

Magdalena Kwiatek, Janusz Kocik, Michał Bartoszcze

SUBSTANCJE PRZECIWWIRUSOWE AKTYWNE DLA WIRUSA GRYPY. MOŻLIWOŚCI I PERSPEKTYWY ZASTOSOWANIA

THE SUBSTANCES ACTIVE AGAINST INFLUENZA VIRUS. POSSIBILITIES AND PROSPECTS OF APPLICATION

Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii, Warszawa

STRESZCZENIE

Grypa, a zwłaszcza grypa pandemiczna przedstawia wielkie niebezpieczeństwo dla zdrowia i życia człowieka. Z uwagi na dużą zmienność antygenową wirusa grypy istnieje konieczność ciągłego dostosowywania składu szczepionki do aktualnie występujących podtypów wirusa. Ponieważ od czasu pojawienia się nowej odmiany wirusa wyprodukowanie szczepionki trwa bardzo długo, jedyną ochroną ludzi mogą być leki przeciwwirusowe.

Dokonano przeglądu badań nad poszukiwaniem substancji przeciwwirusowych, aktywnych wobec wirusów grypy oraz omówiono mechanizm ich działania. Uwzględniono związki wykazujące aktywność na procesy adsorpcji wirusa, inhibitory hemaglutyniny i neuraminidazy, kanału protonowego M2, polimerazy, endonukleazy i transkryptazy, a ponadto hamujące kinazy białkowe i kaskadę sygnałową. Przedstawiono możliwości terapii oligonukleotydowej i aktywne substancje pochodzenia roślinnego. Zwrócono uwagę na przyszłościowe kierunki badań.

Słowa kluczowe: *substancje przeciwwirusowe, wirusy grypy, mechanizm działania*

ABSTRACT

Influenza, especially pandemic influenza, poses great threat to health and humans life of. Due to the antigenic drift and shift of the influenza virus, there is a constant requirement to accurately adjust contents of the vaccine to current subtype of the virus. As there is always a long period of time between the moment of detection of a new kind of influenza virus till a new vaccine is produced, the only protection for the people are antiviral drugs. Some examples of antiviral compounds that can be used in treatment in near future have been presented.

A review of the researches on the substances that are active against influenza viruses has been carried out and their mechanism of action was described. We have taken into account the chemical compounds that seem to be active in the process of virus adsorption; hemagglutinin and neuraminidase inhibitors; M2 ion channel blockers; polymerase, endonuclease, transcriptase, proteine kinase and signaling cascade inhibitors. The potential of oligonucleotide antiviral therapeutics and the substances that are extracted from different plants were presented. The future direction of research were shown.

Key words: *antiviral substances, influenza viruses, mechanism of action*

WSTĘP

Według CDC, każdego roku ok. 5-20% populacji w USA zapada na grype, z czego 200 000 osób podlega hospitalizacji a 36 000 umiera w wyniku następstw choroby. Szczepienia są podstawowym sposobem ochrony przed grypą, jednak ze względu na zmienność wirusa powodowaną mutacjami punktowymi (antygenowy dryft) oraz wymianą całych segmentów wirusowego RNA (antygenowy shift), przygotowanie skutecznej szczepionki w krótkim czasie jest bardzo trudne. W tej sytuacji kluczem do minimalizowania skutków nowej

pandemii mogą być substancje o działaniu przeciwwirusowym.

MOLEKULARNE CELE DLA SUBSTANCJI ANTYWIRUSOWYCH: LUDZKIE RECEPTORY, ADSORPCJA DO KOMÓRKI GOSPODARZA

Ponieważ wirus grypy inicjuje infekcję przyłączając się do końcowych reszt kwasu sialowego znajdujących się na receptorach na powierzchni komórki, leki posia-

dające aktywność sialidazy mogą usuwać receptory z komórek epitelialnych górnych dróg oddechowych i zapobiegać zakażeniu. DAS181-rekombinacyjne białko fuzyjne, zawierające katalityczne domeny sialidazy otrzymanej z *Actinomyces viscosus*, tnie wiązania $\alpha 2,6$ i $\alpha 2,3$ kwasu sialowego w receptorach rozpoznawanych przez wirusy grypy, wykazując aktywność wobec wirusów grypy A i B *in vivo* i *in vitro*. DAS181 chronił zwierzęta przed letalną infekcją grypy hamując replikację wirusa, w tym zjadliwego H5N1 (1), co wskazuje na duży potencjał DAS181 jako efektywnego środka przeciwwirusowego. Obecnie jest on poddawany testom klinicznym. CYSTUS052 jest bogatym w polifenole ekstraktem, sporządzonym z *Cistus incanu*. Rośliny z rodzaju *Cistus* są stosowane w medycynie ludowej jako remedium na różnego rodzaju dolegliwości. Gdy myszom Balb/c podano ten preparat w aerozolu, trzy razy dziennie przez okres pięciu dni, zaobserwowano obniżenie infekcyjności wirusa grypy A, przy czym preparat podany *per os* nie wykazywał takiego działania. CYSTUS 052 wykazał aktywność antywirusową, nie był toksyczny dla komórek hodowli i nie indukował oporności wirusa (2). Preparat obniżał miano wirusa w liniach komórkowych A549 i MDCK zakażonych prototypem ptasiej i ludzkiej grypy należącej do różnych podtypów (2). Preparat hamuje wnikanie wirusa do komórki poprzez bezpośrednie oddziaływanie na cząstki wirusa, posiada również zdolność interakcji z HA wirusa, blokując jej wiązanie do receptorów komórkowych. Należy podawać go odmięscowo, jak np. w aerozolu –bezpośrednio do dróg oddechowych.

