

# Chimica Farmaceutica e Tossicologica 2

## Antivirali

- Virus: classificazione;
- Targets;
- Antinfluenzali;

# Virus

- Sono microorganismi infettivi responsabili di numerose patologie umane ed animali.
- Si comportano da parassiti intracellulari obbligati sfruttando i processi metabolici della cellula invasa.
- Sono costituiti da :
  - **MATERIALE GENETICO**: RNA o DNA a singolo o doppio filamento
  - **CAPSIDE**: rivestimento di natura proteica; protegge il genoma virale e media la penetrazione virale intracellulare, interagendo con la superficie delle cellule bersaglio.

In alcuni virus (*orthomyxovirus*, *herpesvirus*, *poxvirus*) all'esterno del nucleocapside vi è un rivestimento lipoproteico, detto *PERICAPSIDE*

- **NUCLEOCAPSIDE**: materiale genetico + capside

*Alcuni virus possono integrare una copia del proprio materiale genetico all'interno dei cromosomi della cellula ospite, realizzando così una "latenza virale", condizione per cui l'infezione può nuovamente manifestarsi senza riesposizione **al virus**.*

# CLASSIFICAZIONE dei VIRUS

dal 1966 Comitato Internazionale per la Tassonomia dei Virus (ICTV)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>)

## Criteri:

- acido nucleico (DNA o RNA)
- simmetria del capsid (icosaedrica, elicoidale, complessa)
- envelope o no
- architettura del genoma (ds o ss, +/-)
- modalità replicative
- polimerasi associata al virione
- diametro virione (nm) e n° capsomeri
- dimensioni genoma (kb)

# CLASSIFICAZIONE dei VIRUS

Famiglia  
Sottofamiglia  
Genere  
Specie

- comportamento in colture cellulari (*tropismo, velocità repl., ...*)
  - epidemiologia (*recettività, modalità di trasmissione, patogenicità*)
  - sensibilità agenti chimico-fisici: resistenza a pH 3 per 30'; stabilità a 50-56°C per 30'
  - caratteristiche antigeniche: sierotipi
  - caratteristiche genomiche: genotipi
- 
- Ordine suffisso -virales
  - Famiglia suffisso -viridae
  - Sottofamiglia suffisso -virinae
  - Genere suffisso -virus



# Nomenclatura virale

- Es.: Ordine *Mononegavirales*  
Famiglia *Rhabdoviridae*  
Genere *Lyssavirus*  
"specie" virus della rabbia
- Es.: Ordine *Mononegavirales*  
Famiglia *Paramyxoviridae*  
Sottofamiglia *Paramyxovirinae*  
Genere *Morbillivirus*  
"specie" virus del cimurro del cane
- non tutte le famiglie sono comprese in un ordine
- non tutte le famiglie hanno una sottofamiglia
- alcune famiglie hanno 1 solo genere, altre numerosi generi



Taxa name search:

Search

Reset

Select to search across all ICTV releases

## Virus Taxonomy: 2016 Release

[? How do I use the taxonomy tree?](#)

EC 48, Budapest, Hungary, August 2016;

Email ratification 2017 (MSL #31)

<b>Order:</b> <i>Bunyavirales</i>	(9 Families)	
<b>Order:</b> <i>Caudovirales</i>	(3 Families)	
<b>Order:</b> <i>Herpesvirales</i>	(3 Families)	
<b>Order:</b> <i>Ligamenvirales</i>	(2 Families)	
<b>Order:</b> <i>Mononegavirales</i>	(8 Families)	
<b>Order:</b> <i>Nidovirales</i>	(4 Families)	
<b>Order:</b> <i>Picomavirales</i>	(5 Families)	
<b>Order:</b> <i>Tymovirales</i>	(4 Families)	
<b>Virus families not assigned to an order</b>	(84 Families)	

