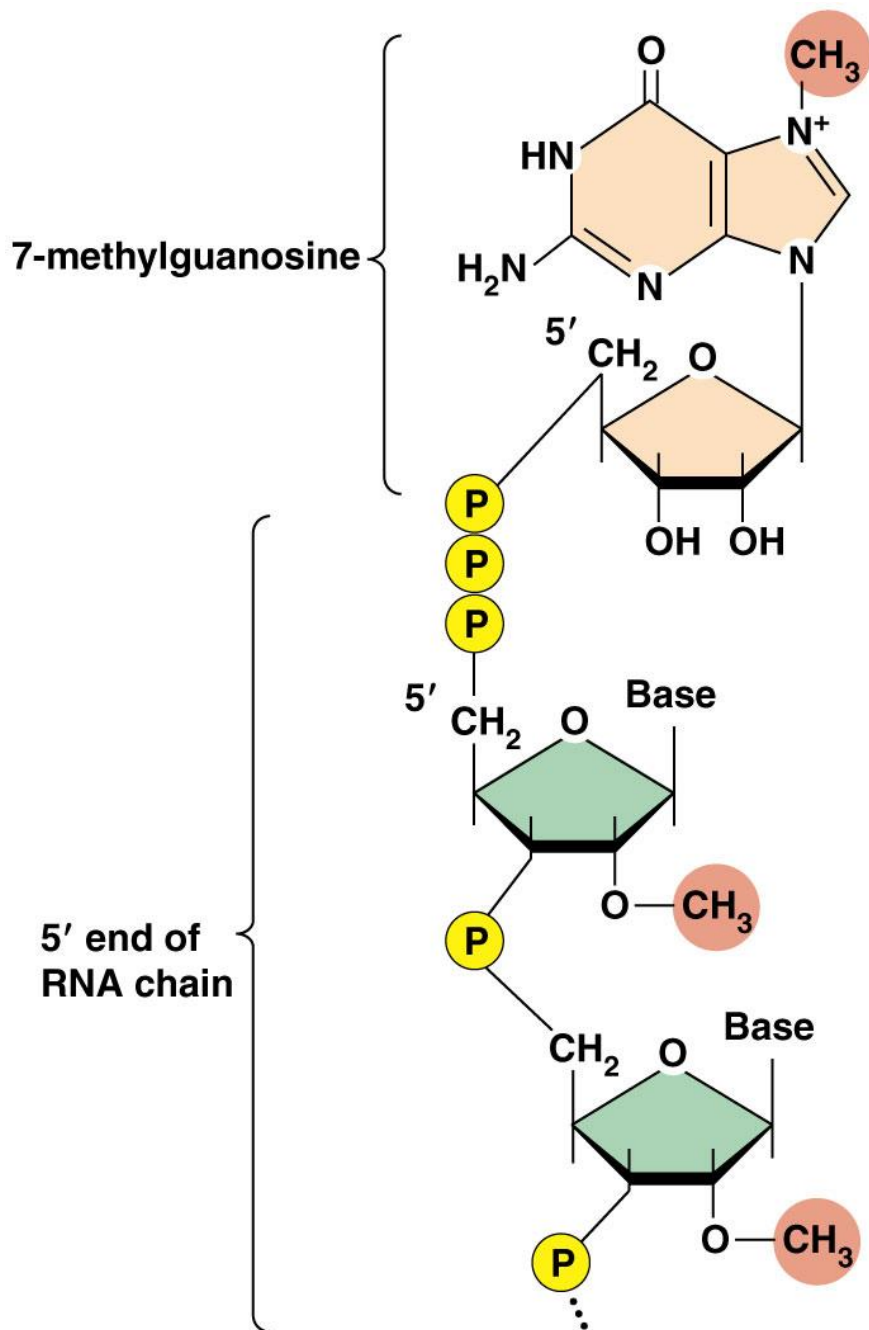


Αναστολείς του m-RNA cap snatching

Σε αναλογία με το ευκαρυωτικό mRNA, το ιϊκό vRNA πρέπει να διαθέτει σταθερά άκρα. Το poly(A) 3'-άκρο και το 5'-capping εξασφαλίζουν την **σταθερότητα** και την **αποτελεσματική μετάφραση** του.



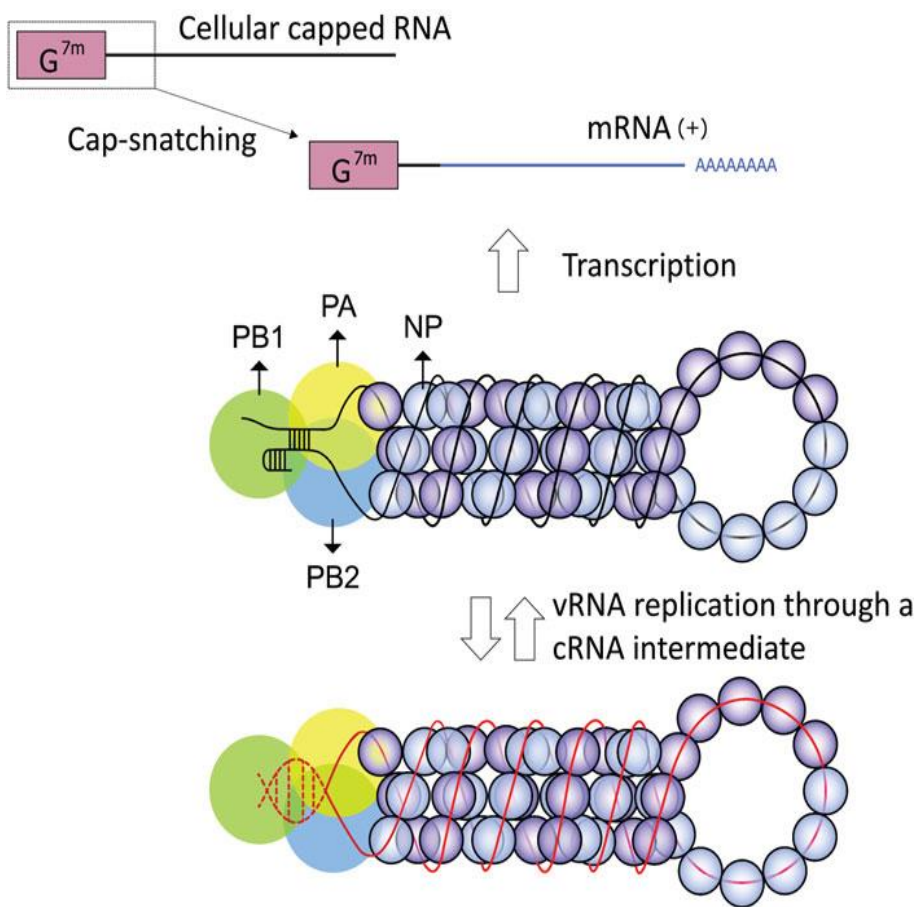
Ενώ η ιϊκή πολυμεράση διαθέτει μηχανισμό προσθήκης του poly(A) τμήματος, δεν εισέρχεται στη διαδικασία δημιουργίας 5'-capping. Κατά την μεταγραφή vRNA → mRNA χρησιμοποιεί ένα 5'-capped τμήμα 10-15 νουκλεοτιδίων (κυρίως non-coding RNA), που 'κλέβει' από κυτταρικό pre-mRNA και έτσι **καθορίζει επακριβώς το σημείο έναρξης της μετάφρασης** (χαρακτηριστικό των segmented -RNA ιών).



Η μεταγραφή γίνεται **downstream** ($5' \rightarrow 3'$). Τα ευκαρυωτικά m-RNA έχουν τροποποιήσεις, που εξασφαλίζουν την προστασία τους από αποικοδόμηση (επίδραση εξωνουκλεασών) κατά τη μεταφορά τους εκτός του πυρήνα. Το ένζυμο **MTr1** εξασφαλίζει στο κυτταρικό mRNA το κατάλληλο cap που λειτουργεί ως "**nucleic acid labeler**".

Η δημιουργία δεσμού 5-5' αφήνει ελεύθερο το 3'-OH της γουανωσίνης, το οποίο μεθυλιώνεται από τη SAM (**m⁷G**). Το άκρο αναγνωρίζεται από τα κυτταρικά ένζυμα, δεν εκλαμβάνεται ως απειλή και επομένως δεν ενεργοποιεί αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η polyA σειρά αποτελείται από ~250 νουκλεοτίδια, που σταθεροποιούνται με εκτεταμένο base stacking.