INHIBITORY HEMAGLUTYNINY (HA)

HA wirusa grypy wiąże się z kwasem sialowym wiązaniem $\alpha 2,6$ do przedostatniej galaktozy glikanów obecnych na powierzchni komórki. HA jest trymerem złożonym z trzech podjednostek. Polipeptyd hemaglutyniny (HAO) jest cięty przez proteazę komórki gospodarza na HA1 i HA2, co jest ważne dla dalszej replikacji wirusa. Inhibitory enzymów TMPRSS2 (*transmembrane protease serine 2*) czy HAT (*human airway trypsin-like protease*) mogą okazać się skuteczne w hamowaniu replikacji wirusa. Stwierdzono, że aprotynina- inhibitor proteaz serynowo-treoninowych, była skuteczna *in vivo* przy podaniu razem z rimantadyną (3). Związek 180299 (*methyl-O-methyl-7-ketopodocarpate*) silnie hamował replikację wirusa, dzięki oddziaływaniu na fuzyjną funkcję HA (3). Opisano kilka nowych peptydów blokujących wnikanie wirusa do komórki, jak np. 20-aminkwasowy peptyd (otrzymany z czynnika wzrostu fibroblastów 4), blokujący wnikanie wirusa do komórki poprzez wiązanie się z HA. Wykazuje on aktywność przeciwko wirusowi grypy, zarówno w ho-

dowli komórkowej, jak i na myszach; obecnie znajduje się w fazie testów klinicznych.

W Bristol Myers Squibb odkryto nowy inhibitor fuzji wirusa grypy A, BMY-27709, który okazał się aktywny wobec wszystkich podtypów H1 i H2, nie wykazując natomiast aktywności wobec podtypu H3. Proces fuzji membran przy wnikaniu wirusa do komórki kontrolowany przez HA może być hamowany przez stachyflin- związek otrzymany z hodowli *Stachybotrys sp* (3); wykazano jego działanie w stosunku do podtypów H1 i H2 wirusa grypy A. Badano również pochodne stachyflinu i ich wpływ na replikację wirusa grypy. Preparat wpływa na pH endosomu, które ulega obniżeniu na skutek zmian konformacyjnych HA (3). Długołańcuchowe pentraksyny (PTX3) są 45-kDa białkami, które łączą się wiązaniami dwusiarczkowymi, tworząc multimetry o dużej masie cząsteczkowej. PTX3 wiążą C1q (podjednostka kompleksu enzymu C1, aktywującego układ dopełniacza w osoczu) umożliwiając rozpoznanie patogenów przez makrofagi i komórki dendrytyczne. Krótkie pentraksyny SAP (*serum amyloid P*), działają jako inhibitory β przeciw wirusom grypy, wiążąc się w sposób Ca^{2+} -zależny do bogatych w mannozę glikanów wirusowej HA, powodując inhibicję hemaglutynacji i wirusowej infekcyjności (4). PTX3 działa jako γ -inhibitor, dostarczając sialowanych ligandów imitujących strukturę komórkowych receptorów wykorzystywanych przez wirusa, blokując w ten sposób miejsce wiążące receptor HA. PTX3 oddziałuje na wirus grypy *in vivo* poprzez neutralizację infekcyjności przeciwdziałając przyłączaniu się wirusa (czy wnikania do komórki), jak również hamuje aktywność wirusowej NA, co może prowadzić do blokowania uwalniania się nowo powstałych cząstek wirusowych z powierzchni zakażonej komórki (4). Inkubacja wirusa grypy z innymi sialowanymi inhibitorami, takimi jak SP-A, gp340 (glikoprotein 340) czy mucyna, powoduje agregację cząstek wirusowych, co może prowadzić do hamowania rozwoju zakażenia i pobudzenia mechanizmu oczyszczania z cząstek wirusowych drogą fagocytozy oraz za pośrednictwem systemu śluzowo-rzęskowego. Ponieważ PTX3 wiąże się do komórek nabłonkowych zakażonych wirusem grypy, można przypuszczać, że ma on zdolność niszczenia ich jeszcze przed uwolnieniem się nowo zsyntetyzowanych wirionów. PTX3 działa jako opsonina, podnosząc zdolność makrofagów do fagocytozy (4). Podanie myszom ludzkich PTX3 prowadziło do obniżenia śmiertelności wśród zwierząt zakażonych wirusem grypy. Ostatnio doniesiono, że podtypy H1N1, H3N2 i typ B są jednak odporne na PTX3 (4).

Bodian i wsp. odkryli, że zmiana konformacji HA podczas fuzji membran może być hamowana przez benzochinony i hydrochinony, spośród których najwyższą aktywnością odznaczał się *tetr*-butyl hydrochinon

(TBHQ). Posługując się modelami strukturalnymi odkryto jeszcze bardziej aktywne inhibitory zmian konformacyjnych, takie jak: S19, C22 i S22 (3). Nowe glikopeptydowe związki z hydrofobowymi łańcuchami bocznymi - pochodne aglikoristocetyny wykazują aktywność przeciwwirusową, zależną od struktury związku. Badano ich antywirusową aktywność wobec szczepów: A/Puerto Rico/8/34 (A/H1N1); A/X-31 (A/H3N2) [A/Aichi/2/68 (H3N2) x A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)]; A/Hong Kong/7/87 (A/H3N2) i B/Hong Kong/5/72. Najaktywniejszym wobec wszystkich podtypów A/H1N1, A/H3N2 i typu B wirusa okazał się związek 8e (pochodna fenylbenzylu). Wykrycie aktywności pochodnych aglikoristocetyny wskazuje na nowe możliwości w poszukiwaniach substancji przeciwwirusowych (5).