# CICLO DI REPLICAZIONE VIRALE

## 1) Adsorbimento

*Complesso virus-recettore membrana citoplasmatica cellula bersaglio.*

## 2) Penetrazione

- per endocitosi*
- per fusione*

## 3) Liberazione dell'acido nucleico virale

*Decapsidizzazione (uncoating).*

## 4) Sintesi dei componenti virali

*Acidi nucleici, materiale proteico*

## 5) Sintesi ed assemblaggio dei componenti capsidici

*Formazione di virioni.*

## 6) Liberazione della progenie virale

*Eventuale formazione del pericapside e fuoriuscita del virus neoformato dalla cellula.*

## LIMITI DEI FARMACI ANTIVIRALI

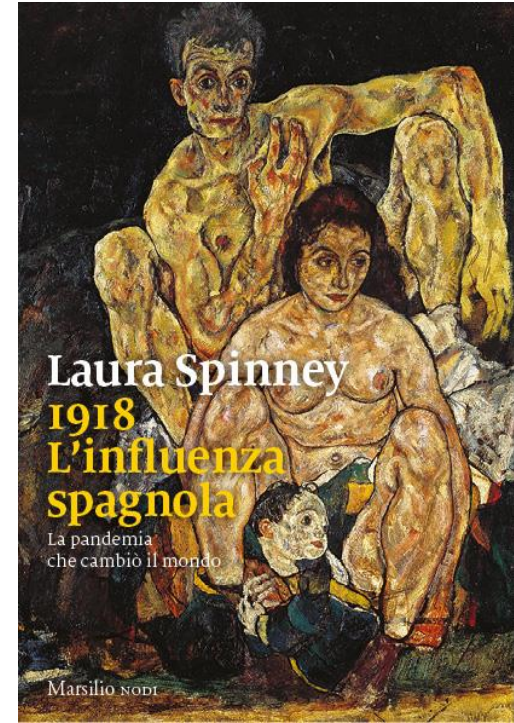
1. Spettro ristretto; target è spesso una proteina virale (es. M2) o un enzima (*sialidasi, polimerasi o trascrittasi*);
2. Generalmente non attivi nei confronti dei virus **in fase non replicativa o quiescente del ciclo vitale**;
3. Spesso tossici e poco selettivi;
4. La modificazione prodotta anche su un solo nucleotide comporta in traduzione la sostituzione di un aminoacido in posizione critica nella proteina bersaglio, è spesso sufficiente per lo sviluppo di resistenza al farmaco antivirale.

## Study revives bird origin for 1918 flu pandemic

Model also links avian influenza strains to deadly horse flu.

The 1918 influenza pandemic caused an estimated 50 million to 100 million deaths worldwide.

