

NÍZKOMOLEKULÁRNÍ INHIBITORY REPLIKACE ENTEROVIRŮ

RADIM NENCKA, HUBERT HŘEBABECKÝ,
MICHAL ŠÁLA a MILAN DEJMEK

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.,
Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6
nencka@uochb.cas.cz

Došlo 13.11.13, přijato 29.11.13.

Klíčová slova: enteroviry, pikornaviry, antivirotika,
inhibitory replikace virů

Obsah

1. Úvod
2. Rozdělení nízkomolekulárních inhibitorů replikace enterovirů
3. Látky působící na strukturu viru
 - 3.1. Látky působící na proteiny virové kapsidy
 - 3.2. Látky cílené na protein 2A
 - 3.3. Látky cílené na protein 2B
 - 3.4. Látky cílené na protein 2C
 - 3.5. Inhibitory nestrukturálního proteinu 3A
 - 3.6. Inhibitory proteasy 3C^{pro}
 - 3.7. Inhibitory RNA-dependentní RNA polymerasy 3D
4. Látky působící na hostitelské faktory v buňkách nezbytné pro virovou replikaci
5. Látky s neobjasněným mechanismem účinku
6. Závěr

1. Úvod

Enteroviry jsou rozsáhlým rodem virů spadajících do čeledi Picornaviridae, která zahrnuje vůbec nejčastější lidské patogeny. Viry z této skupiny nesou svou genetickou informaci v 7500–10 000 nukleotidů dlouhé jednovláknové RNA molekule s pozitivní polaritou, která je obalená pouze kapsidou. Tradiční dělení těchto virů na polioviry a non-polioviry, zahrnující viry coxsackie a echoviry, vycházelo z patogenity u hlodavců. Tento systém byl nicméně nahrazen klasifikací založenou na genetické podobnosti sekvence hlavního kapsidového proteinu VP1, který rozlišuje enteroviry do čtyř skupin¹ označovaných písmeny A–D. Tento přehled nezahrnuje rod Rhinovirus, který byl nedávno sloučen s rodem Enterovirus díky vysoké genetické příbuznosti. Mezi enteroviry s klinicky nejvýznamnějšími projevy patří bezpochyby poliovirus, který způsobuje poliomyelitidu dříve známou pod označením dětská obrna. Přestože vakcinace proti polioviru (PV)

vedla k eradikaci této choroby u nás stejně jako ve většině států světa, program Světové zdravotnické organizace (WHO) na globální eradikaci tohoto závažného onemocnění nebyl zatím úspěšný a toto onemocnění zůstává endemické v některých oblastech Afriky a jihovýchodní Asie². I v případě globální eradikace musíme být připraveni na možný opětovný návrat této infekce a její rychlé zvládnutí. Přestože vakcína poskytuje ochranu proti onemocnění, není schopna toto onemocnění léčit v akutním stádiu. Z těchto i jiných důvodů je vývoj nových látek umožňujících efektivní léčbu této zákeřné choroby velmi důležitým cílem dalšího výzkumu³.

Infekce způsobené většinou non-polio enterovirů se projevují spíše lehkými onemocněními, ovšem i přesto může u dětí nebo imunosuprimovaných pacientů docházet k závažným poškozením vnitřních orgánů, například mozku, srdce a slinivky břišní. Mezi důležité zástupce této skupiny virů patří zejména enterovirus 71 (EV71) a Cocksackie viry. EV71 a někteří zástupci Cocksackie virů (např. CVA 6 a CVA 16) jsou hlavními původci tzv. „hand, foot and mouth disease“, v češtině označovaného jako syndrom rukou, nohou a úst, charakterizovaného exantémem v oblasti dutiny ústní, ale i na rukou a nohou⁴. Nicméně infekce EV71 se může v některých případech komplikovat a u dětí může tento virus způsobit závažná onemocnění, jako jsou aseptická meningitida, encefalitida, paralýza nebo dokonce může vyústit i v úmrtí pacienta^{5,6}. Naproti tomu některé sérotypy Cocksackie virů, jako např. CVB3, mohou vyvolávat závažná onemocnění srdce, v tomto případě se jedná zejména o virovou myokarditidu, tedy zánět srdečního svalu⁷. Jen v USA je ročně hospitalizováno 30–50 tisíc lidí v důsledku onemocnění způsobených non-polio enteroviry, přičemž celkový počet infekcí je odhadován na 10–15 milionů. Nejčastějším důvodem hospitalizace je aseptická meningitida⁸.

Je zřejmé, že také léčba těchto onemocnění si žádá naši pozornost. Vývoj vakcín proti těmto onemocněním se v současnosti zdá být v nedohlednu, zejména díky široké různorodosti působících virů. Proto je dost možné, že se výzkum nových léčiv s pokud možno co nejširším spektrem účinku proti tomuto rodu virů může stát jednou z hlavních priorit v oboru antivirové terapie.

2. Rozdělení nízkomolekulárních inhibitorů replikace enterovirů

V posledních letech byla problematice nových inhibitorů replikace enterovirů (IRE) věnována značná pozornost v prestižních zahraničních časopisech a látky účinné proti vybraným virům (např. EV71)⁹, skupinám virů (např. Cocksackie virům)¹⁰, ale i celému rodu *Enterovirus*^{11,12} nebo dokonce čeledi *Picornaviridae*^{13–15} byly několikrát

shrnuty v přehledných člancích. Úkolem tohoto textu je proto spíše stručně seznámit čtenáře se základními skupinami látek, které zabraňují replikaci těchto virů, než se věnovat jednotlivým skupinám vyčerpávajícím způsobem. Pro přehlednost bylo zvoleno rozdělení látek do tří základních skupin: látky působící na strukturu viru v průběhu jednotlivých částí replikace, látky působící na hostitelské faktory v buňkách, které jsou pro replikaci těchto virů nezbytné a látky s nejasným mechanismem účinku.