Zaobserwowano, że N-podstawiona piperidyna, CL 61917, hamuje infekcyjność kilku podtypów H1, H2 i w mniejszym stopniu H3 wirusa grypy A, prawdopodobnie dzięki zdolności substancji do oddziaływania z fuzogeniczną funkcją wirusowej HA. Działanie to obserwowano w badaniach z użyciem CL 61917 lub jego bardziej aktywnego analogu CL 385319, wobec wirusa H1 (6). Jeszcze inny związek, CL 62554, strukturalnie niezwiązany z CL 61917, hamował również replikację wirusa grypy.

Związki fenolowe i polifenole stanowią jedną z najliczniejszych i najbardziej rozpowszechnionych grup związków pochodzenia roślinnego. Struktura naturalnych polifenoli jest różnorodna, poczynając od prostych związków, takich jak kwas fenolowy, aż po wysoce spolimeryzowane struktury. Galusan epigallokatechiny (EGCG) i digalusan teaflawiny, dwa polifenole obecne w zielonej herbacie, posiadają zdolność wiązania hemaglutyniny wirusa grypy blokując w ten sposób jego infekcyjność. Wykazano, że antywirusowy efekt galusanu epigallokatechiny i galusanu epikatechiny (ECG) jest wynikiem interakcji z HA, i zmianami właściwości fizycznych osłonki wirusa (7). Są również doniesienia o przeciwwirusowym działaniu bogatego w polifenole ekstraktu z *Geranium sanguineum* L., zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*.

INHIBITORY NEURAMINIDAZY (NA)

Neuraminidaza obecna na powierzchni osłonki wirusowej jest odpowiedzialna za uwalnianie się wirusa z powierzchni komórki. NA odgrywa istotną rolę w przemieszczaniu się wirusa w błonie śluzowej dróg oddechowych oraz w procesie wnikania do komórki gospodarza. Oseltamivir (Tamiflu)- etylo-estrowy prolekt GS4071, posiada aktywność przeciwwirusową przy podaniu doustnym na wszystkie podtypy wirusa grypy (łącznie z wywołującymi pandemię i ptasią grypę). U

pacjentów leczonych oseltamivirem stwierdzono jednak obecność opornych mutantów. Ponieważ dotychczas nie wykryto mutantów opornych zarówno na oseltamivir jak i zanamivir (relenza), należy oczekiwać, że leczenie jednym z nich powinno być skuteczne. Relenza i Tamiflu są jedynymi zatwierdzonymi z tej grupy (inhibitory NA) lekami na grypę. Analog DANA (kwas 2-deoksy-N-acetylneuraminidowy) posiada silne powinowactwo do wirusowej NA, hamując aktywność enzymu (3).

Zsyntetyzowano wiele analogów DANA; 4-amino-DANA i 4-guanidyno-DANA (zanamivir), które posiadają silne działanie przeciwwirusowe wobec wirusa grypy A (N2). Zanamivir jest związkiem, który hamuje replikację wirusa grypy *in vitro* i *in vivo* (3). Ponieważ zanamivir musi być aplikowany drogą inhalacyjną, wskazane jest poszukiwanie jego pochodnych, aktywnych także przy podaniu per os lub drogą dożylną. Testowano również multimerowe i chemicznie modyfikowane formy zanamiviru - inhibitory NA drugiej generacji. Posiadały one zwiększoną aktywność *in vitro*, i były lepiej przyswajalne po podaniu doustnym. Dimery, których grupy łączące miały 14-18 atomów były od 100 do 1000 razy bardziej aktywne *in vitro* od monomeru, a okres ich półtrwania *in vivo* był znacznie przedłużony. Podawane donosowo, dimerowe formy związku były obecne w płucach szczurów ponad tydzień, a pojedyncza dawka preparatu podana 7 dni przed zakażeniem chroniła myszy przed śmiercią (8). Ponieważ zanamivir wykazuje szeroki zakres działania na wirusy grypy A, a pojawiająca się oporność na lek jest rzadka, opracowanie dożylnej formy podawania leku byłoby niezwykle pożądane dla skutecznego leczenia ostrej grypy. Iniekcje dwa razy dziennie, podane 4 godziny przed kontaktem z wirusem H1N1, znacznie obniżały gorączkę, łagodziły proces chorobowy i ograniczały rozprzestrzenianie się wirusa u ochotników. Obecnie trwa I faza testów klinicznych doustnego oseltamiviru i dożylnej formy zanamiviru (8).

Peramivir i AB-675 są dobrymi kandydatami do grupy leków przeciw grypie, zwłaszcza w przypadku pojawiania się mutantów opornych na oseltamivir i zanamivir. Jak wykazano eksperymentalnie Peramivir był aktywny w stosunku do szczepów wirusa grypy opornych na zanamivir i oseltamivir (8). Peramivir[(1S,2S,3R,4R)-3-[(1S)-(acetamido)-2-ethylbutyl]-4-(diaminomethylidene-amino)-2-hydroxy-cyclopentane-1-carboxylic acid] jest nowym, selektywnym inhibitorem neuraminidazy, posiadającym trzy grupy chemiczne oddziałujące z aktywnym miejscem NA, dzięki czemu powstaje silne wiązanie dysocjujące w wolnym tempie, co daje mu przewagę nad innymi lekami pozwalając na rzadsze podawanie leku. Testy przedkliniczne wykazały, że domięśniowa iniekcja peramiviru hamowała rozwój zakażenia wirusami A i

B, łącznie z wysoce patogennym wirusem grypy H5N1, *in vivo* i *in vitro*. Ostatnie badania wykazały, że peramivir podany myszom domięśniowo, chronił je przed śmiertelną dawką wirusa H5N1 i całkowicie eliminował wirusa z narządów wewnętrznych (9). Testy kliniczne wykazały 22 godzinny okres półtrwania leku w osoczu i jego dobrą tolerancję (8). Obecnie peramivir znajduje się w II fazie testów, oceniających jego przydatność przy jednorazowej iniekcji domięśniowej przeciw grypie sezonowej (9).