Hannah Hoag *Nature* 16 February 2014



Virus dell'influenza A sottotipo H1N1



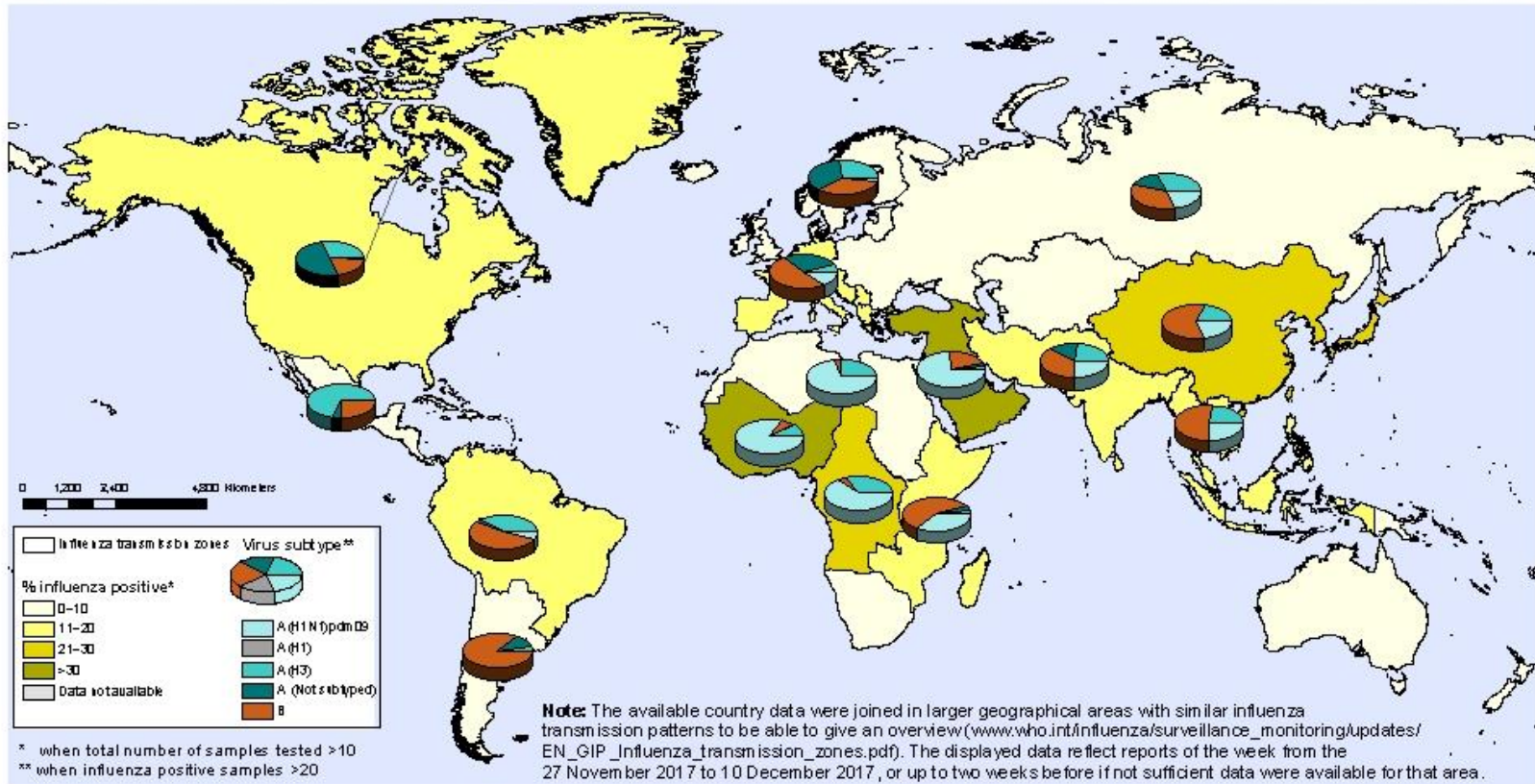
## Ospedale Cardarelli-Pronto Soccorso-15 giugno 2017



[http://napoli.repubblica.it/cronaca/2017/06/15/news/sanita\\_la\\_cgil\\_denuncia\\_emergenza\\_al\\_cardarelli\\_110\\_barelle\\_nei\\_reparti\\_-168165097/](http://napoli.repubblica.it/cronaca/2017/06/15/news/sanita_la_cgil_denuncia_emergenza_al_cardarelli_110_barelle_nei_reparti_-168165097/)