3. Látky působící na strukturu viru

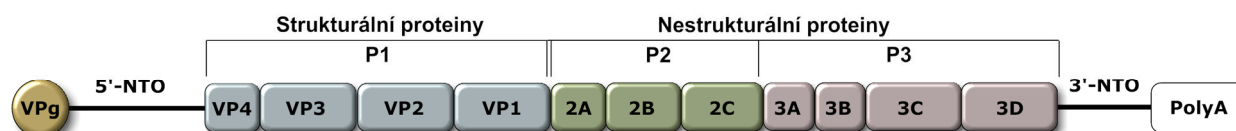
Hlavními biologickými cíli terapie enterovirových infekcí jsou proteiny, které tyto viry kódují a využívají ke své replikaci nebo konstrukci virionu. Genom enterovirů

tvořený jednováknovou molekulou RNA zahrnuje asi 7400 až 7500 nukleotidů a obsahuje pouze jeden otevřený čtecí vzorec (open reading frame, ORF) kódující jediný polyprotein (obr. 1). Tento protein je posléze rozštěpen virovými proteasami na čtyři kapsidové proteiny (VP1–VP4), sedm nestrukturních proteinů a event. některé stabilní intermediáty¹⁶. Virové proteiny a jejich úlohy při replikaci viru jsou stručně shrnuty v tab. I, podrobný popis funkcí jednotlivých proteinů může být nalezen v několika souhrnných člancích věnovaných této problematice^{13,17}.

Z tab. I je zřejmé, že značná část proteinů, které jsou virovou genetickou informací kódovány, mohou sloužit jako důležitý molekulární cíl terapie infekcí způsobených enteroviry. V tomto textu budou látky působící na strukturu viru rozděleny právě podle toho, na který z těchto proteinů působí.

Tabulka I
Funkce jednotlivých proteinů kódovaných enteroviry

Protein	Funkce	Lit.
VP1-VP4	Proteiny tvořící kapsidu viru	18, 19
2A (2A ^{pro})	Proteasa katalyzující první část procesování polyproteinu vzniklého při translaci virové RNA, konkrétně odštěpení kapsidových proteinů od zbytku polyproteinu mezi VP1 a 2A. Tento enzym se zřejmě také podílí na zástavě translace buněčné mRNA v hostitelských buňkách (pomocí štěpení iniciačního faktoru 4G). U Cocksackieviru B3 je tento enzym také spojen s virem indukovanou kardiomyopatií.	20–22
2B	Protein, který společně se svým prekurzorem 2BC zřejmě hraje důležitou roli v ovlivňování funkce membrán, je pravděpodobně schopen vytvářet póry v membránách endoplazmatického retikula a Golgiho orgánu.	13,17,23
2C	Protein s plně neobjasněnou funkcí, který vykazuje ATPasovou aktivitu. 2C má ale i další funkce, které jsou zřejmě nepostradatelné pro replikaci i složení virionů. Předpokládá se u něj také helikasaová aktivita, přestože ta je zatím předmětem kontroverzí.	13,24,25
3A	Zdá se, že tento protein je zodpovědný za iniciační část tvorby replikačního aparátu viru tím, že zprostředkovává fosforylaci membránových kompartmentů buňky pomocí PI4KIIIb. Tím dochází k reorganizaci Golgiho aparátu za vzniku organel, na kterých dochází k virové replikaci. Tento nestrukturální protein se podílí také na inhibici transportu proteinů v hostitelských buňkách.	26–28
3B (VPg)	VPg je protein, který po uridylyaci slouží jako primer pro replikaci virového genomu.	29, 30
3C (3C ^{pro})	Proteasa, která je zodpovědná za hlavní podíl štěpení polypeptidových prekurzorů funkčních proteinů. Kromě této hlavní aktivity, 3C ^{pro} také štěpí vybrané peptidy v buňkách za účelem vytvoření funkčního replikačního aparátu v hostitelské buňce.	31, 32
3D (3D ^{pol})	RNA-dependentní RNA polymerasa	33, 34
3CD	Je stabilní prekurzor 3C a 3D, který má výraznou proteasovou aktivitu a významně se účastní štěpení polypeptidového prekurzoru P1 na kapsidové proteiny. Nicméně tento polypeptid nedisponuje polymerasovou aktivitou.	13



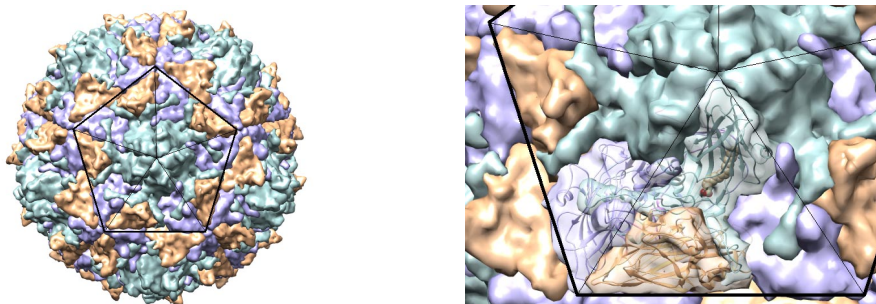
Obr. 1. **Struktura genomu enterovirů:** virová RNA je vázaná na 5'-konci na malý protein VPg, který hraje důležitou roli při iniciaci replikace, kódující část je ohraničena úseky RNA – delším z 5' strany a kratším z 3' strany – ten je zakončen polyadenosinovou sekvencí

3.1. Látky působící na proteiny virové kapsidy

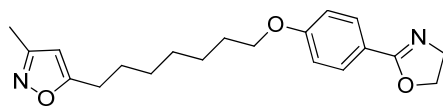
Virová kapsida enterovirů je tvořena čtyřmi proteiny (VP1–VP4), z nichž VP1, VP2 a V3 tvoří zevní obal kapsidy a malý protein VP4 je lokalizován na vnitřní straně kapsidy (obr. 2). Na vnějším povrchu ikosaedrální kapsidy složené z těchto čtyř symetricky se opakujících komponent je znatelná prohlubeň, která je často označována jako kaňon (angl., canyon). Tato prohlubeň je zřetelná zejména u poliovirů, méně pak např. u EV71. Kaňon je právě ta část, se kterou většinou interagují receptory napadených buněk – různé enteroviry využívají různé receptory z imunoglobulinové nadrodiny¹⁷ (např. PVR, CAR, ICAM-1). V okamžiku interakce receptoru s virovou kapsidou dochází k uvolnění mastné kyseliny z hydrofobní kapsy v podjednotce VP1. Tyto mastné kyseliny (případně směs mastných kyselin nebo lipidů) jsou označovány jako „pocket factor“ a jejich uvolněním a navázáním receptoru dochází k destabilizaci virové kapsidy, která předchází uvolnění virové RNA do cytoplasmy napadené buňky. Látky vážící se právě v této lipofilní kapse jsou největší skupinou anti-enterovirových sloučenin vůbec, přestože velikost resp. hloubka hydrofobní kapsy v proteinu VP1 může být znatelně odlišná, což do jisté míry omezuje možnost návrhu skutečně širokospektrých derivátů vůči všem enterovirům³⁵.