A-315675 (ABT-675) jest związkiem powstałym na bazie piroolidyny, hamującym neuraminidazę i replikację wirusów grypy A i B, zachęcającym kandydatem do dalszych badań (10). R-118958 jest preparatem, stosowanym zarówno w celu leczenia, jak i profilaktyki grypy, wykazującym aktywność już po podaniu pojedynczej dawki. Po badaniach *in vitro* preparat przeszedł do I fazy testów klinicznych (w 2004 roku). Pro-lek R-125489, wykazuje hamujące działanie na neuraminidazę wirusa grypy, porównywalne do zanamiviru. Efektywnie hamował replikację wirusa grypy A i B w komórkach MDCK i był 1,6-6,4 razy silniejszy od zanamiviru. 90% myszy, którym podano pojedynczą dawkę R-118958 (0.4 Amol/kg) do nosa następnego dnia po zakażeniu (50 pfu), przeżyło do dwudziestego dnia obserwacji, podczas gdy myszy, którym podano zanamivir (4.0 Amol/kg) przeżyły tylko w 80,5%. Co więcej, 80-100% myszy, którym podano pojedynczą dawkę R-118958 (0.5 Amol/kg) 2 i 3 dnia po zakażeniu przeżyło, podczas gdy wszystkie zwierzęta leczone zanamivirem padły. Podobne rezultaty, świadczące o wysokiej skuteczności terapeutycznej preparatu obserwowano w ilościowych testach mianowania wirusa. R-118958 jest szybko metabolizowany w płucach do aktywnej formy R-125489, która utrzymuje się przez dłuższy czas, a prawie wszystkie metabolity są usuwane z moczem. Inhalacja raz w tygodniu może być skuteczna w zapobieganiu grypie, nawet wtedy, gdy sezon grypowy już się rozpoczął. Ponieważ efekt kuracji jest długotrwały, może przyczynić się on do ograniczenia rozprzestrzeniania się wirusa grypie wśród ludzi. Tych zalet nie posiadają wcześniej wynalezione leki, takie jak Relenza, Tamiflu (inhibitory neuraminidazy), Symmetrel i Flumadine (inhibitory M2).

ATA (aurintricarboxylic acid) jest kolejnym silnym inhibitorem NA, który hamował aktywność NA dzikiego szczepu wirusa grypy, jak i mutantu H274Y, opornego na oseltamivir. Na modelach molekularnych można zaobserwować, że ATA wiąże się do NA w tym samym miejscu, w którym NA wiąże substrat. Związek ten może być dobrym wzorcem do projektowania nowej klasy inhibitorów NA (11).

INHIBITORY WIRUSOWEGO KANAŁU PROTONOWEGO M2

Kanał protonowy M2 składa się z czterech podjednostek. M2 pośredniczy w zakwaszaniu wnętrza endosomu, w którym znajduje się wirus, co pociąga za sobą zmiany konformacyjne w rejonie pętli HA, prowadzące do fuzji membran wirusa i endosomu. Dobrze znane leki blokujące kanał M2- amantadyna (amantadine; Symmetrel) i rimantadyna (rimantadine; Flumadine) działają tylko na wirusy grypy A. Oporność wirusów na adamantany przysparza wielu problemów terapeutycznych. Zsyntetyzowano nowe pochodne obu tych leków, które wykazują wyższy stopień aktywności w stosunku do wirusa grypy A (12).

INHIBITORY POLIMERAZY, ENDONUKLEAZY I TRANSKRYPTAZY

Transkrypcja i replikacja wirusowego vRNA są katalizowane przez RNA- zależną polimerazę RNA. Te dwa etapy stanowią dobry cel dla działania leków antywirusowych. Trójfosforan 2'-fluorodGuo jest inhibitorem transkryptazy wirusa grypy, działającym ok. tygodnia na komórkową polimerazę RNA (3). T-705 (6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinecarbox-amide) jest silnym inhibitorem wirusów grypy A, B i C (13). Podany doustnie obniżał poziom śmiertelności u myszy. T-705RTP hamował aktywność polimerazy RNA wirusa grypy w sposób konkurencyjny z GTP. W przeciwieństwie do rybawiryny, T-705 nie wykazywał działania hamującego na syntezę DNA i RNA komórki (8).

L-2 jest związkiem z serii 4-podstawionych 2,4-dioxo-kwasu butanolowego. Testowany na myszach z infekcją górnych dróg oddechowych hamował wirusową endonukleazę. Nowy antywirusowy środek, wyizolowany z hodowli *Delitschia confertaspora*, wpływał natomiast na funkcję *cap*-zależnej endonukleazy (3). Flutimid (flutimide), 2,6-diketopiperazyna, o profilu porównywalnym do innych inhibitorów endonukleazy, hamował również replikację wirusa w hodowli komórkowej. Flutimid jest pierwszym opisanym naturalnym produktem selektywnie hamującym transkryptazę wirusa grypy, podobnym do inhibitorów z grupy kwasu dioxobutanolowego. RNA - zależna polimeraza RNA wirusa grypy A, jest heterotrimerowym kompleksem zbudowanym z podjednostek PB1, PB2 i PA, który katalizuje transkrypcję wirusowego RNA oraz jego replikację w jądrze zakażonej komórki. Ostatnio odkryto kilka białek komórkowych łączących się z kompleksem polimerazy, bądź z jej podjednostkami. Jednym z nich jest białko szoku cieplnego Hsp90 (*heat shock protein 90*), które łączy się z podjednostkami PB1 i PB2