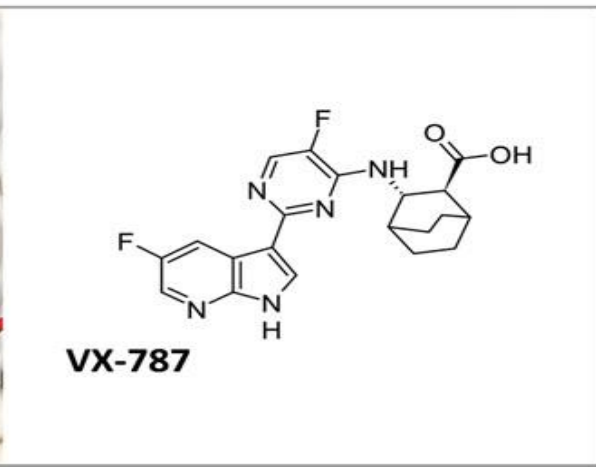
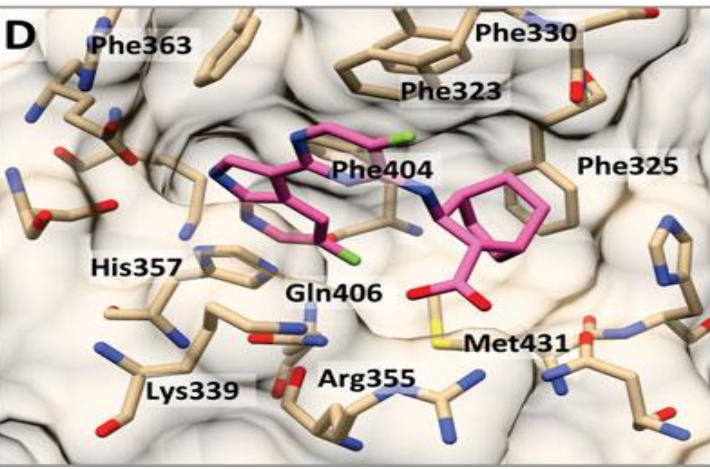
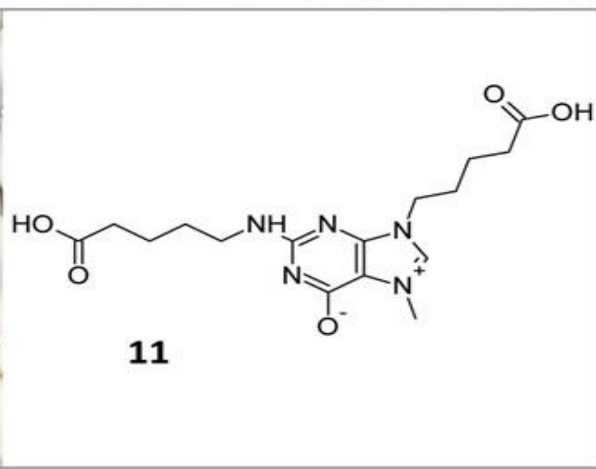
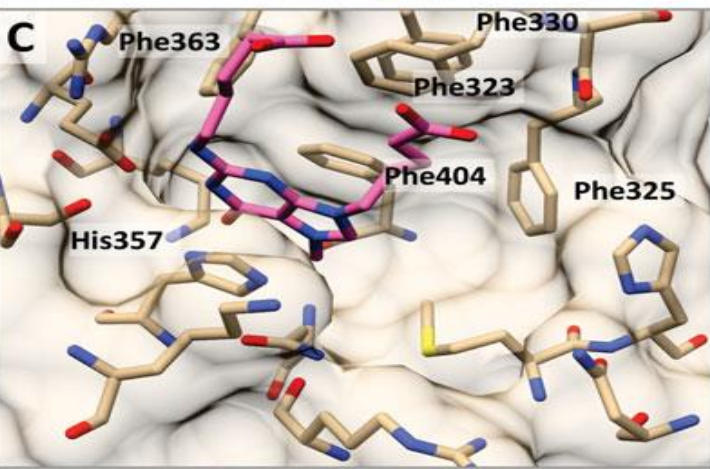
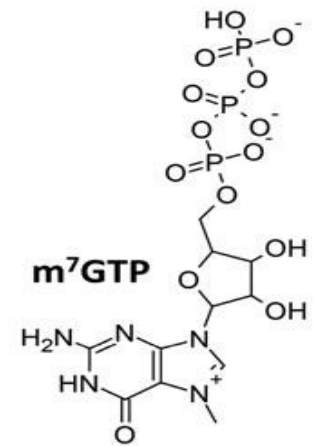
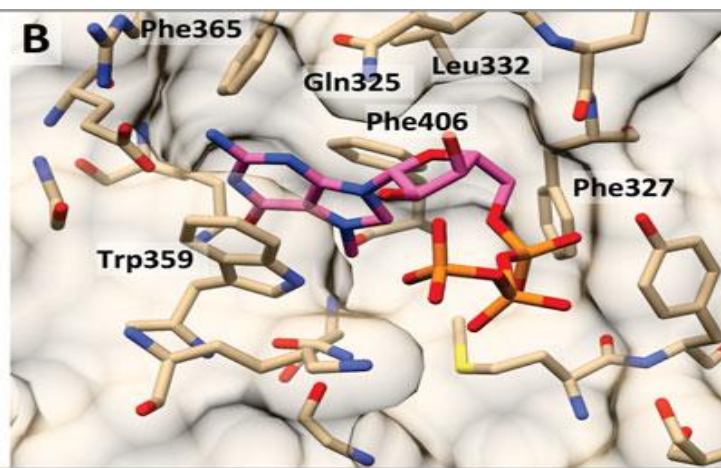
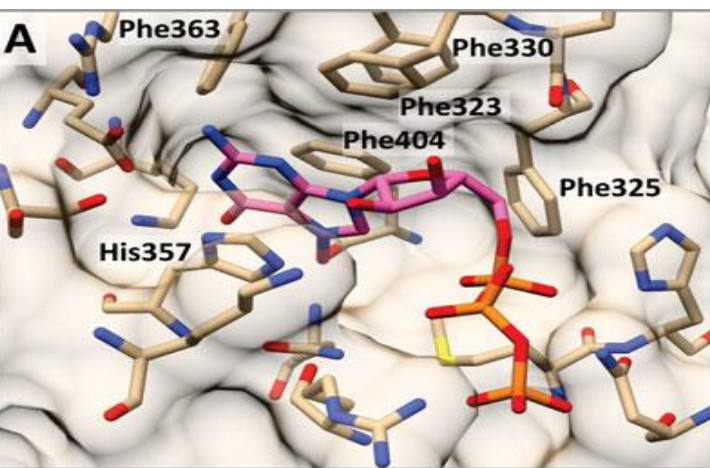


Η ιϊκή πολυμεράση είναι μια σύνθετη ετεροτριμερής πρωτεΐνη, αποτελούμενη από 3 υπομονάδες: **PA** (ενδονουκλεάση) **PB1** (vRdRp) και **PB2** (η υπομονάδα που αναγνωρίζει το κυτταρικό mRNA και διενεργεί το cap-snatching).

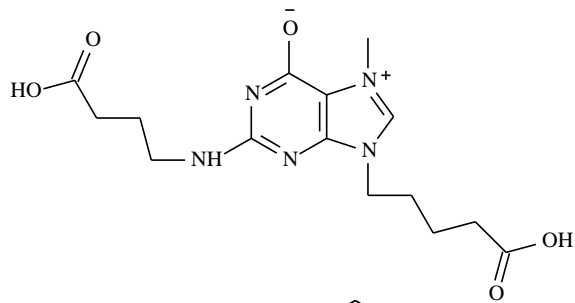
Με μια συνεχόμενη καταλυτική διαδικασία:

- η **PB2** αναγνωρίζει το **m⁷G** και συνδέεται με τμήμα 10-15 νουκλεοτιδίων του κυτταρικού pre-mRNA
- η **PA** υδρολύει τον 3,5'-φωσφοδιεστερικό δεσμό
- η **PB1** χρησιμοποιεί ως primer το μικρό capped νουκλεοτίδιο για μεταγραφή: τη σύνθεση του χιμαιρικού ιϊκού m-RNA που θα έχει (polyU→polyA) 3'-άκρο.

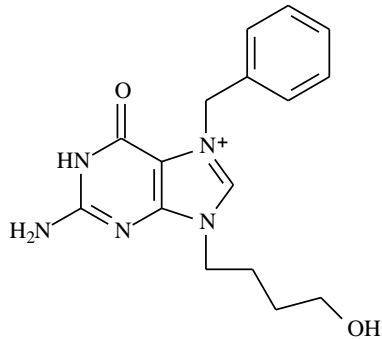
Η πολυλειτουργική ιϊκή πολυμεράση διαθέτει δομική και λειτουργική πολυπλοκότητα. Αποτελεί πολλά υποσχόμενο, αλλά δύσκολο φαρμακευτικό στόχο. Προσδοκία ανάπτυξης + συνδυαστικών θεραπευτικών σχημάτων.



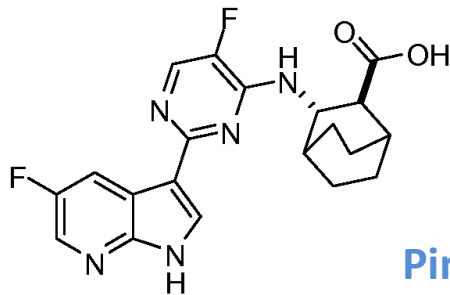
I) Αναστολείς του PB2-cap binding domain (PB2-CBD).
Εκλεκτικότητα: το m⁷GTP που μιμείται την τριφωσφορική 7-μεθυλογουανοσίνη αναγνωρίζεται από ανθρώπινα ένζυμα => πιθανή κυτταροτοξικότητα. Η μελέτη του τρόπου σύνδεσης του στο PB2 CBD συνέβαλε στον σχεδιασμό αποτελεσματικών αναστολέων, όπως το **VX-787**: **aromatic sandwich**, ο κεντρικός «πουρινικός» δακτύλιος αναπτύσσει ισχυρές π-π αλληλεπιδράσεις με Phe404 και His357.



Ακυκλονουκλεοζιτικό παράγωγο, ισχυρός αναστολέας του ενζύμου: αδρανές σε κυτταρική καλλιέργεια, πιθανώς λόγω δυσκολίας εισόδου στο κύτταρο.