První z těchto látek byly objeveny na Sterling-Winthorp Research Institute, podle kterého také nesou své označení WIN a první sloučeninou, která se dostala do klinických zkoušek¹⁵, byla WIN 51711 vykazující inhibici různých enterovirových serotypů jak *in vitro*, tak *in vivo*^{36,37}. Nejznámějším zástupcem těchto látek je však WIN 63843, běžně známá pod označením pleconaril. Tato látka byla získána postupnou optimalizací struktury a vyznačuje se vhodnými farmakokinetickými vlastnostmi (zvýšení metabolické stability vedlo ke znatelně prodlouženému plazmatickému poločasu, resp. snížení celkové clearance). Přestože pleconaril neuspěl v klinických zkouškách v souvislosti s jeho možným použitím pro terapii rýmy zejména z důvodu rizika vytváření rezistentních kmenů enterovirů a možného snížení efektivity perorální antikoncepce, jeho další užití u život ohrožujících enterovirových infekcí není vyloučeno³⁸. Klinická studie fáze II v souvislosti s enterovirovou sepsí u dětí byla dokončena v září roku 2012, nicméně její výsledky zatím nebyly zveřejněny³⁹. Použitelnost pleconarilu je bohužel omezena jeho nedostatečnou účinností na důležité zástupce rodu Enterovirus, jako jsou např. EV71 nebo CVB3 (cit.⁴⁰) (tab. II).

Slibné výsledky WIN derivátů podnítily výzkum kapsidových inhibitorů, který vedl k objevu dalších strukturně většinou obdobných derivátů, které pleconaril v mnoha ohledech překonávají. Mezi tyto látky patří piro-



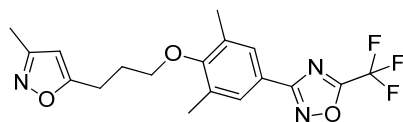
Obr. 2. Struktura kapsidy enterovirů (kapsida PV 1 (Mahoney), PDB ID: 1HXS): A) pohled na povrch kapsidy polioviru – symetricky se opakující motivy jsou zvýrazněny vodíčovými čarami; B) detail strukturní podjednotky virové kapsidy tvořené 4 proteiny VP1–VP4 (ribbon); VP1 podjednotka uzavírá ve vnitřní kavitě uložené „pod podlahou kaňonu“ molekulu mastné kyseliny (spheres)



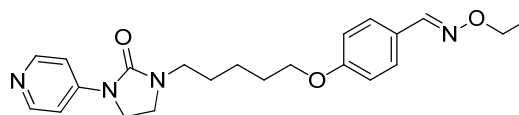
WIN 51711

CCOC(=O)c1ccc(OCCCCN2CCc3cc(C)nn3)cc1

pirodavir



pleconaril



BPROZ-101

Obr. 3. Vybrané inhibitory působící na enterovirové kapsidě

davir, BTA-798, V-073 a další^{11,14}. Antivirové spektrum jednotlivých látek je značně rozdílné, přičemž důvodem je zřejmě odlišný tvar hydrofobní kapsy u jednotlivých zástupců rodu. Vhodnými modifikacemi struktury byly připraveny deriváty vykazující významně zvýšenou aktivitu^{42,43}, např. vůči EV71 (BPROZ-101, obr. 3).

3.2. Látky cílené na protein 2A

První z nestrukturálních proteinů, 2A proteasa, má zjevně nezastupitelnou roli jak ve štěpení virového polyproteinu, tak v „asimilaci“ hostitelské buňky, a tím bezesporu představuje jeden z vhodných molekulárních cílů pro anti-enterovirovou terapii. Falah a spol. nedávno publikovali studii prokazující, že malý oligopeptid LVLQTM může efektivně inhibovat replikaci EV71 i rhinoviru^{44,45}. Přestože se v tomto případě nejedná o malou molekulu, tento výsledek dává naději pro vývoj nových zjednodušených derivátů s podobnou účinností.

3.3. Látky cílené na protein 2B

Xie a spol. ukázali, že se protein 2B chová jako iontový kanál a že inhibitor aniontového transportu 4,4'-diisothiokyno-2,2'-stilbendisulfonová kyselina (DIDS), která pravděpodobně cílí na tento protein, může efektivně zabránit produkci virionů a cytopatickému efektu⁴⁶.

3.4. Látky cílicí na protein 2C

Protein 2C s prokázanou ATPasovou aktivitou a předpokládanou RNA helikasovou aktivitou, který má značně konzervovanou strukturu napříč všemi enteroviry, je inhibován skupinou benzimidazolových derivátů. Do této skupiny se řadí např. sloučeniny HBB, MRL-1237, TBZE-029 (cit.¹³). Určitou strukturní podobnost vykazuje také fluoxetin, který byl nedávno identifikován jako další z řady inhibitorů cílicích na tento protein²⁴. N⁶-Benzyladenosin a jeho methylovaný derivát metrifudil jsou také deriváty interferující s tímto proteinem (obr. 4)⁴⁷. Přestože všechny tyto látky pravděpodobně interagují s proteinem 2C, detailní mechanismus jejich účinku zatím nebyl plně objasněn.

3.5. Inhibitory nestrukturálního proteinu 3A

Poslední studie věnované funkci 3A proteinu ukazují, že hraje významnou roli v iniciaci funkce replikačního aparátu. Protein 3A, který je svou C-koncovou hydrofobní doménou zakotven v membráně Golgiho aparátu, nepřímým mechanismem využívajícím stávající buněčné nástroje (mohou se u jednotlivých pikornavirů lišit) rekrutuje fosfatidylinositol 4-kinasu III β (PI4KIII β). Tento enzym je pak zodpovědný za zvýšenou fosforylaci membránových fosfolipidů Golgiho aparátu. Na takto upravené membránové struktury buňky pak může dosedat 3D^{pol} a může být zahájena replikace virové RNA²⁷.