(14). Inhibitory Hsp90- GA (analog geldanamycyny) i 17-AAG (17-allylamino-17-demetoxygeldanamycyna) opóźniają wzrost wirusa w hodowli komórkowej poprzez skrócenie czasu półtrwania PB1 i PB2 i hamowanie jądrowego importu PB1 i PA, co prowadzi do redukcji efektywnego montażu wirusowego RNP. Stosowanie inhibitorów Hsp90 może być nową strategią antywirusową z małym prawdopodobieństwem nabywania przez wirusy cech oporności (14).

Rybawirina (ribavirin)- guanozynowy analog, działa zarówno pośrednio, przez obniżanie wewnątrzkomórkowego poziomu GTP (hamuje on działanie dehydrogenazy 5'-monofosforanu), jak i bezpośrednio, zaburzając transkrypcję i replikację genomu wirusa. Rybawirina jest w mniejszym stopniu aktywna przeciwko wirusowi grypy, niż adamantany, czy inhibitory NA (8). Wcześniejsze badania wskazywały, że rybawirina była aktywna przeciw wirusowi grypy A i B w hodowli komórkowej. Późniejsze jednak testy kliniczne nad oceną jej efektywności u pacjentów z grypą dały niejednoznaczne wyniki (15). Viramidin (viramidine)- pro-lek rybawiryny, ma podobną aktywność przeciw sezonowej grypie H5N1, lecz jest mniej toksyczny od poprzedniego. Wysoki poziom efektywności przy śmiertelnych infekcjach wirusem H1N1 wykazano w testach na myszach, którym podano ten związek razem z wodą do picia (16).

ODDZIAŁYWANIE NA MONTAŻ I DOJRZEWANIE WIRUSA

W późniejszym etapie wirusowej infekcji, vRNPs są transportowane z jądra do błony komórkowej, gdzie następuje montaż potomnych cząstek wirusowych. Leki zaburzające błony „tratw lipidowych” mogą zakłócać proces montażu wirionów. Nowa, aerozolowa forma leków obniżających poziom cholesterolu we krwi - statyny, posiada szerokie spektrum aktywności wobec różnych typów wirusów grypy, porównywalne do Tamiflu. Statyny wykazują swoją aktywność nawet przy podaniu ich 48h po zakażeniu. Redukują miano wirusa oraz chronią tkankę płucną przed uszkodzeniami m.in. poprzez obniżenie poziomu ekspresji cytokin (15, 17).

INHIBITORY KINAZ BIAŁKOWYCH I KASKADY SYGNAŁOWEJ

Replikacja wirusa jest powiązana z aktywnością kinaz ścieżki sygnałowej, takich jak kinaza białkowa C (PKC) czy NF- κ B (*nuclear factor kappa B*). Zakażenie wirusem grypy prowadzi do aktywacji kaskady sygnałowej Raf/MEK/ERK, której inhibicja za pomocą specyficznych związków (U0126) powo-

duje zatrzymanie vRNPs w jądrze komórkowym, jak również upośledza funkcje białka NEP (*nuclear export protein*) (3). Związki takie jak bisindolymaleimid I, calphostin C i Gö6976 hamują replikację wirusa grypy. Replikację wirusa hamuje również rottlerin, inhibitor PKC (18). Przeniknięcie wirusa do wnętrza komórki wymaga aktywności PKC, która prawdopodobnie stymuluje wiązanie wirusa do receptorów komórkowych (18). Resveratrol jest polifenolem o właściwościach antyoksydacyjnych, występującym w czerwonym winie. Hamuje on replikację wirusa *in vitro*, zmniejsza śmiertelność na skutek powikłań związanych z infekcją oraz obniża miano wirusa grypy w płucach zakażonych myszy. Preparat blokuje translokację kompleksu wirusowej rybonukleoproteiny z jądra do cytoplazmy, podczas późnej fazy infekcji, prawdopodobnie przez oddziaływanie na kinazy białkowe (19) Resveratrol ma również wpływ na TLR (*Toll-like receptors*), komórki ze ścieżki sygnałowej i zwiększenie ekspresji cytokin i chemokinin, biorących udział w odpowiedzi immunologicznej organizmu (17).

ZWIĘKSZANIE STĘŻENIA Na^+ - OTWIERACZE KANAŁU SODOWEGO

Bardzo duże zainteresowanie wzbudziło odkrycie, że inhibitory kanału i jego otwieracze przeciwdziałają replikacji wirusa. SDZ-201106 - otwieracz kanału sodowego, może obniżyć o 85% miano wirusa A/WSN/33 a wirusa B o 72%, dzięki zwiększeniu wewnątrzkomórkowego poziomu Na^+ spowodowane otwarciem kanału. Inhibitory pomp Na^+/K^+ /ATPazy, quabain i lanatozyd C, mogą również hamować replikację wirusa poprzez zwiększenia wewnątrzkomórkowego stężenia Na^+ i K^+ dzięki czemu dochodzi do hamowania replikacji wirusa (18).