## Percentage of respiratory specimens that tested positive for influenza By influenza transmission zone

Status as of 22 December 2017



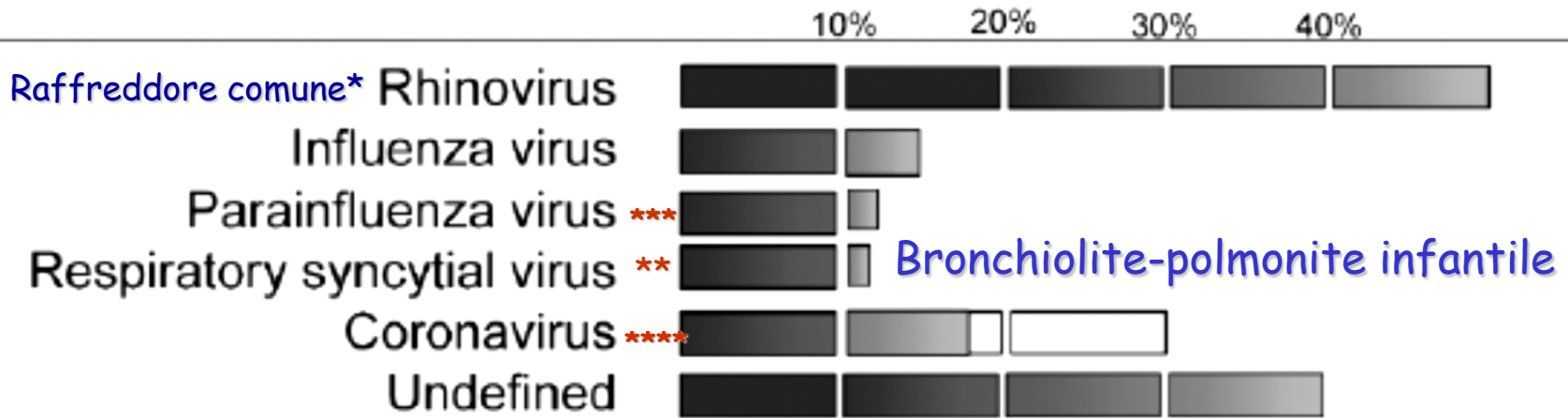
The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Data Source: Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS), FluNet ([www.who.int/flu-net](http://www.who.int/flu-net)).

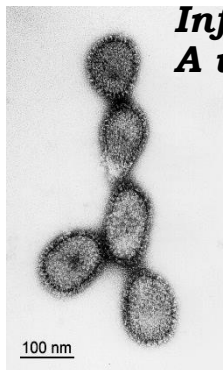


**Il virus dell'influenza A** è stato rilevato in uccelli acquatici e trampolieri dai quali possono essere trasmessi agli umani e tre tipi H1N1, H2N2 e H3N2, trasmissibili da umano a umano. **Il tipo B** circola generalmente in aree limitate spesso quando il tipo A è in regressione. Il tipo B è spesso più aggressivo con sintomi più severi e in pochi casi c'è sviluppo di anticorpi *In Europe, influenza activity continued to increase, but remained low in most of the countries, with detections of predominantly influenza B followed by influenza A(H3N2) viruses.*

# Virus responsabili di patologie del tratto respiratorio (VRTIs)



stagione, età, campionamento e tecnica di rilevazione

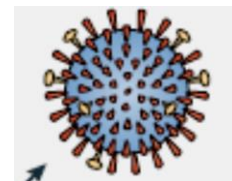


Influenza A virus

\* RNA a singolo filamento positivo, genere *Enterovirus* della famiglia *Picornaviridae* (che comprende anche genere *Cardiovirus*, encefalocardi/mieliti); \*\* virus ubiquitario, altamente infettivo, proporzione epidemica in inverno; \*\*\* infezioni tratto respiratorio (3% bambini); \*\*\*\* infezioni tratto respiratorio superiore (7-18% adulti)

• Virioni: sferici, pleomorfi talvolta filamentosi. 80-120nm Ø; 200-300nm ⇔;

glicoproteine emoagglutinina e neuraminidasi





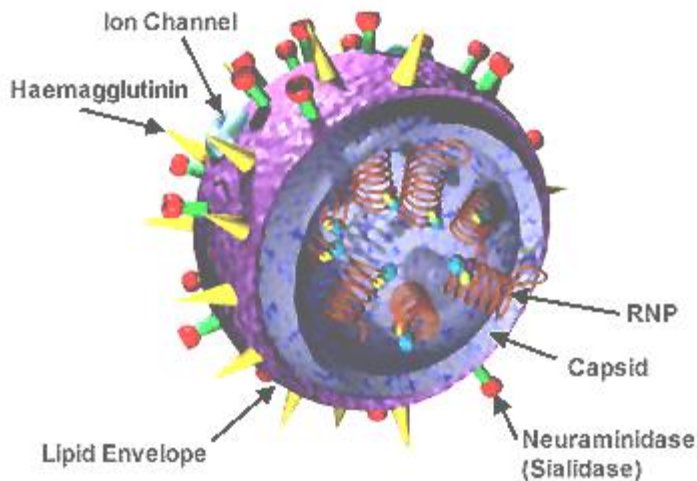
Orthomyxoviridae -> (RNA cinque generi): Influenza virus A, B, C, Thogotovirus  
*Isavirus*

### Virioni influenza A:

- 3 proteine di membrana (HA, NA, M2);
- 1 proteina di matrice (M1) (sotto il bilayer lipidico);
- un core ribonucleoproteico (8 segmenti di RNA virale) e 3 proteine PA, PB1, PB2, e proteine NEP/NS2.