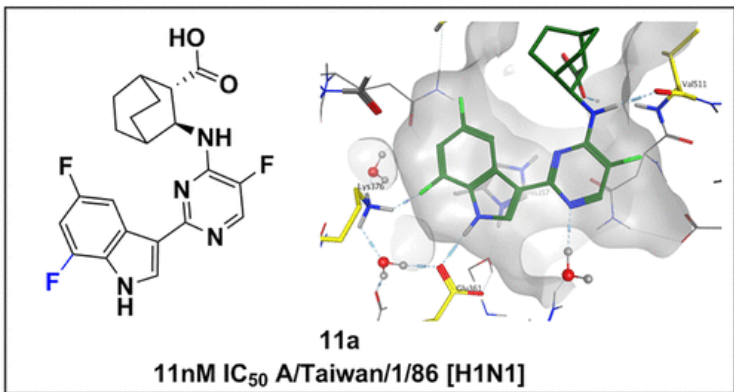
RO 0794238: εκλεκτικός αναστολέας του ιϊκού cap-binding, δεν αλληλεπιδρά με αντίστοιχα ανθρώπινα ένζυμα.



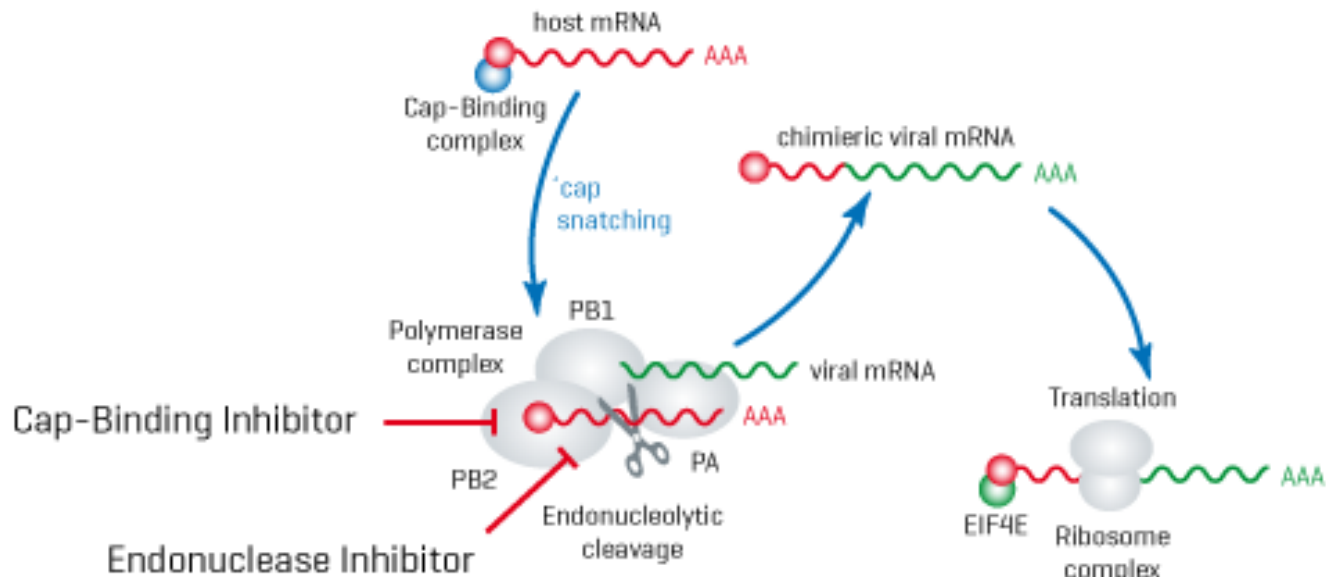
Pimodivir

Pimodivir (VX-787) $EC_{50} \approx 2$ nM σε διάφορα στελέχη influenza A).

Δραστικό από το στόμα, αποτελεσματικό για προφύλαξη και θεραπεία. Ο λιπόφιλος υποκαταστάτης συνεισφέρει με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με την PB2 στη κατάλληλη διεύθυνση του καρβοξυλίου, του οποίου η οξύτητα (pKa) είναι σημαντική.

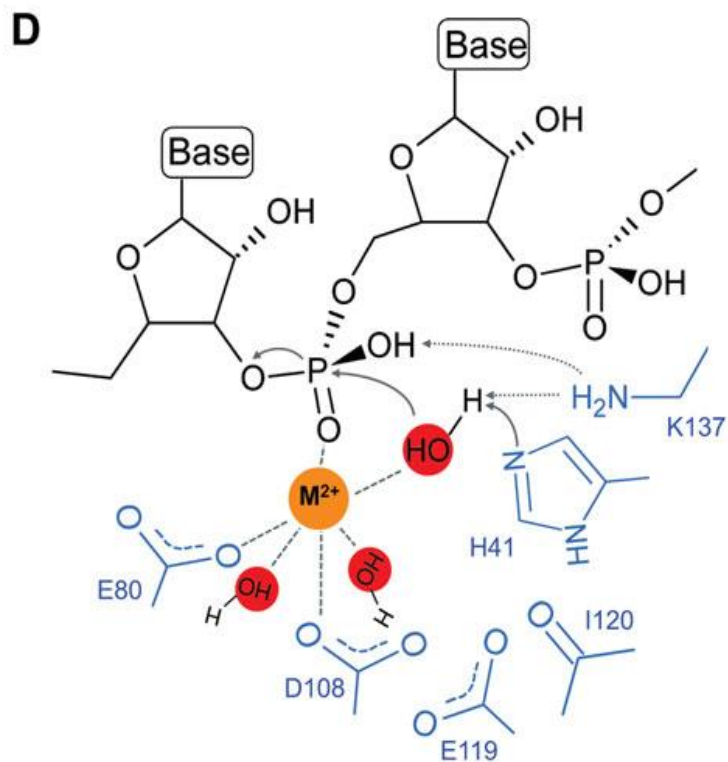
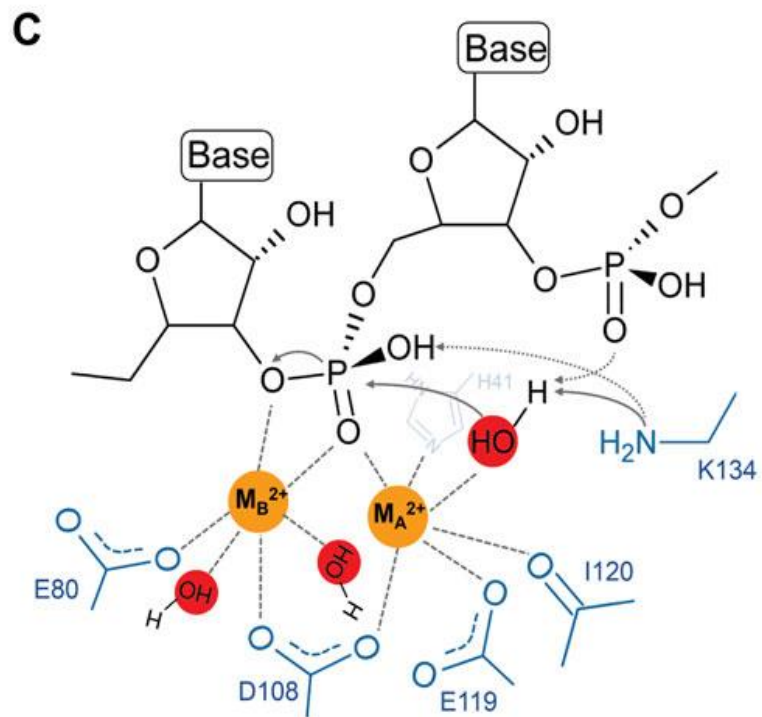
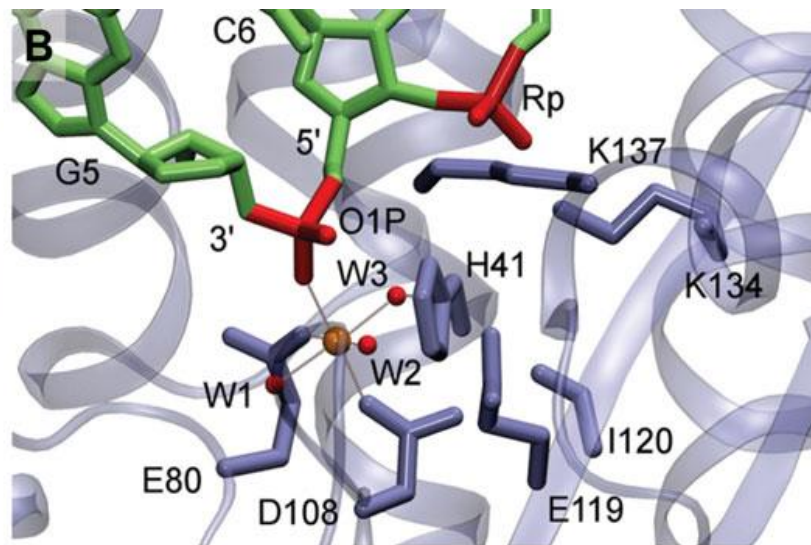
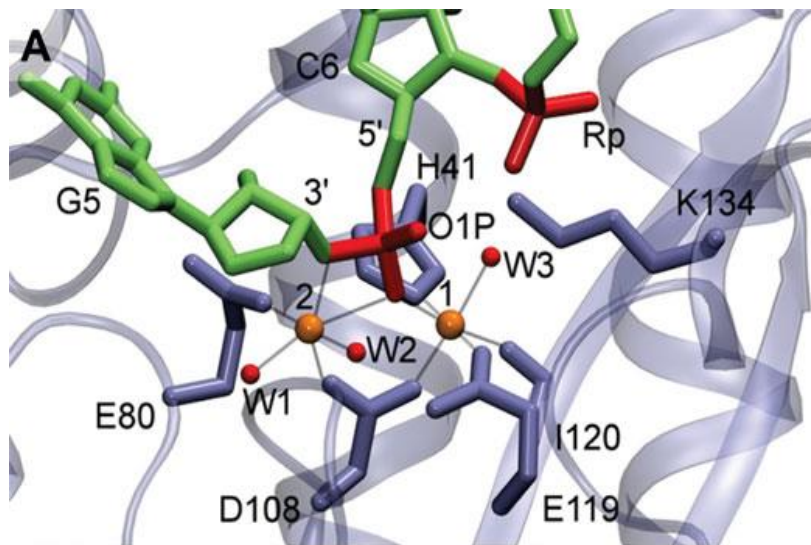