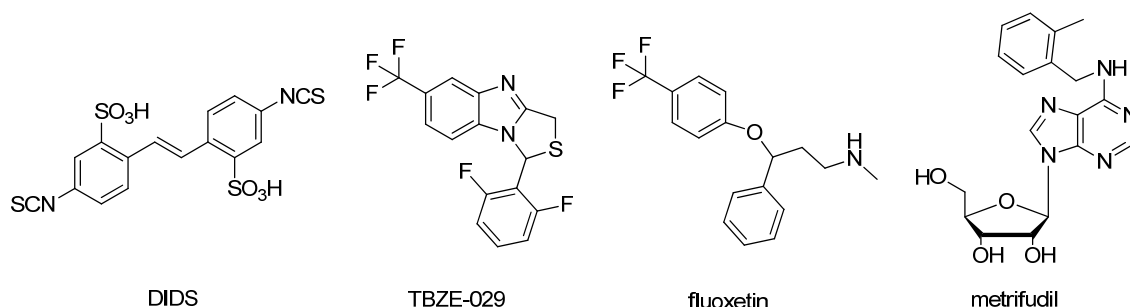
Za archetypální příklad inhibitoru cílicímu na protein 3A byl dlouhou dobu považován enviroxim, vykazující širokospektrý účinek jak proti rhinovirům, tak enterovirům. Nicméně jeho přímý účinek na tento protein nebyl plně prokázán. Arita a spol. nedávno ukázali^{48,49}, že enviroxim a jemu podobné látky jsou spíše inhibitory PI4KIII β než proteinu 3A. Řada dalších derivátů inhibujících replikaci jak enterovirů, tak rhinovirů sdílí shodný rezistenční profil. Mezi tyto látky patří např. AN-12-N5, TTP-8307, GW5074 a další⁵⁰. Přestože je protein 3A zjevně vhodným zásahovým místem pro terapii enterovirálních onemocnění, není zcela jasné, zda na něj tyto látky cílí přímo.

3.6 Inhibitory proteasy 3C^{pro}

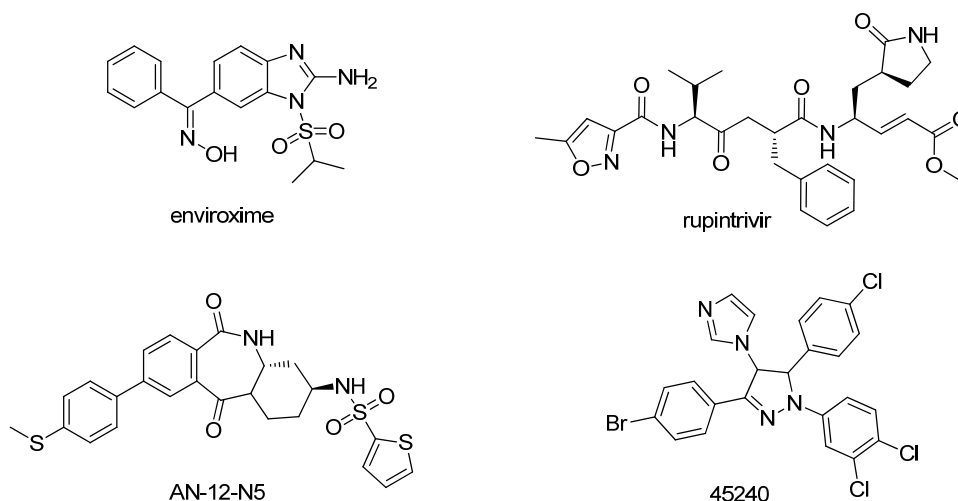
Kromě úvodního procesování polyproteinu mezi VP1 a 2A a štěpením 3CD zprostředkovaného 2A^{pro} se tato proteasa účastní, ať už samostatně nebo ve formě svého prekursoru 3CD, procesování všech proteinů kódovaných virovým genomem⁹. Možnost vytvoření vhodné enzymové eseje, znalost enzymové specifity a vyřešení krystalové struktury 3C^{pro} vedlo k racionálnímu návrhu účinných inhibitorů tohoto enzymu nepostradatelného pro replikaci enterovirů^{9,31,51}.

Inhibitory 3C^{pro} je možné rozdělit na peptidové a nepeptidové, přičemž stejně jako u inhibitorů kapsidových proteinů byl i v tomto případě jejich vývoj potencován zejména snahou o účinnou terapii rhinovirů.

V první generaci byly vyvíjeny zejména peptidomimetika s kompetitivním mechanismem účinku⁵², později



Obr. 4. Inhibitory proteinů 2B a 2C



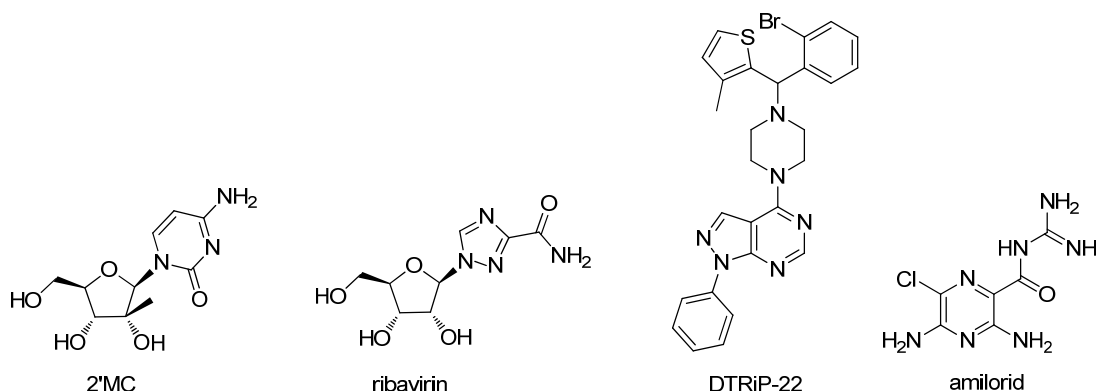
Obr. 5. Inhibitory nestrukturálních proteinů 3A a 3C

na základě lepší znalosti struktury byly vyvinuty také peptidové ireverzibilní inhibitory této proteasy^{12,14}. Asi nejznámějším zástupcem látek s inhibiční aktivitou proti 3C^{pro} je rupintrivir (AG7088), ireverzibilní inhibitor, který vykazuje aktivitu jak vůči enterovirům, tak rhinovirům⁵³. Přestože rupintrivir prošel úvodními klinickými zkouškami, na pacientech s rýmou získanou přirozenou cestou nevykazoval předpokládanou aktivitu a byl proto z dalších klinických zkoušek vyřazen⁵⁴. Peptidomimetika cílená na 3C^{pro} představují stále jednu ze zajímavých skupin potenciálních léčiv proti enterovirům a jejich vývoj představuje i dnes velmi aktivní pole výzkumu^{55–57}.