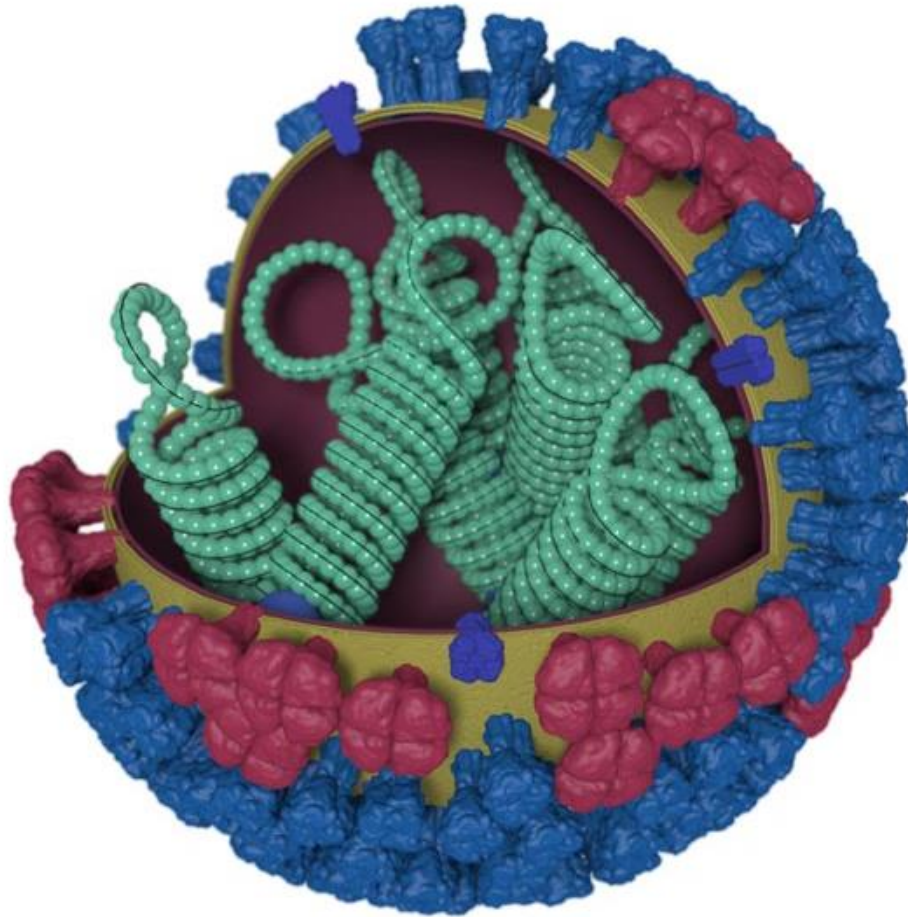
### Virioni influenza B:

- 4 proteine nel pericapside: HA, NA, NB, and BM2.
- Come la proteina M2 dell' influenza A, la proteina BM2 è un canale di protoni essenziale per il processo uncoating.
- La proteina NB è un canale ionico non essenziale per la replicazione in coltura cellulare.



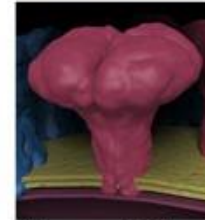
- Virioni: sferici (pleiomorfismo);
- 80-120 nm (diametro); 200-300 (-3000) nm in lunghezza.
- Protuberanze in superficie, disperse (clusters di 500), glicoproteine (4-5/1, H/N).
- sensibili al calore, solventi, detergenti non-ionici, formaldeide, ossidanti.