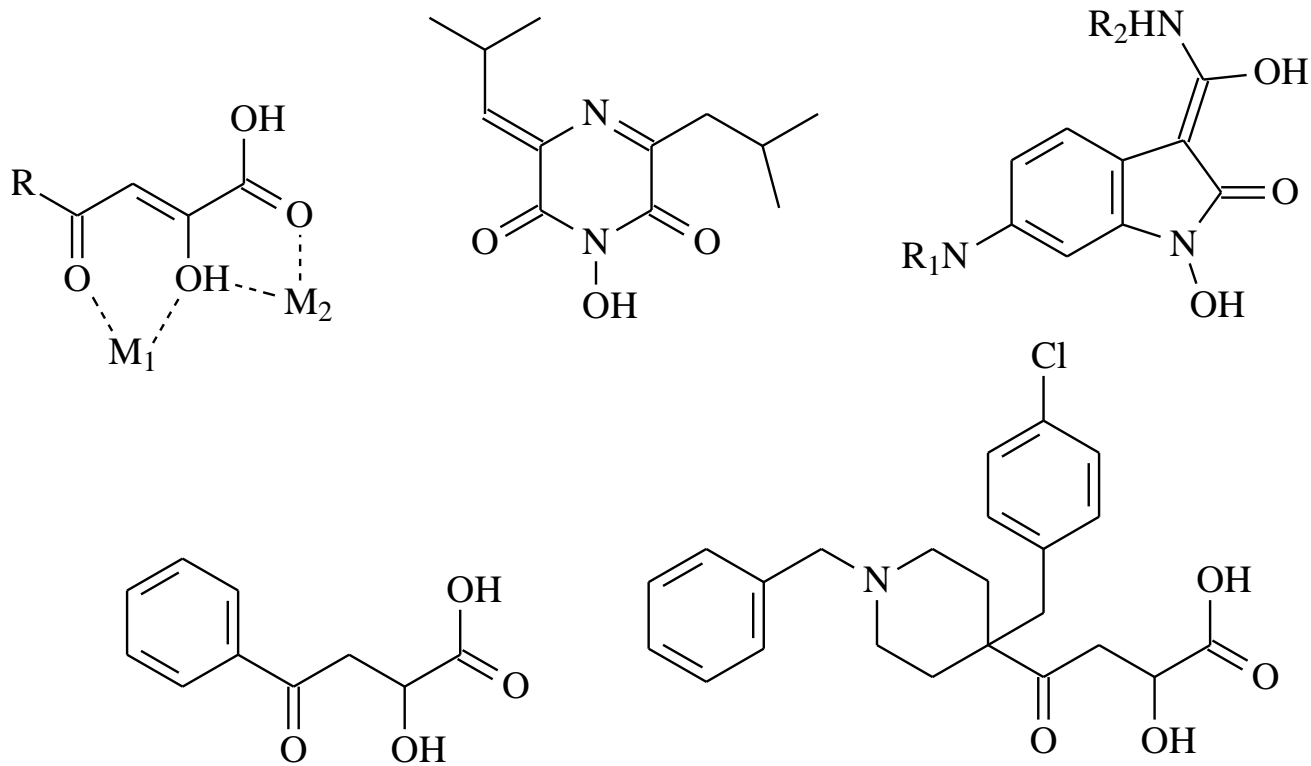
Οι κλινικές δοκιμές σταμάτησαν το 2021, εξαιτίας της εμφάνισης μεταλλάξεων σε υψηλό ποσοστό (6.4%) συμμετεχόντων.



II) Αναστολείς της ενδονουκλεάσης (PA): πρόκειται για μεταλλοπρωτεάση, με το καταλυτικό της κέντρο, που εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο, να περιέχει **μια χαρακτηριστική αμινοξική αλληλουχία, καλά διατηρημένη στα διάφορα στελέχη influenza**, που κατά την υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού **συμπλοκοποιείται με 1, 2, ή 3 δισθενή μεταλλοϊόντα** (Mn^{2+}/Mg^{2+}) - το διμεταλλικό μοντέλο είναι το πιθανότερο.

Σχηματίζεται χαρακτηριστική υδρόφοβη κοιλότητα (**specificity domain**) με **3 άτομα O** να συμμετέχουν στο χηλικό σύμπλοκο.

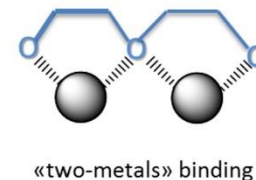
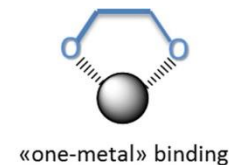
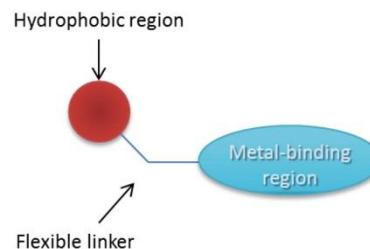
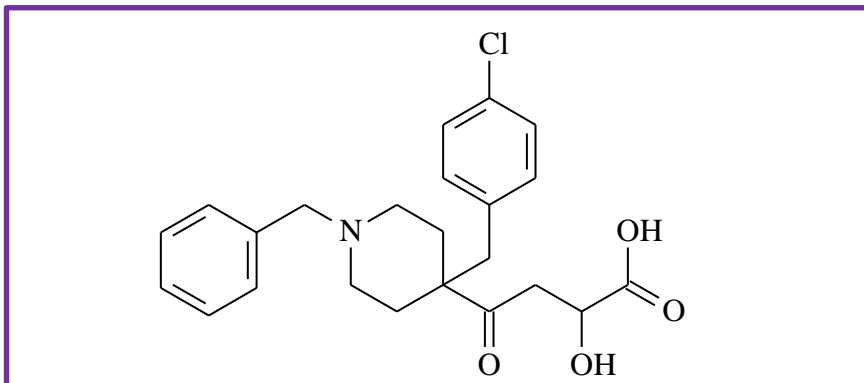




Φαρμακοφόρος δομή δικετο-οξέος: τα 3 άτομα O που συμμετέχουν στον σχηματισμό του συμπλόκου βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο με τα δύο μεταλλοϊόντα.

Στόχος: η εύρεση αναστολέων που δεν αναστέλλουν αντίστοιχα κυτταρικά ένζυμα. Το ενεργό κέντρο της PA είναι μεγάλο, αφού υποδέχεται 2 νουκλεοτίδια και διαθέτει πλαστικότητα, δηλ. ικανότητα προσαρμογής στο πρόσδεμα.

Υπάρχει προηγούμενη εμπειρία από την εύρεση αναστολέων της HIV-integrase.



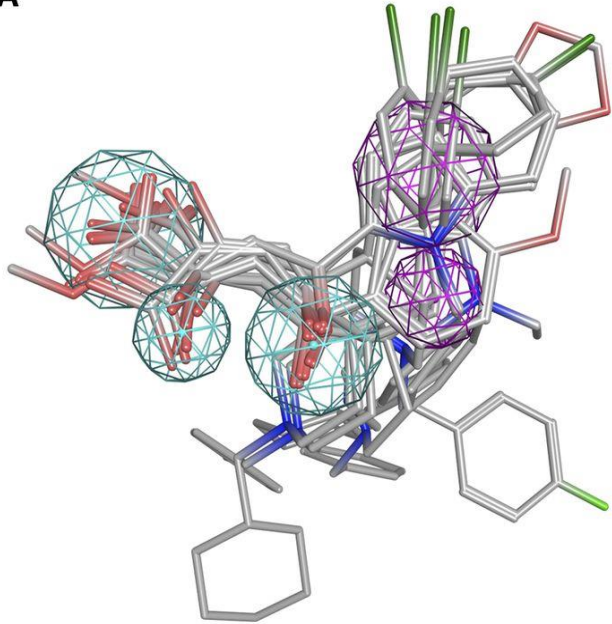
Μελέτη σειράς 4-υποκατεστημένων-2,4-διοξοβουτανοϊκών οξέων κατέληξε στην ανακάλυψη του L 742 001 (lead compound)

- Αναστέλλει την PA in vitro
- Αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό του ιού in cellulo
- Ο μηχανισμός δράσης αποδεικνύεται από την ανάπτυξη resistance mutations.
- Καταπολεμά την μόλυνση in vivo (μείωση ιικού φορτίου πνευμόνων σε πειραματόζωα)

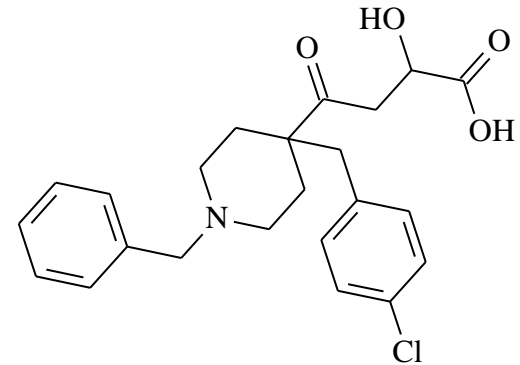
Προβλήματα:

Διευκρίνηση του αριθμού και της φύσης των μεταλλοϊόντων (Mg^{2+} ή Mn^{2+}): στα βιοχημικά assays

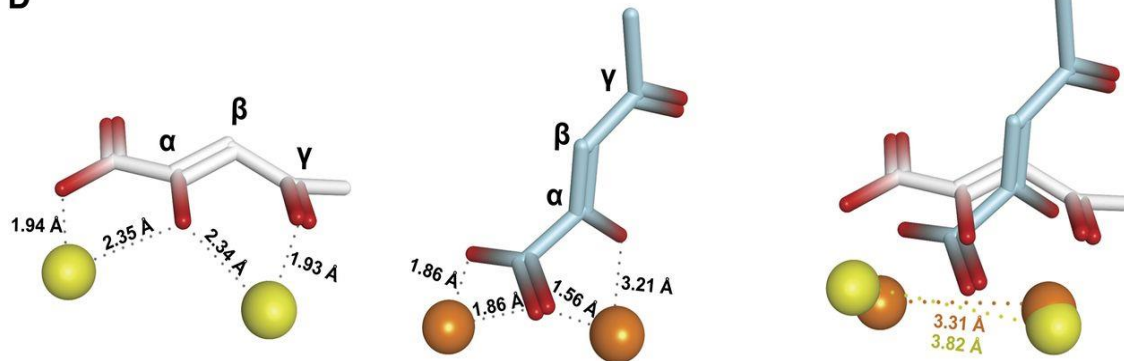
A

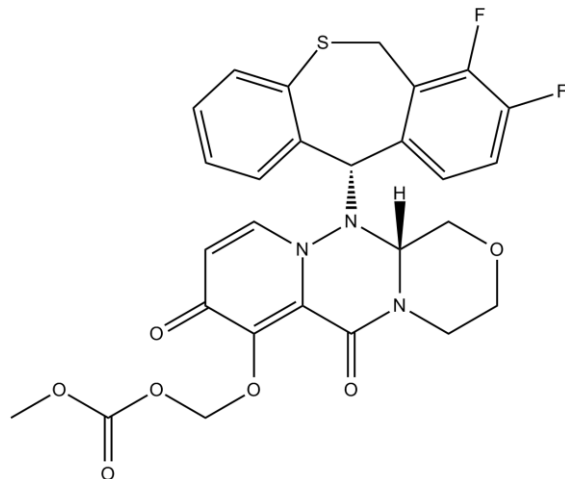


Η φύση του μετάλλου είναι καθοριστική για τη λήψη συγκεκριμένης ταυτομερούς δομής (δικετο- ή β-κετοενόλη)



D

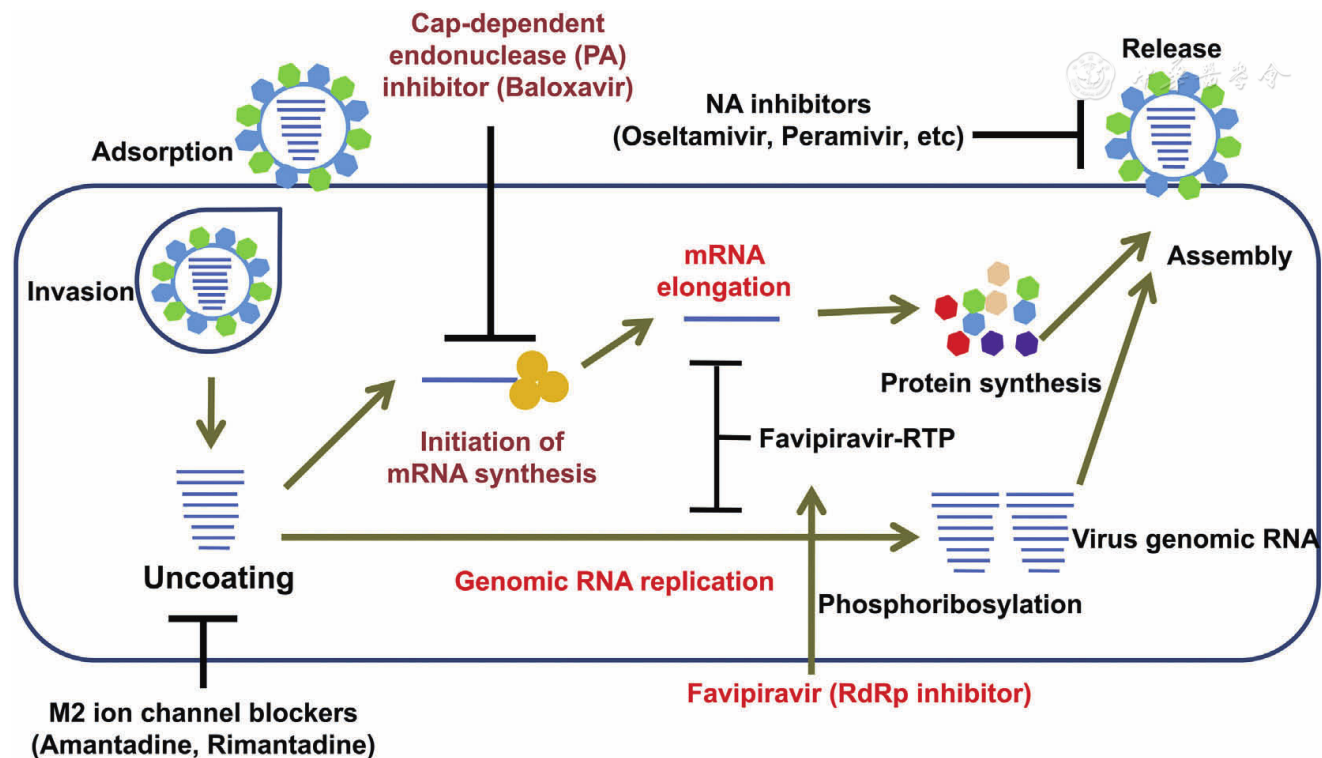




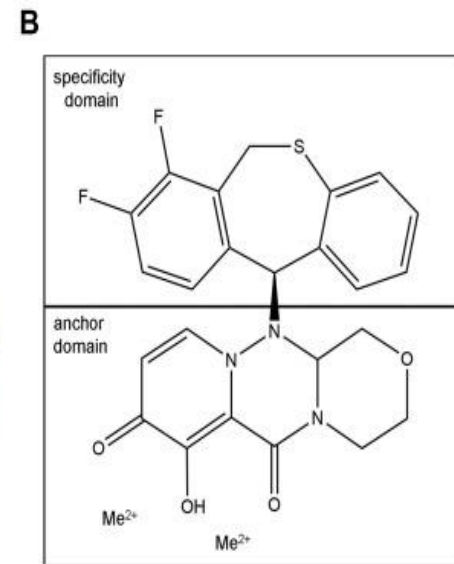
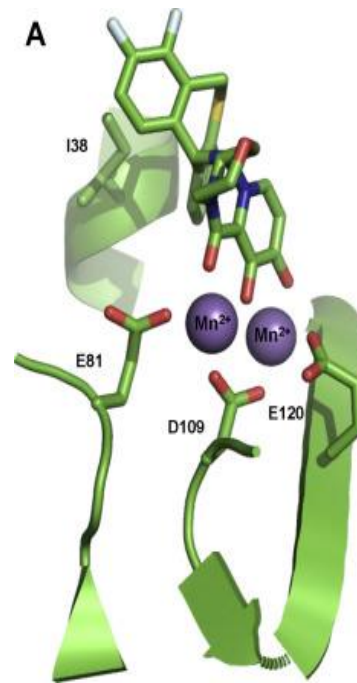
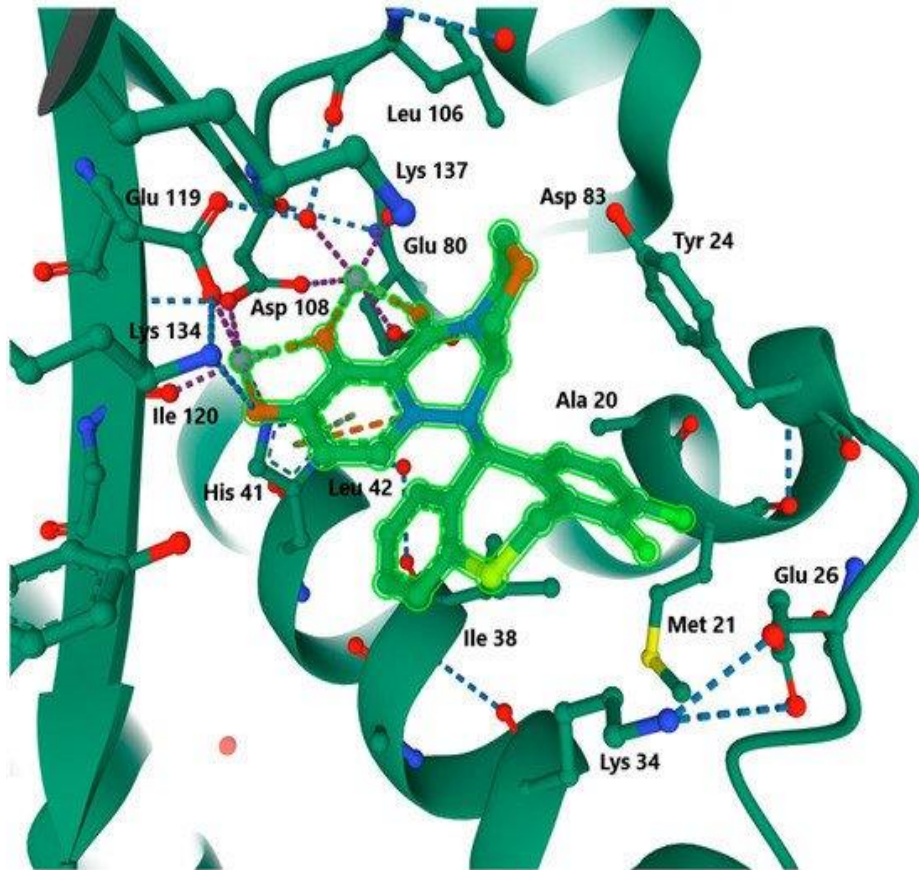
Το **Baloxavir marboxil** είναι αποτελεσματικό και καλώς ανεκτό φάρμακο.