ANTYWIRUSOWA TERAPIA OLIGONUKLEOTYDOWA

Antysensowne oligonukleotydy- (ASOs) są jednociowymi deoksyrybonukleotydowymi oligomerami (~20 nukleotydów), komplementarnymi do transkrypty mRNA. Specyficzne oddziaływanie między parami zasad ASO i transkrypty, powoduje degradację RNA przy udziale RNAzy H i w konsekwencji zmniejszenie produkcji białek. ASOs zmodyfikowane chemicznie może także powodować inhibicję translacji bez degradacji mRNA. Opracowano odczynniki trzeciej generacji, antysensowne oligomery morfolino PMOs (*phosphorodiamidate morpholino oligomers*), w których pierścień rybozy szkieletu nukleotydowego zastąpiono pierścieniem morfolino. PMOs mają większe powinowactwo

do rozpoznawanej sekwencji niż pozostałe ASOs, lecz nie powodują degradacji mRNA przez RNAzę H. Kilka ASO poddaje się obecnie badaniom klinicznym, pod kątem oceny ich aktywności w leczeniu zakażeń wirusowych (20).

Koniugaty peptydów PMOs (P-PMOs) zostały zaprojektowane tak, aby wiązały się do rejonu kodonu start AUG czterech genów (PA, PB1, PB2 i NP). Dodatkowo, rozpoznają one cztery końcowe rejony genu NP, co zaburza interakcję RNA/RNA, niezbędną do syntezy RNA. Sześć z ośmiu P-PMOs skutecznie hamowało produkcję wirusa H1N1 w komórkach Vero. P-PMOs rozpoznające kodon start PB1 lub też obszar terminacji NP podane przed zakażeniem, skutecznie hamowały replikację wirusa grypy H5N1 w komórkach MDCK (20). Wykazano antywirusową aktywność S-ONs (*phosphorothioate oligonucleotides*) otrzymanych z 3' i 5' końca wirusowego segmentu PB2, co wskazuje na to, że koniec 5' PB2 może być w przyszłości używany do tworzenia leków antywirusowych nowego typu (21).

Antysensowne (DNA) oligomery oraz krótkie, dwuniciowe cząsteczki- siRNA (*small interfering RNA*), ukierunkowane na mRNA grypy, okazały się skuteczne w testach na modelach mysich i ptasich zakażonych różnymi rodzajami wirusa grypy (8). siRNA powodują wyciszenie ekspresji genów o homologicznej sekwencji poprzez degradację komplementarnego mRNA. siRNA zaprojektowane przeciw konserwatywnym sekwencjom nukleoprotein grypy A, polimerazie czy genom matryksowym, są zdolne powstrzymać replikację wirusa grypy, co wykazano w zakażonych hodowlach komórkowych oraz w płucach mysich (15). Aktywność takich związków powiązana jest z degradacją specyficznego wirusowego mRNA szerokiego spektrum wirusów ludzkiej i ptasiej grypy. Główną zaletą tego typu leczenia jest to, że gdy znana jest sekwencja określonego genu, syntezę siRNA można przeprowadzić w bardzo krótkim czasie i niewielkim kosztem. Jednak niektóre z siRNA mogą powodować inhibicję genów gospodarza (15). Mysiom podawano do płuc siRNA komplementarne do NP i PA wirusa grypy A, oraz dożylnie shRNA (*small hairpin*) komplementarne do NP i M2 w kompleksie z polimerem kationowym (PEI). W obu przypadkach, siRNA i shRNA, obserwowano redukcję miana wirusa w płucach. shRNAs przeciw NP i M2 również zwiększały odsetek przeżywalności myszy zakażonych wirusem H1N1 i H5N. Potwierdzono, że siRNA zaprojektowane przeciw PA i NP redukuje namnażanie się wirusa grypy A w płucach myszy oraz zwiększa ich przeżywalność. Połączona terapia siRNA komplementarnego do NP i PA chroniła w 100% zwierzęta przed śmiercią. Ten sam efekt obserwowano przy zakażeniu różnymi typami wirusów grypy, łącznie z H5N1 (20).

INNE ZWIĄZKI I ICH AKTYWNOŚĆ

Chlorochina zmienia endosomalne pH, osłabiając proces uwolnienia wirusa grypy do cytozolu. Różne podtypy wirus grypy reagują odmiennie na chlorochinę, tak np. H3N2 i H1N1 są bardziej wrażliwe w porównaniu do niektórych wirusów H5 (17).

Białka surfaktantowe D (SP-D) – kolektyny obecne w płynach dróg oddechowych, są niezwykle ważne podczas infekcji wirusowej. Surfaktanty A (SP-A) i D pośredniczą w wielu procesach uruchamianych przeciwko wirusowi grypy, takich jak: hemaglutynacja, neutralizacja i agregacja wirusa, jak również opsonizacja w interakcji z neutrofilami (4). SP-D należą do grupy inhibitorów β , wiążąc się w sposób Ca^{2+} zależny przez domenę lektyny do oligosacharydów wirusowych HA i NA. SP-A w sposób Ca^{2+} niezależny wiąże wirusową hemaglutyninę do reszt kwasu siałowego (4).

Kromoglikan dwusodowy (DSCG) jest lekiem powszechnie stosowanym przy astmie oraz alergicznym nieżycie nosa. Niedawno odkryto, że DSCG wykazuje właściwości przeciwwirusowe wobec wirusów ludzkiej grypy w badaniach *in vivo*, nie mając przy tym toksycznego działania u żadnej z badanych grup zwierząt (22).