# AN INFLUENZA VIRUS



Antigenic sites

Hemagglutinin



Neuraminidase



M2 ion channel

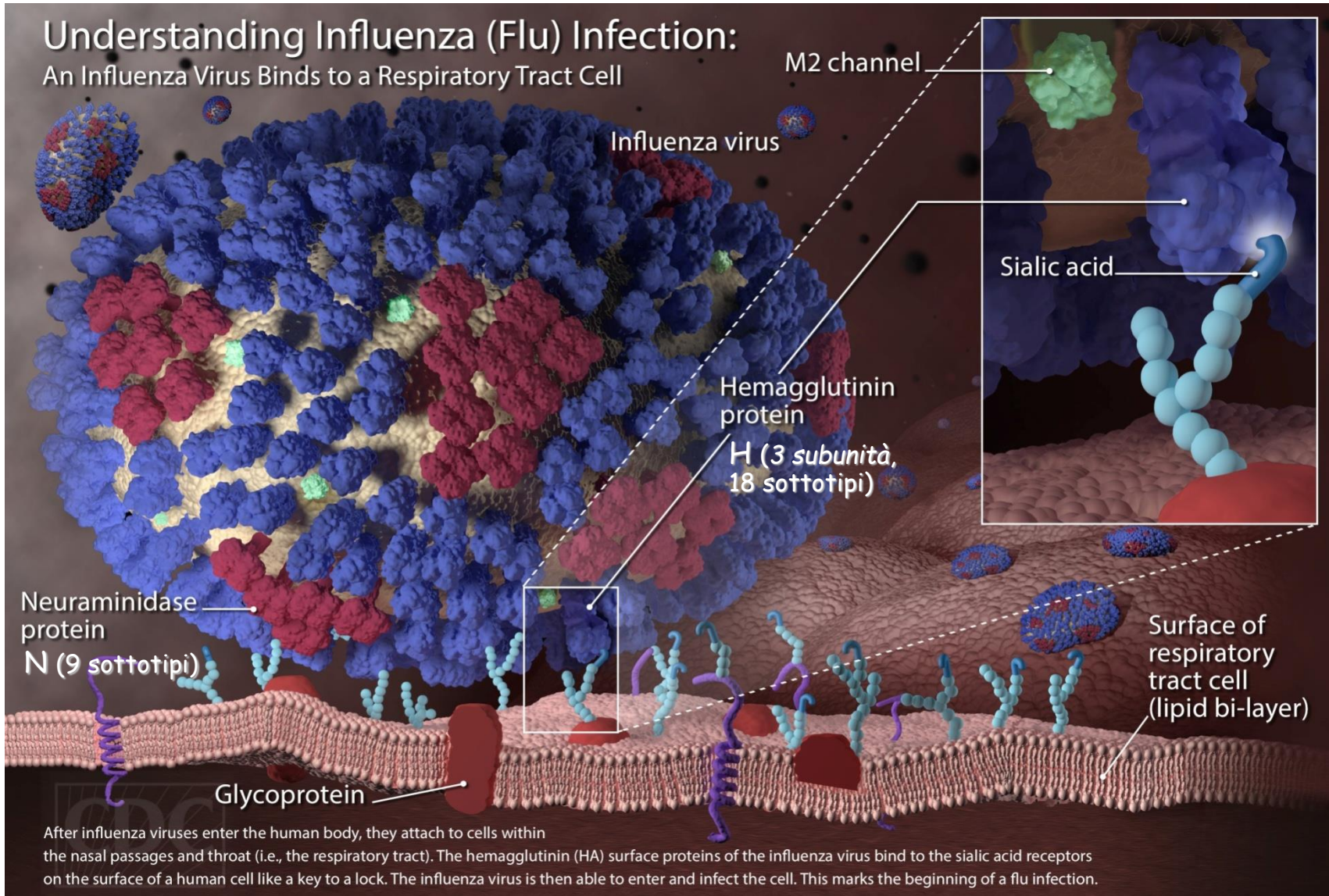


Ribonucleoprotein



# Understanding Influenza (Flu) Infection:

An Influenza Virus