Εγκρίθηκε σε Ιαπωνία και ΗΠΑ το 2018, στην Ευρώπη το 2020.

Χορηγείται από το στόμα μόνο με συνταγή ως μονοδοσική αγωγή. Παρουσιάζει συνέργεια με αναστολείς NA => πιθανότητα ανάπτυξης συνδυαστικών σχημάτων.

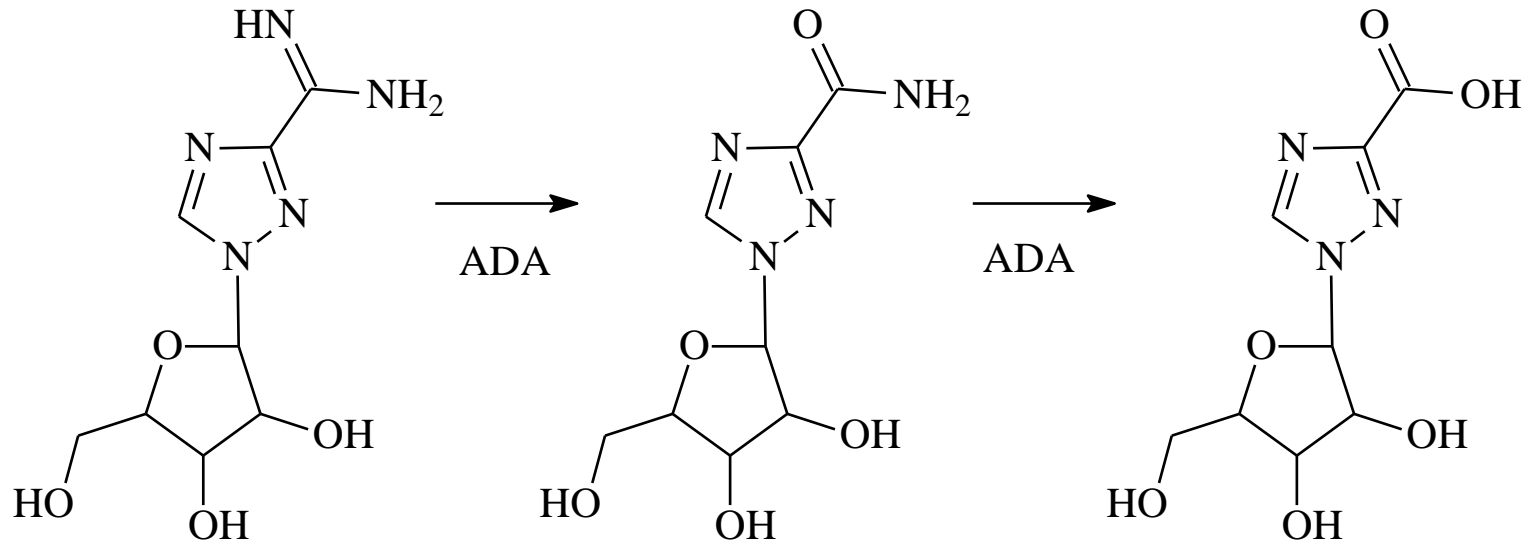


Το **Baloxavir marboxil** είναι προφάρμακο. Το αντίστοιχο οξύ συμπλοκοποιεί δισθενή μεταλλοϊόντα στο ενεργό κέντρο της car-snatching όξινης πολυμεράσης (PA), που δρα ως ενδονουκλεάση και την αναστέλλει ισχυρά και εκλεκτικά.



Η μετάλλαξη **I38T** (threonine αντί για isoleucine) μειώνει τις αλληλεπιδράσεις van der Waals και καταλήγει σε ανθεκτικά στελέχη. Υπάρχει ανησυχία για το σχετικό «γενετικό φράγμα», αφού το φάρμακο δεν έχει ακόμη κυκλοφορήσει ευρέως.

III) Αναστολείς της ιϊκής πολυμεράσης (RdRp): Ribavirin και Taribavirin



Taribavirin (viramidine)

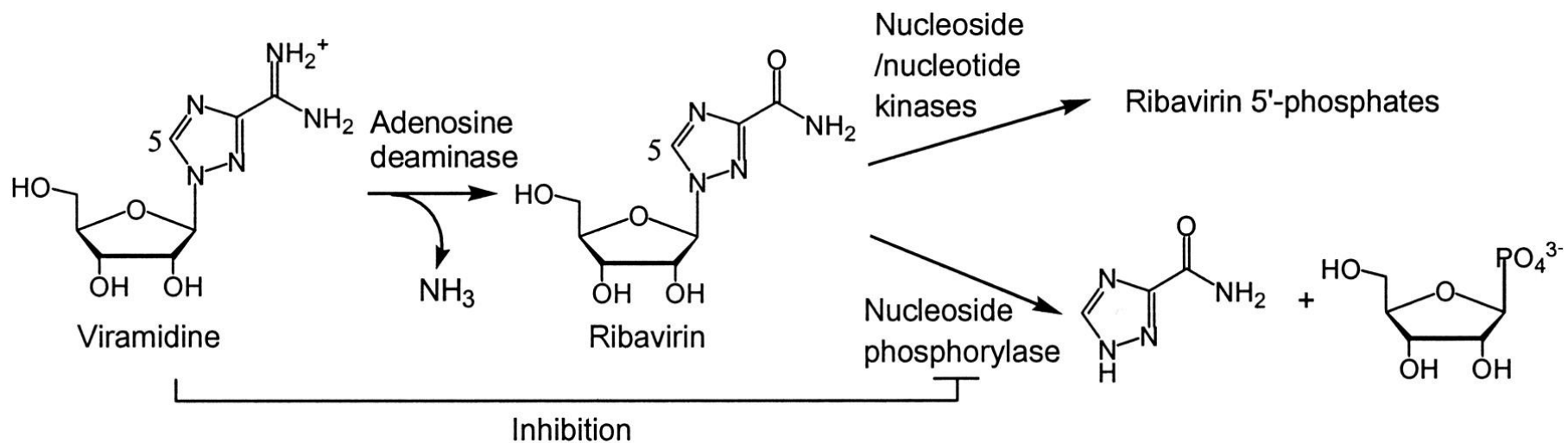
προφάρμακο, βιομετατρέπεται
από ηπατικά ένζυμα

ribavirin

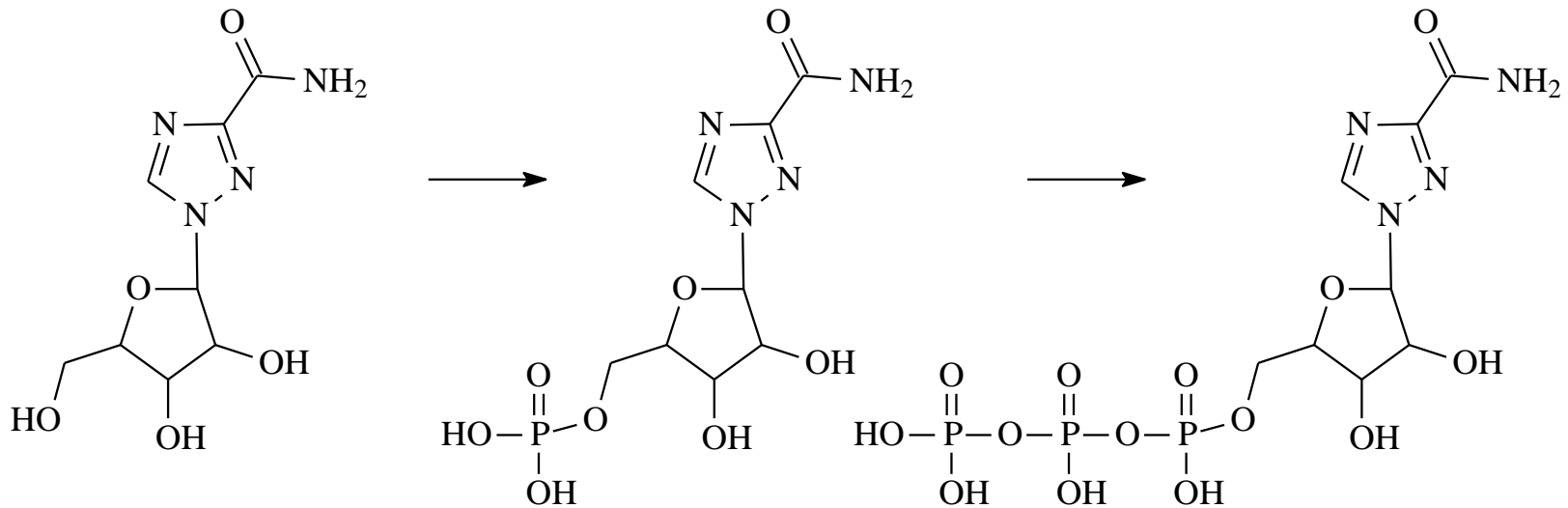
Αδρανής μεταβολίτης

Η ribavirin αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό RNA ιών: HCV, RSV, influenza

Καταπολεμά την ηπατίτιδα, αλλά είναι μέτρια αποτελεσματικό ως αντιγριπικό φάρμακο μόνο σε μεγάλη δοσολογία. Παρά τις σοβαρές παρενέργειες (αιμολυτική αναιμία, τερατογένεση) θεωρείται ως ένα τελευταίο εργαλείο για την αντιμετώπιση σπάνιων περιστατικών, όταν εμφανίζονται πολυφαρμακοάντοχα ιϊκά στελέχη.