PREPARATY ROŚLINNE

Zielona herbata jest produkowana z liści wiecznie zielonej rośliny *Camellia sinensis*, której głównym składnikiem są polifenole- katechiny, a wśród nich: epikatechina (EC), epigallokatechina (EGC), galusan epikatechiny (ECG) i galusan epigallokatechiny (EGCG). EGCG wpływa hamująco na infekcyjność wirusów w hodowlach komórkowych MDCK, powodując ich aglutynację i zapobiegając ich adsorpcji. Ekstrakt z herbaty hamował również zakwaszenie w endosomach czy lizosomach, co prowadziło do hamowania namnażania się wirusa. EGCG i ECG są silnymi inhibitorami replikacji wirusów grypy, łącznie z A/H1N1, A/H3N2 i B, przy czym EGCG okazał się najbardziej efektywny spośród badanych związków. Katechiny prawdopodobnie wpływają na zmianę konformacji HA lub też wchodzi z nią w interakcję (7). Krzewy *Mahonia* są rodzajem chińskiej rośliny, do którego należą *Mahonia bealei* (Fort) oraz *M. fortunei*. Z roślin tych wyekstrahowano wiele alkaloidów o właściwościach przeciwwirusowych, między innymi: oksykantynę, berbaminę, kolumbaminę, izotertrandrynę, jatroryzynę, palmatynę i berberię. Doświadczenia *in vitro* dowiodły, że właściwości antywirusowe *M. bealei* związane są z alkaloidami (23). Jeden z obecnie stosowanych leków przeciwgrypowych, Tamiflu, otrzymano z chińskiego

anyżu gwiazdzistego (*Iliciumverum*), który zawiera po-
ważne ilości kwasu szikimowego, będącego chemiczną
bazą dla Tamiflu. Mikstura anyżu musiała przejść 10
farmakologicznych modyfikacji, zanim powstał osta-
tecznie lek przeciwwirusowy. Zmodyfikowany kwas
szikimowy oddziałuje na strukturę wirusa, zapobiegając
jego replikacji, zarówno w stosunku do wirusa grypy A,
jak i B (24). *Andrographis paniculata* jest używany w
tradycyjnej medycynie chińskiej pod nazwą Kan Jang,
zmniejsza powikłania pogrypowe i skraca rekonwa-
lescencję chorego. Bez czarny (*Sambucus nigr*), jako
ekstrakt sambukol, był skutecznie stosowany u ludzi
żyjących w kibucu w Chinach podczas epidemii grypy
B w 1993 (24). Osoby leczone czarnym bzem znacz-
nie szybciej wracały do zdrowia, co było wynikiem
zwiększenia poziomu interleukin i czynnika nekrozy
nowotworów (TFN). Echinacea (*Echinacea angu-
stifolia*, *Echinacea pallida* i *Echinacea purpurea*) są
często używane w przypadku zwykłych przeziębień.
Echinacea jest skuteczna we wczesnych etapach infekcji
grypowych, lecz nie ma działania chroniącego przed
zakażeniem. Działanie jej związane jest z aktywnością
przeciwzapalną i stymulacją systemu immunologicz-
nego organizmu (24). Hydroxytyrosol (HT) jest nisko-
cząsteczkowym związkem fenolowym występującym
w liściach i owocach oliwek (*Olea eurolaea*), jako
metabolit oleuropeiny (Ole), będącym głównym poli-
fenolowym komponentem tej rośliny. Ekstrakt z oliwek
wykazał przeciwwirusowe właściwości w stosunku
do podtypów grypy H1N1, H3N2, H5N1 i H9N2 oraz
NDV, przy czym podanie HT do hodowli komórkowej
MDCK przed infekcją nie miało wpływu na namnażanie
się wirusa H9N2. Wirus inaktywowany HT posiadał
niezmienioną aktywność HA i NA. Przy użyciu mi-
kroskopu elektronowego wykazano, że większa część
struktur wirusa, nie tylko na powierzchni, po kontakcie
z HT była zmieniona. Obserwacje te sugerują, że HT
wpływał na zmianę struktury wirusa H9N2 (25). Anty-
wirusowe właściwości przeciwko grypie A wykazano
w 20 ekstraktach roślin otrzymanych z *A. filicinus*, *A.
rivularis*, *Verbascum thapsus*, *Allium oreoprasum*, *A.
strigilosa* i *B. ciliate*. Ekstrakty z *A. rivularis* i *B. ciliate*
były najaktywniejsze przeciwko wirusowi grypy A (26).
Badania fitochemiczne *A. rivularis* wykazały obecność
w roślinie flawonoidów, terpenoidów i bergeninów.
Bergenia ciliate zawiera polifenole, które wykazują
właściwości antywirusowe. Niektóre rośliny używane w
tradycyjnej medycynie nepalskiej mogą być potencjal-
nymi lekami przeciwwirusowymi (26). Antygrypowe
właściwości i brak toksyczności wykazywały: *Aspa-
ragus racemosus*, *Bergenia ligulata*, *Nerium indicum*,
Nyctanthes arbortristis, *Salvia coccinia*, *Scindapsus
officinalis*, przy czym najaktywniejszym z nich okazał
się ekstrakt z *Nerium indicum*.

Wiele grzybów stosowano w celach leczniczych
przez tysiące lat, stymulowały one system immu-
nologiczny, posiadały właściwości antybakteryjne
i przeciwwirusowe. Grzyby zawierają polifenole stymu-
lujące aktywność komórek T, interleukinę 1 i komórek
NK (*natural killers*) (24). Grzyby shitake (*Leninula
edodes* (Berk)), reishi (*Ganoderma lucidum*) i maitake
(*Grifola frondosa*) są najbardziej rozpowszechnione
i łatwo dostępne.