Do skupiny nepeptidových derivátů, které vykazují zajímavou inhibiční aktivitu proti 3C^{pro}, patří deriváty vyvinuté skupinou Dr. Lianga⁵⁶, které vykazují aktivitu jak proti enterovirovým, tak koronavirovým enzymům; např. sloučenina 45240 (obr. 5) inhibuje CVB3 3C s $IC_{50} = 1,2 \mu M$, EV71 3C s $IC_{50} = 0,5 \mu M$ a SARS 3CL s $IC_{50} = 2,5 \mu M$ (cit.⁵⁸).

3.7. Inhibitory RNA-dependentní RNA polymerasy 3D

RNA-dependentní RNA polymerasa (protein 3D) sehrává hlavní roli v replikaci virového genomu všech enterovirů a představuje neodmyslitelně jeden z důležitých molekulárních cílů pro terapii těchto patogenů. Hlavním pilířem léčby většiny virových onemocnění jsou nukleosidové nebo nukleotidové deriváty, které blokují polymerasovou reakci přímo v aktivním centru, resp. působí jako terminátory elongace nově vznikajícího řetězce. Proto je vysoce pravděpodobné, že některé farmaceutické firmy v současné době intenzivně hledají vhodné kandidáty z řad nukleosidových a nukleotidových derivátů, které by sloužily jako základ terapie rhinovirových a enterovirových onemocnění. Nicméně v současné době je známo pouze několik nukleosidových derivátů, které inhibují přímo 3D^{pol}. Jedním z nich je 2'-C-methylcytidin (2'MC), vykazující širokospektrý účinek nejen u enterovirů, ale i dalších ssRNA virů, jako jsou např. zástupci čeledi *Flaviviridae*



Obr. 6. Inhibitory 3D polymerasy

Tabulka II

Antivirová aktivita (EC_{50} , μM) vybraných derivátů vůči klinicky významným enterovirům

Látka	PV1	EV71	CVB3	Lit.
WIN51711	2,0±0,1	–	5,0 ± 0,3	81
pleconaril	>300	>300	>10	12, 53
pirodavir	20 ± 2	0,44 ± 0,34	>10	12, 53
BPROZ-101	–	0,001±0,001	>25	42
TBZE-029	–	–	7,2±3,1	82
enviroxime	0,79±0,13	0,45±0,12	0,7±0,3	12, 83
AN-12-H5	1,1±0,2	0,55±0,13	–	50
rupintrivir	4,5 ± 0,36	0,90 ± 0,07	0,18±0,16	12, 53
2'MC	27 ± 1	27 ± 1	94±15	12, 84
BF738735	0,019±0,008	0,011±0,003	0,071±0,018	67
MS254	–	–	0,81±0,20	70

a *Caliciviridae*^{59,60}. Také přímý derivát této sloučeniny 2'-C-ethynylcytidin vykazuje aktivitu^{61,62} proti CVB2 a CVB5. Ribavirin má poměrně nízkou *in vitro* aktivitu vůči enterovirům, ale pokusy na myších prokázaly snížení morbidity a mortality, které je připisováno „error catastrophe“ efektu, tedy vymýcení viru v důsledku příliš rozsáhlých mutací virového genomu⁹.

Mezi nenukleosidové inhibitory 3D polymerasy enterovirů patří například DTRiP-22 (cit.⁶³), aurintrikarboxylová kyselina (ATA)⁶⁴, která vykazuje aktivitu proti EV71 a nebo amilorid⁶⁵, který byl identifikován jako kompetitivní inhibitor polymerasy u coxsackieviru B3 (obr. 6).

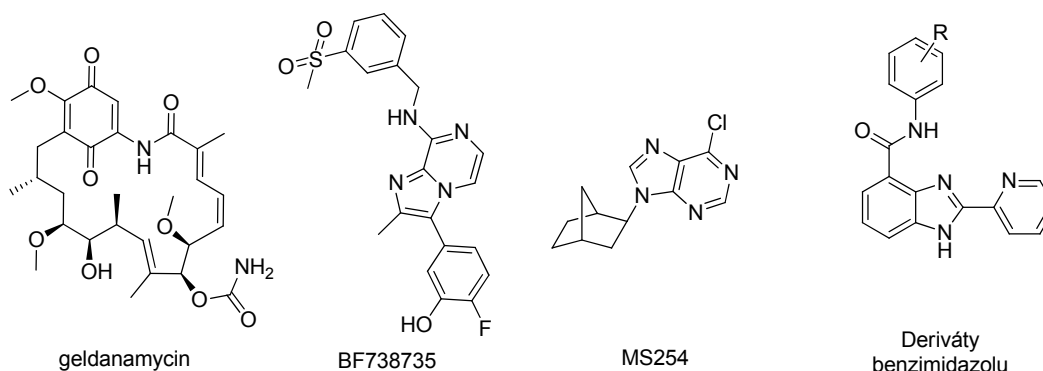
4. Látky působící na hostitelské faktory v buňkách nezbytné pro virovou replikaci

Hlavním problémem terapie onemocnění ssRNA viry je jejich vysoká genetická flexibilita a rychlé vytváření rezistence proti léčivům cílícím jejich proteinové struktury.

Tyto jednoduché viry jsou nicméně nuceny využívat i prostředky z hostitelské buňky, aby byly schopny efektivně zahájit svou replikaci. Jedním z přístupů vedoucích k potlačení virové replikace je proto také cílení právě na hostitelské struktury, které viry využívají v průběhu svého replikačního cyklu. U enteroviru bylo identifikováno několik hostitelských faktorů, které je možné cíleně využít. Mezi nejdůležitější z nich patří chaperon Hsp90 a PI4KIIIβ.

Chaperon Hsp90 je zodpovědný za správné složení a maturaci kapsidových proteinů enterovirů. Geldanamycin a některá jeho analoga inhibující tento protein vykazují signifikantní antienterovirovou aktivitu bez významné toxicity *in vivo*^{11,66}.