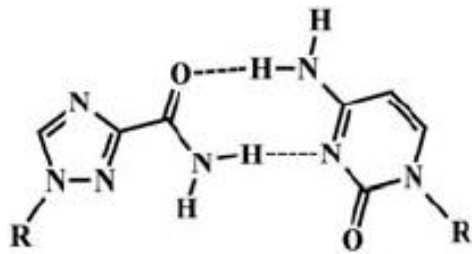


Η ribavirin καταβολίζεται προς την αντίστοιχη ετεροκυκλική βάση - με την επίδραση της PNP (purine nucleoside phosphorylase). Ο σταδιακός σχηματισμός της in vivo από το **Taribavirin** ελαττώνει τον καταβολισμό, και προσφέρει περισσότερο φάρμακο διαθέσιμο για φωσφορυλίωση.



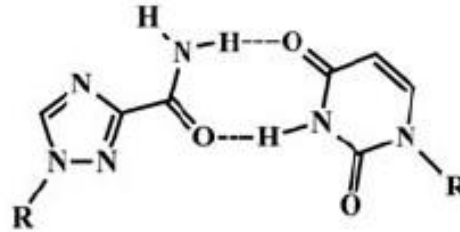
Η ribavirin υπόκειται σε μεταβολική ενεργοποίηση:

- Ως **RMP** αναστέλλει την αφυδρογονάση της μονοφωσφορικής ινοσίνης (IMPDH) και την βιοσύνθεση της GTP.
- Ως **RTP** αναστέλλει μέτρια την ιϊκή RNA πολυμεράση (αναγνωρίζεται από τα ιικά ένζυμα) όμως δεν φωσφορυλιώνεται επαρκώς από τα κυτταρικά ένζυμα.



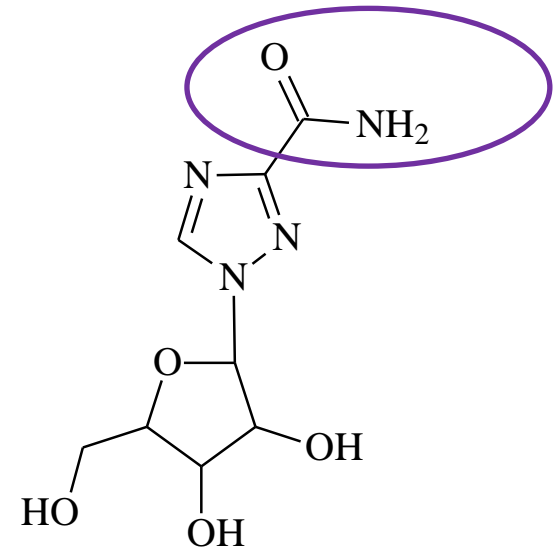
Ribavirin

Cytidine



Ribavirin

Uridine

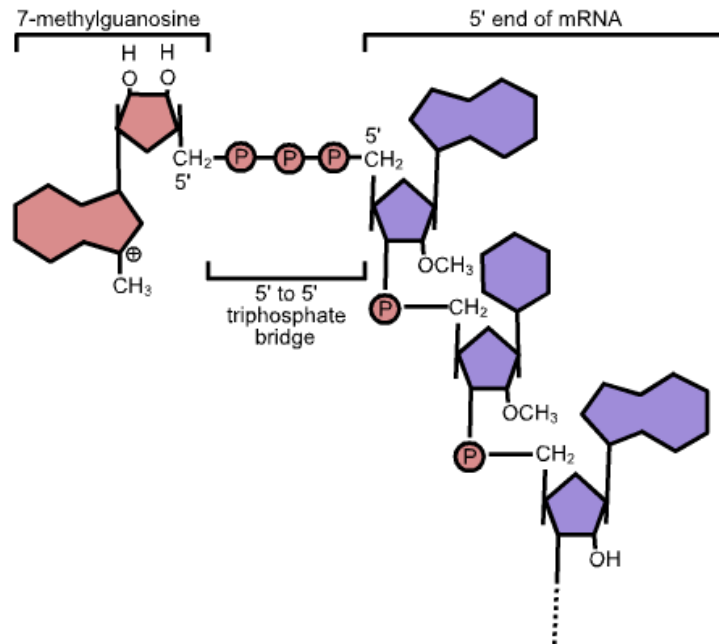


- Ως ribavirin triphosphate (RTP) ενσωματώνεται στο ιικό RNA και δρα ως μεταλλαξιογόνος παράγοντας: G-to-A και C-to-U μεταλλάξεις

Η παρουσία καρβοξαμιδίου την καθιστά δομικό ανάλογο τόσο της γουανοσίνης όσο και της αδενοσίνης, με αποτέλεσμα να σχηματίζει ζεύγος εξίσου καλά με ουρακίλη (ουριδίνη) ή με κυτοσίνη (κυτιδίνη): προκαλεί θανατηφόρες μεταλλάξεις κατά τον **RNA-εξαρτώμενο πολλαπλασιασμό των RNA ιών**.

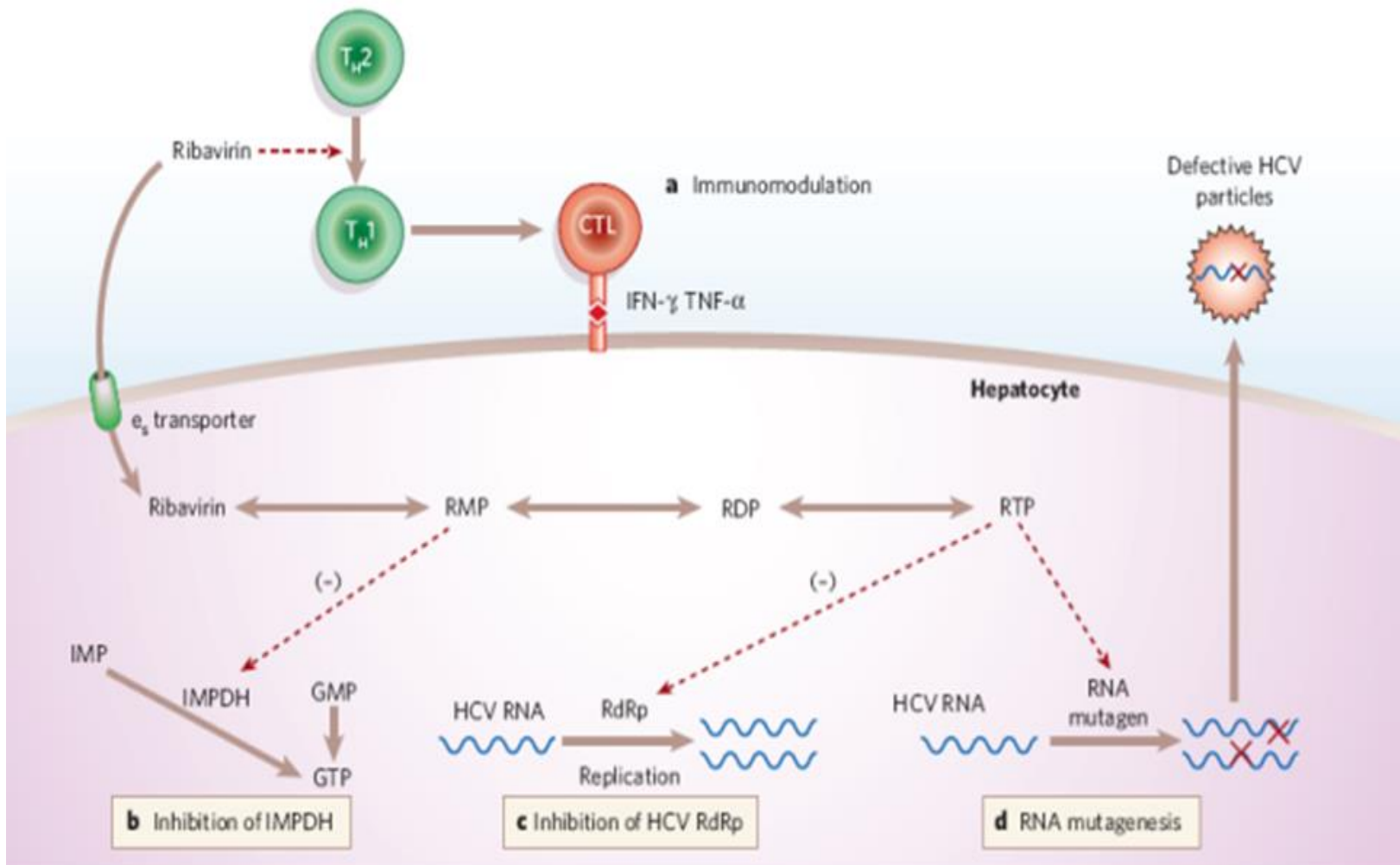
- Η Ribavirin ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα (immunomodulator)