WNIOSKI

Obecnie stosowane licencjonowane leki na grype
były stworzone z tą myślą, aby minimalizować skutki
sezonowych zachorowań na grype. Zakażenia ludzi
wirusami H5N1 i AH1N1 zmuszają nas do nowego
spojrzenia na walkę z tą groźną chorobą. Nowe, lepsze
preparaty są niezbędne, aby stawić czoła pandemii
grypy oraz zredukować skutki sezonowych infekcji.
Prace nad odkryciem nowych leków antywirusowych
powinny zostać zintensyfikowane, wykorzystując za-
równo dobrze już poznane molekularne możliwości
hamowania infekcji, jak i zupełnie nowe, pojawiające
się w miarę poznania mechanizmów zakażeń na pozio-
mie subkomórkowym. Lepsze zrozumienie biologii
wirusa grypy może otworzyć nowe drogi dla opraco-
wania strategii poszukiwania efektywnych środków
antywirusowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Leysen P, Clercq E, Neyts J. Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. *Antivir Res* 2008; 78: 9–25.
2. Ehrhardt C, Hrincius ER, Korte V, i in. A polyphenol rich plant extract, CYSTUS052, exerts anti influenza virus activity in cell culture without toxic side effects or the tendency to induce viral resistance. *Antivir Res* 2007; 76: 38–47.
3. Hsieh HP, Hsu JT.-A. Strategies of Development of Antiviral Agents Directed Against Influenza Virus Replication. *Curr Pharm Des* 2007; 13: 3531–3542.
4. Reading PC, Bozza S, Gilbertson B, i in. Antiviral Activity of the Long Chain Pentraxin PTX3 against Influenza Viruses. *J Immunol* 2008; 180: 3391–3398.
5. Naesens L, Vanderlinden E, Ro E, i in. Anti-influenza virus activity and structure–activity relationship of aglycoristocetin derivatives with cyclobutenedione carrying hydrophobic chains. *Antivir Res* 2009; 82: 89–94.
6. Plotch S, O'Hara B, Morin J, Palant O, i in. Inhibition of Influenza A Virus Replication by Compounds Interfering with the Fusogenic Function of the Viral Hemagglutinin. *J Vir* 1999; 73 (1): 140–151.

7. Song JM, Lee KH, Seong BL. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antivir Res* 2005; 68: 66–74.
8. Beigel J, Bray M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antivir Res* 2008; 78: 91–102.
9. Ying Li, Xinzhong Zhang, Xiaoying Wanget, i in. Quantification of peramivir (a novel anti-influenza drug) in human plasma by hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chrom B* 2009; 877: 933–938.
10. Abed Y, Nehm'e B, Baz M, i in. Activity of the neuraminidase inhibitor A-315675 against oseltamivir-resistant influenza neuraminidases of N1 and N2 subtypes. *Antivir Res* 2008; 77: 163–166.
11. Hung H-C, Tseng C-P, Yang J-M, i in. Aurintricarboxylic acid inhibits influenza virus neuraminidase. *Antivir Res* 2009; 81: 123–131.
12. De Clercq E. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5(12): 1015–25.
13. De Clercq E, Neyts J. Avian influenza A (H5N1) infection: targets and strategies for chemotherapeutic intervention. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28 (6): 280–285.
14. Naito T, Momose F, Kawaguchi A, i in. Involvement of Hsp90 in assembly and nuclear import of influenza virus RNA polymerase subunits. *J Virol* 2007; 81: 1339–1349.
15. Sugrue RJ, Tan B-H, Yeo D SY, i in. Antiviral Drugs for the Control of Pandemic Influenza Virus. *Ann Acad Med Singapore* 2008; 37: 518–24.
16. Gish R. Treating HCV with ribavirin analogues and ribavirin-like molecules. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 8–13.
17. Fedson DS. Confronting an influenza pandemic with inexpensive generic agents: can it be done? *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 571–76.
18. Hoffmann HH, Palese P, Shaw ML. Modulation of influenza virus replication by alteration of sodium ion transport and protein kinase C activity. *Antivir Res* 2008; 80: 124–134.
19. Palamara AT, Nencioni L, Aquilano K, i in. Inhibition of Influenza A Virus Replication by Resveratrol. *J Infect Dis* 2005; 191:1719–29.
20. Spurgers KB, Sharkey CM, Warfield KL, i in. Oligonucleotide antiviral therapeutics: Antisense and RNA interference for highly pathogenic RNA viruses. *Antivir Res* 2008; 78: 26–36.
21. Giannecchini S, Clausi V, Nosi D, i in. Oligonucleotides derived from the packaging signal at the 5' end of the viral PB2 segment specifically inhibit influenza virus in vitro. *Arch Virol* 2009; 154:821–832.
22. Tsujiiia E, Kazuya I.-P, Hidarib J ET, i in. Anti-influenza virus activity of disodium cromoglycate. *International Congress Series* 2004; 1263: 511–514.
23. Zenga X, Donga Y, Sheng G, i in. Isolation and structure determination of anti-influenza component from *Mahonia bealei*. *J Ethnopharmacol* 2006; 18:317–319.
24. Lee R, Balick MJ. Flu for you? The common cold, influenza and traditional medicine. *Ethnomed* 2006; 2(3): 252–255.
25. Yamada K, Ogawa H, Hara A, i in. Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antivir Res* 2009; doi:10.1016/j.antiviral.2009.03.002
26. Rajbhandari M, Mentel R, Jha PK, i in. Antiviral Activity of Some Plants Used in Nepalese Traditional Medicine. *eCAM* 2007; 1–6.

Otrzymano: 13.07.2009r

Zaakceptowano do druku: 24.08.2009

Adres do korespondencji:

Magdalena Kwiatek

Ośrodek Diagnostyki i Zwalczania Zagrożeń Biologicznych, WIHiE

ul. Lubelska 2, 24-100 Puławy

e-mail: magdalena.szczesna@gmail.com