Kinasa PI4KIIIβ, jejíž role v replikaci enterovirů byla vysvětlena výše, si získala v posledních dvou letech značnou pozornost. Bylo připraveno několik selektivních inhibitorů tohoto enzymu prokazatelně inhibujících replikaci enterovirů i ve velmi nízkých koncentracích např. T-00127-HEV1 (cit.⁴⁹), BF738735 (cit.⁶⁷) nebo PIK93 a jeho deriváty⁶⁸.



Obr. 7. Příklady inhibitorů hostitelských faktorů a látek s nejasným mechanismem účinku

5. Látky s neobjasněným mechanismem účinku

V posledních letech bylo nalezeno také několik zajímavých skupin antienterovirových aktivních látek, pro které zatím nebyl objeven molekulární cíl.

V naší laboratoři byl na základě výzkumu nových derivátů nukleosidů⁶⁹ objeven poměrně rozsáhlý soubor derivátů inhibujících replikaci CVB3 (cit.^{70–74}). Reprezentační strukturou celé série je derivát MS254, u kterého byla struktura původního nukleosidu markantně zjednodušena. V současné době se věnujeme rozkrytí možného mechanismu účinku těchto látek, studiu jejich metabolismu a zjednodušení syntetické metodiky vedoucí k těmto látkám^{75–77}. Nezávisle na našich výzkumech skupina prof. Pérez-Pérez připravila strukturně velmi podobnou sérii látek vykazujících analogickou aktivitu proti CVB3 a některým dalším enterovirům. Bohužel také u těchto sloučenin zůstal molekulární cíl zatím neznámý⁷⁸.

Významnou antienterovirovou aktivitu vykazuje rozsáhlá skupina benzimidazolových derivátů připravených na univerzitě v Šanghaji. Přestože tyto deriváty vykazují určitou strukturní podobnost s některými inhibitory PI4K a inhibitory proteinu 2C, jejich mechanismus účinku je zatím také neznámý (obr. 7)^{79,80}.

V poledních letech bylo identifikováno také mnoho přírodních látek inhibujících replikaci enterovirů, jejichž molekulární cíle rovněž nejsou známy. Hlavní zástupci těchto derivátů, přinášejících strukturně zcela nové motivy, byli nedávno shrnuti v přehledném článku⁹.

6. Závěr

Výběr vhodných nízkomolekulárních inhibitorů replikace enterovirů použitelných v klinické praxi představuje poměrně komplikovaný problém, zejména v důsledku rychlého vývoje rezistence způsobeného častými mutacemi těchto virů. Je zřejmé, že pro skutečně účinnou terapii závažných a život ohrožujících enterovirových infekcí bude nutné používat kombinaci léčiv několika strukturních typů s různými mechanismy účinku. Jelikož se zatím žádná z výše zmíněných látek nedostala do klinické praxe, je možné konstatovat, že v tomto boji jsme stále na začátku. Nicméně detailní pochopení replikace enterovirů a struktury virových i buněčných proteinů nepostradatelných pro tento proces poskytuje důležitá vodítka pro vývoj nových účinných terapeutik.

LITERATURA

1. Muir P.: *Medicine* 37, 691 (2009).
2. Hovi T., Shulman L. M., Van der Avoort H., Deshpande J., Roivainen M., De Gourville E. M.: *Epidemiol. Infect.* 140, 1 (2012).
3. De Palma A. M., Pürstinger G., Wimmer E., Patick A. K., Andries K., Rombaut B., De Clercq E., Neyts J.: *Emerging Infect. Dis.* 14, 545 (2008).
4. Cabrerizo M., Tarragó D., Muñoz-Almagro C., del Amo E., Domínguez-Gil M., Eiros J. M., López-Miragaya I., Pérez C., Reina J., Otero A., González I., Echevarría J. E., Trallero G.: *Clin. Microbiol. Infect.*, v tisku.
5. McMinn P. C.: *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 91 (2002).
6. Solomon T., Lewthwaite P., Perera D., Cardoso M. J., McMinn P., Ooi, M. H.: *Lancet Infect. Dis.* 10, 778 (2010).
7. Andreoletti L., Leveque N., Boulagnon C., Brasselet C., Fornes P.: *Arch. Cardiovasc. Dis.* 102, 559 (2009).
8. Oberste M. S., Maher K., Kilpatrick D. R., Pallansch M. A.: *J. Virol.* 73, 1941 (1999).
9. Shang L., Xu M., Yin Z.: *Antiviral Res.* 97, 183 (2013).
10. Fechner H., Pinkert S., Geisler A., Poller W., Kurreck J.: *Molecules* 16, 8475 (2011).
11. Thibaut H. J., De Palma A. M., Neyts J.: *Biochem. Pharmacol.* 83, 185 (2012).
12. Thibaut H. J., Leyssen P., Puerstinger G., Muigg A., Neyts J., De Palma A. M.: *Antiviral Res.* 90, 213 (2011).
13. Norder H., De Palma A. M., Selisko B., Costenaro L., Papageorgiou N., Arnan C., Coutard B., Lantze V., De Lamballerie X., Baronti C., Sola M., Tan J., Neyts J., Canard B., Coll M., Gorbalenya A. E., Hilgenfeld R.: *Antiviral Res.* 89, 204 (2011).
14. De Palma A. M., Vliegen I., De Clercq E., Neyts J.: *Med. Res. Rev.* 28, 823 (2008).
15. Shih S.-R., Chen S.-J., Hakimelahi G. H., Liu H.-J., Tseng C.-T., Shia K.-S.: *Med. Res. Rev.* 24, 449 (2004).
16. Lukashev A. N.: *Rev. Med. Virol.* 15, 157 (2005).
17. Lin J.-Y., Chen T.-C., Weng K.-F., Chang S.-C., Chen L.-L., Shih S.-R.: *J. Biomed. Sci.* 2009, 16.
18. Xiao C., Bator-Kelly C. M., Rieder E., Chipman P. R., Craig A., Kuhn R. J., Wimmer E., Rossmann M. G.: *Structure* 13, 1019 (2005).
19. Muckelbauer J. K., Kremer M., Minor I., Diana G., Dutko F. J., Groarke J., Pevear D. C., Rossmann M. G.: *Structure* 3, 653 (1995).
20. Cai Q., Yameen M., Liu W., Gao Z., Li Y., Peng X., Cai Y., Wu C., Zheng Q., Li J., Lin T.: *J. Virol.* 87, 7348 (2013).
21. Gradi A., Svitkin Y. V., Imataka H., Sonenberg, N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 11089 (1998).
22. Xiong D. D., Lee G. H., Badorff C., Dorner A., Lee S., Wolf P., Knowlton K. U.: *Nature Med.* 8, 872 (2002).
23. de Jong A. S., de Mattia F., Van Dommelen M. M., Lanke K., Melchers W. J. G., Willems P. H. G. M., van Kuppeveld F. J. M.: *J. Virol.* 82, 3782 (2008).
24. Ulferts R., van der Linden L., Thibaut H. J., Lanke K. H. W., Leyssen P., Coutard B., De Palma A. M., Canard B., Neyts J., van Kuppeveld F. J. M.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1952 (2013).
25. Cheng Z., Yang J., Xia H., Qiu Y., Wang Z., Han Y., Xia X., Qin C.-F., Hu Y., Zhou, X.: *J. Virol.* 87, 5205 (2013).