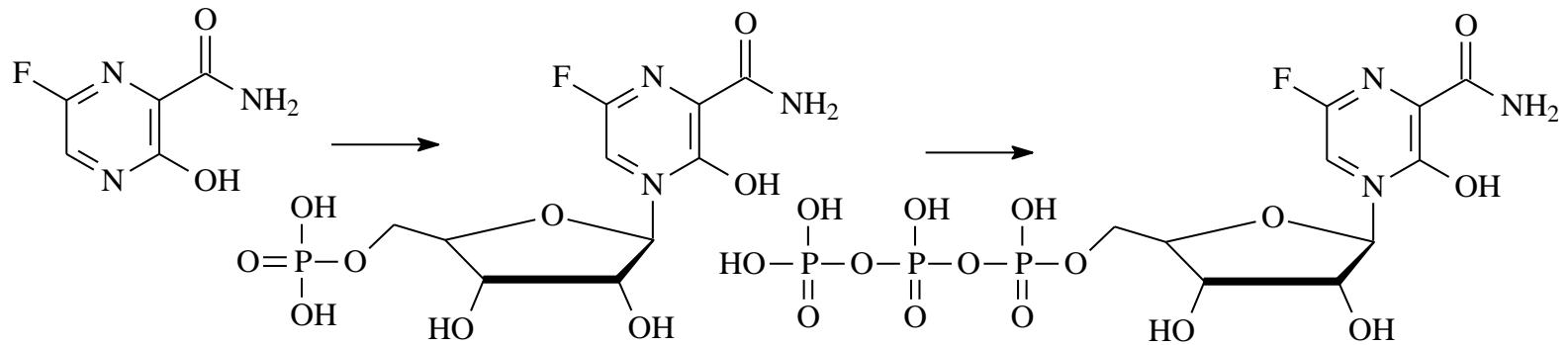
Ενισχύει τη δράση των Τ-λεμφοκυττάρων: προκαλεί την έκκριση κυτοκινών, όπως γ-ιντερφερόνης και tumor necrosis factor-α (TNF-α), πιθανόν επειδή σταθεροποιεί τμήματα δίκλωνου RNA



- Η Ribavirin διαταράσσει το RNA capping

Πιθανοί μηχανισμοί δράσης της ribavirin





Favipiravir, 6-φθορο-3-υδροξυ-2-πυραζινοκαρβοξαμίδιο: Αντίθετα από το ribavirin μεταβολίζεται προς favipiravir-TP, που αναστέλλει ΠΟΛΥ ΕΚΛΕΚΤΙΚΑ την νRdRp χωρίς να επηρεάζει τη βιοσύνθεση ανθρώπινων νουκλεϊνικών οξέων. **IC₅₀(influenza RdRp): 0.34 μM / IC₅₀(human DNAdDNap): 1000 μM.** Ενσωματώνεται στο νέο ιικό RNA με τη βοήθεια του ιικού ενζύμου στη θέση πουρίνης (όχι πυριμιδίνης) και δρα και ως μεταλλαξιόγonos παράγοντας (C-to-U και G-to-A transition mutations)

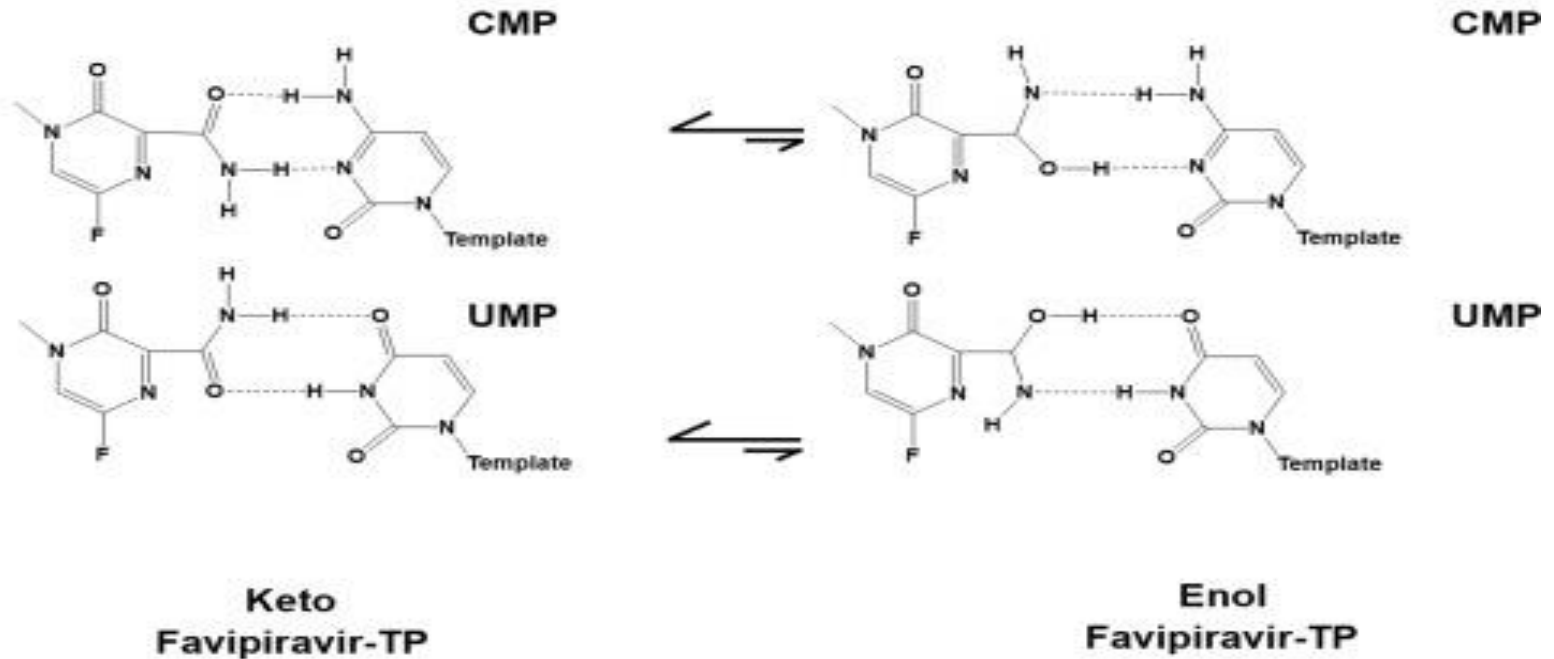
Στην Ιαπωνία χορηγείται έναντι της influenza – αυστηρώς περιορισμένη ενδονοσοκομειακή χρήση. Αποτελεσματικό in vivo + σε oseltamivir resistant στελέχη.

- **Μεγάλο θεραπευτικό εύρος** – μεγαλύτερο από όλα τα αντιγριπικά φάρμακα (EC_{50} : 10 μM, απουσία κυτταροτοξικότητας στα 6400 μM).
- **Μικρή πιθανότητα ανάπτυξης resistance mutations**
- **Η μεταλλαξιόγonos συνεισφορά είναι σημαντική** στην αντιική δράση.
- **Κατάλληλο για συνδυαστικά σχήματα** (oseltamivir+ favipiravir)

Ευρύ φάσμα αντιϊκής δράσης έναντι RNA ιών – μεταξύ αυτών και ο ιός Ebola και ο COVID.



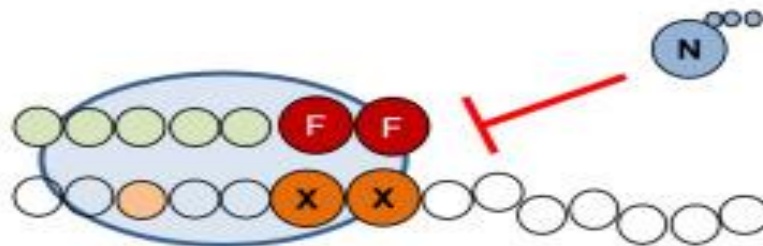
A



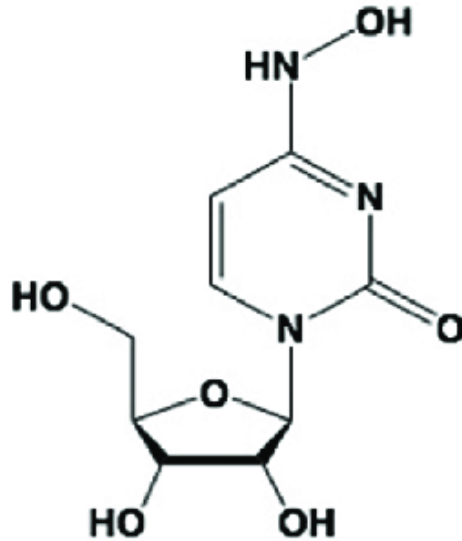
B

Η ενολική μορφή του φαρμάκου είναι πιο σταθερή στο υδατικό περιβάλλον και αναστέλλει εκλεκτικά το ιικό ένζυμο.

Inhibition



Phys. Chem. Chem. Phys.
22 (48) (2020) 28115–
28122



N4 -hydroxycytidine, EIDD-2801 next-generation influenza virus inhibitor candidate in early development.

Βιομετατρέπεται στον τριφωσφορικό εστέρα και ενσωματώνεται από την ιική πολυμεράση αντί για κυτιδίνη στο ιικό RNA. Λαμβάνοντας ταυτομερείς δομές ενεργεί ως κυτοσίνη, ή ως ουρακίλη, δηλαδή ως μεταλλαξιογόνος (C-to-U και G-to-A) παράγοντας.

Αναστέλλει αποτελεσματικά RNA ιούς, ενώ φαίνεται να μην προκαλεί εύκολα αντοχή.

Πιθανότητα αναγνώρισης από μιτοχονδριακές RNA πολυμεράσες του ξενιστή.