26. Greninger A. L., Knudsen G. M., Betegon M., Burlingame A. L., DeRisi J. L.: *J. Virol.* **86**, 3605 (2012).
27. Altan-Bonnet N., Balla T.: *Trends Biochem. Sci.* **37**, 293 (2012).
28. Wessels E., Notebaart R. A., Duijsings D., Lanke K., Vergeer B., Melchers W. J. G., van Kuppeveld F. J. M.: *J. Biol. Chem.* **281**, 28232 (2006).
29. Sun Y., Wang Y., Shan C., Chen C., Xu P., Song M., Zhou H., Yang C., Xu W., Shi P.-Y., Zhang B., Lou Z.: *J. Virol.* **86**, 13662 (2012).
30. Liu Y., Franco D., Paul A. V., Wimmer E.: *J. Virol.* **81**, 5669 (2007).
31. Cui S., Wang J., Fan T., Qin B., Guo L., Lei X., Wang J., Wang M., Jin, Q.: *J. Mol. Biol.* **408**, 449 (2011).
32. Costenaro L., Kaczmarek Z., Arnan C., Janowski R., Coutard B., Sola M., Gorbalenya A. E., Norder H., Canard B., Coll M.: *J. Virol.* **85**, 10764 (2011).
33. Chen C., Wang Y., Shan C., Sun Y., Xu P., Zhou H., Yang C., Shi P.-Y., Rao Z., Zhang B., Lou Z.: *J. Virol.* **87**, 5755 (2013).
34. Jiang H., Weng L., Zhang N., Arita M., Li R., Chen L., Toyoda T.: *Biochim. Biophys. Acta, Gene Regul. Mech.* **1809**, 211 (2011).
35. Basta H. A., Ashraf S., Sgro J.-Y., Bochkov Y. A., Gern J. E., Palmenberg A. C.: *Virology* **448**, 82 (2014).
36. Otto M. J., Fox M. P., Fancher M. J., Kuhrt M. F., Diana G. D., McKinlay M. A.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**, 883 (1985).
37. McKinlay M. A., Steinberg B. A.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**, 30 (1986).
38. Senior K.: *Lancet Infect. Dis.* **2**, 264 (2002).
39. Debing Y., Jochmans D., Neyts J.: *Curr. Opin. Virol.* **3**, 217 (2013).
40. Wildenbeest J. G., van den Broek P. J., Benschop K. S. M., Koen G., Wierenga P. C., Vossen A., Kuijpers T. W., Wolthers K. C.: *Antiviral Ther.* **17**, 459 (2012).
41. Miller S. T., Hogle J. M., Filman D. J.: *J. Mol. Biol.* **307**, 499 (2001).
42. Chern J.-H., Lee C.-C., Chang C.-S., Lee Y.-C., Tai C.-L., Lin Y.-T., Shia K.-S., Lee C.-Y., Shih S.-R.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 5051 (2004).
43. Chen T. C., Liu S. C., Huang P. N., Chang H. Y., Chern J. H., Shih S. R.: *J. Biomed. Sci.* **15**, 291 (2008).
44. Falah N., Violot S., Decimo D., Berri F., Foucault-Grunenwald M. L., Ohlmann T., Schuffenecker I., Morfin F., Lina B., Riteau B., Cortay J. C.: *J. Virol.* **86**, 691 (2012).
45. Falah N., Montserret R., Lelogeais V., Schuffenecker I., Lina B., Cortay J. C., Violot S.: *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 2865 (2012).
46. Xie S. Q., Wang K., Yu W. J., Lu W., Xu K., Wang J. W., Ye B., Schwarz W., Jin Q., Sun B.: *Cell Res.* **21**, 1271 (2011).
47. Arita M., Wakita T., Shimizu H.: *J. Gen. Virol.* **89**, 2518 (2008).
48. Delang L., Paeshuyse J., Neyts J.: *Biochem. Pharmacol.* **84**, 1400 (2012).
49. Arita M., Kojima H., Nagano T., Okabe T., Wakita T., Shimizu H.: *J. Virol.* **85**, 2364 (2011).
50. Arita M., Takebe Y., Wakita T., Shimizu H.: *J. Gen. Virol.* **91**, 2734 (2010).
51. Wang J., Fan T. T., Yao X., Wu Z. Q., Guo L., Lei X. B., Wang J. W., Wang M. T., Jin Q., Cui S.: *J. Virol.* **85**, 10021 (2011).
52. Rotbart H. A.: *Antiviral Chem. Chemother.* **11**, 261 (2000).
53. Patick A. K., Binford S. L., Brothers M. A., Jackson R. L., Ford C. E., Diem M. D., Maldonado F., Dragovich P. S., Zhou R., Prins T. J., Fuhrman S. A., Meador J. W., Zalman L. S., Matthews D. A., Worland S. T.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2444 (1999).
54. Patick A. K., Brothers M. A., Maldonado F., Binford S., Maldonado O., Fuhrman S., Petersen A., Smith G. J.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2267 (2005).
55. Tan J. Z., George S., Kusov Y., Perbandt M., Anemuller S., Mesters J. R., Norder H., Coutard B., Lacroix C., Leyssen P., Neyts J., Hilgenfeld R.: *J. Virol.* **87**, 4339 (2013).
56. Ramajayam, R., Tan K. P., Liang P. H.: *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1371 (2011).
57. Kim B.-K., Kim J.-H., Kim N.-R., Lee W.-G., Lee S.-D., Yun S.-H., Jeon E.-S., Kim Y.-C.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 6952 (2012).
58. Kuo C. J., Liu H. G., Lo Y. K., Seong C. M., Lee K. I., Jung Y. S., Liang P. H.: *FEBS Lett.* **583**, 549 (2009).
59. Carroll S. S., Tomassini J. E., Bosserman M., Getty K., Stahlhut M. W., Eldrup A. B., Bhat B., Hall D., Simcoe A. L., LaFemina R., Rutkowski C. A., Wolanski B., Yang Z. C., Migliaccio G., De Francesco R., Kuo L. C., MacCoss M., Olsen D. B.: *J. Biol. Chem.* **278**, 11979 (2003).
60. Costantini V. P., Whitaker T., Barclay L., Lee D., McBrayer T. R., Schinazi R. F., Vinje J.: *Antiviral Ther.* **17**, 981 (2012).
61. Tonelli M., Vazzana I., Tasso B., Boido V., Sparatore F., Fermeglia M., Paneni M. S., Posocco P., Priol S., Colla P. L., Ibba C., Secci B., Collu G., Loddo R.: *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 4425 (2009).
62. Carta A., Briguglio I., Piras S., Corona P., Boatto G., Nieddu M., Giunchedi P., Marongiu M. E., Gilberti G., Iuliano F., Blois S., Ibba C., Busonera B., La Colla P.: *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 7070 (2011).
63. Chen T. C., Chang H. Y., Lin P. F., Chern J. H., Hsu J. T. A., Chang C. Y., Shih S. R.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 2740 (2009).
64. Hung H. C., Chen T. C., Fang M. Y., Yen K. J., Shih S. R., Hsu J. T. A., Tseng, C. P.: *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 676 (2010).
65. Gazina E. V., Smidansky E. D., Holien J. K., Harrison D. N., Cromer B. A., Arnold J. J., Parker M. W., Cameron C. E., Petrou S.: *J. Virol.* **85**, 10364 (2011).
66. Wang R. Y. L., Kuo R. L., Ma W. C., Huang H. I., Yu

- J. S., Yen S. M., Huang C. R., Shih S. R.: *Virology* 443, 236 (2013).
67. van der Schaar H. M., Leyssen P., Thibaut H. J., de Palma A., van der Linden L., Lanke K. H. W., Lacroix C., Verbeken E., Conrath K., MacLeod A. M., Mitchell D. R., Palmer N. J., de Poel H. V., Andrews M., Neyts J., van Kuppeveld F. J. M.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 4971 (2013).
 68. Spickler C., Lippens J., Laberge M.-K., Desmeules S., Bellavance É., Garneau M., Guo T., Hucke O., Leyssen P., Neyts J., Vaillancourt F. H., Décor A., O'Meara J., Franti M., Gauthier A.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3358 (2013).
 69. Hřebabecký H., Dračinský M., De Palma A. M., Neyts J., Holý A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 74, 469 (2009).
 70. Šála M., De Palma A. M., Hřebabecký H., Nencka R., Dračinský M., Leyssen P., Neyts J., Holý A.: *Bioorg. Med. Chem.* 18, 4374 (2010).
 71. Šála M., De Palma A. M., Hřebabecký H., Dejmek M., Dračinský M., Leyssen P., Neyts J., Mertlíková-Kaiserová H., Nencka R.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 4271 (2011).
 72. Hřebabecký H., Dejmek M., Dračinský M., Šála M., Leyssen P., Neyts J., Kaniaková M., Krůšek J., Nencka R.: *Tetrahedron* 68, 1286 (2012).
 73. Hřebabecký H., Dejmek M., Šála M., Mertlíková-Kaiserová H., Dračinský M., Leyssen P., Neyts J., Nencka R.: *Tetrahedron* 68, 3195 (2012).
 74. Šála M., Hřebabecký H., Leyssen P., Dejmek M., Dračinský M., De Palma A. M., Neyts J., Nencka R.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 1963 (2012).
 75. Plačková P., Rozumová N., Hřebabecký H., Šála M., Nencka R., Dvořáková A., Votruba I., Mertlíková-Kaiserová H.: *Anticancer Res.* 33, 3163 (2013).
 76. Dejmek M., Hřebabecký H., Šála M., Dračinský M., Nencka R.: *Synthesis* 2011, 4077.
 77. Dejmek M., Kováčková S., Zborníková E., Hřebabecký H., Šála M., Dračinský M., Nencka R.: *RSC Adv.* 2, 6970 (2012).
 78. Aguado L., Thibaut H. J., Priego E. M., Jimeno M. L., Camarasa M. J., Neyts J., Perez-Perez M. J.: *J. Med. Chem.* 53, 316 (2010).
 79. Cheng J., Xie J. T., Luo X. J.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 267 (2005).
 80. Xue F., Luo X. J., Ye C. H., Ye W. D., Wang Y.: *Bioorg. Med. Chem.* 19, 2641 (2011).
 81. Tait S., Salvati A. L., Desideri N., Fiore L.: *Antiviral Res.* 72, 252 (2006).
 82. De Palma A. M., Heggermont W., Lanke K., Coutard B., Bergmann M., Monforte A. M., Canard B., De Clercq E., Chimirri A., Purstinger G., Rohayem J., van Kuppeveld F., Neyts J.: *J. Virol.* 82, 4720 (2008).
 83. Aguado L., Canela M.-D., Thibaut H. J., Priego E.-M., Camarasa M.-J., Leyssen P., Neyts J., Pérez-Pérez M.-J.: *Eur. J. Med. Chem.* 49, 279 (2012).
 84. Huber S., Ramsingh A. I.: *Viral Immunol.* 17, 358 (2004).
- R. Nencka, H. Hřebabecký, M. Šála, and M. Dejmek** (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Prague*): **Low-molecular-weight Inhibitors of Enterovirus Replication**

Enteroviruses rank among the most common human pathogens; millions of people suffer from diseases caused by them every year. However, no specific treatment of infections caused by this genus from the *Picornaviridae* family has been introduced to clinical practice so far. Therefore, a search for potential therapeutics aiming at these viruses is urgently needed. Due to advances in biochemistry and molecular biology, we are able to aim at specific viral proteins as well as possible host factors essential for virus replication in cells. Recently, a number of compounds inhibiting replication of various enteroviruses have been reported, based on both rational target-based drug design and phenotypic screening. This article is a review of common structure patterns of the compounds that have been recently found to inhibit the replication of enteroviruses.