Binds to a Respiratory Tract Cell



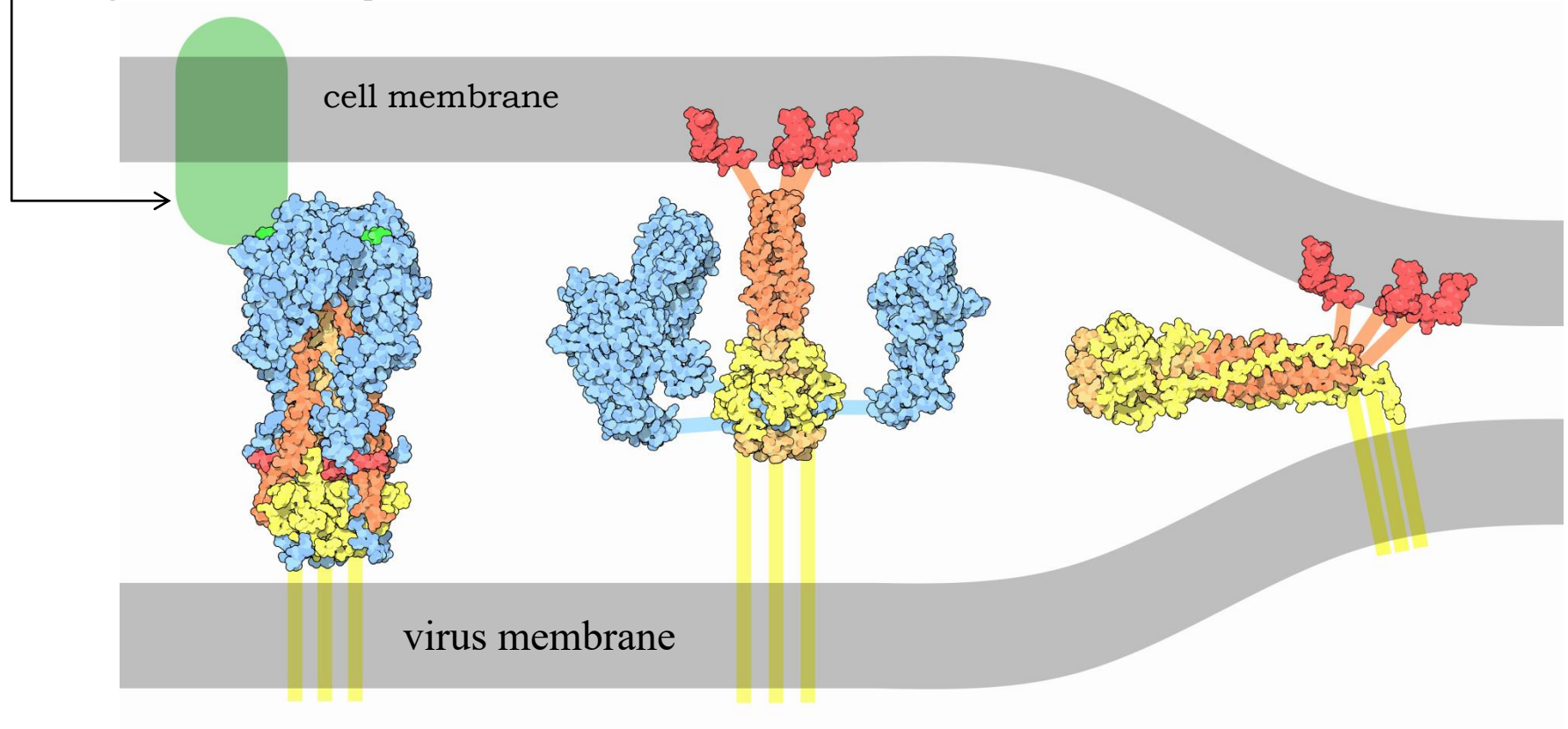
<https://www.youtube.com/watch?v=YSgkoldBNkI>

0.20-2.20

<https://www.youtube.com/watch?v=7OmiOIPkNpY>

1,50-3,30

sugars on cellular proteins

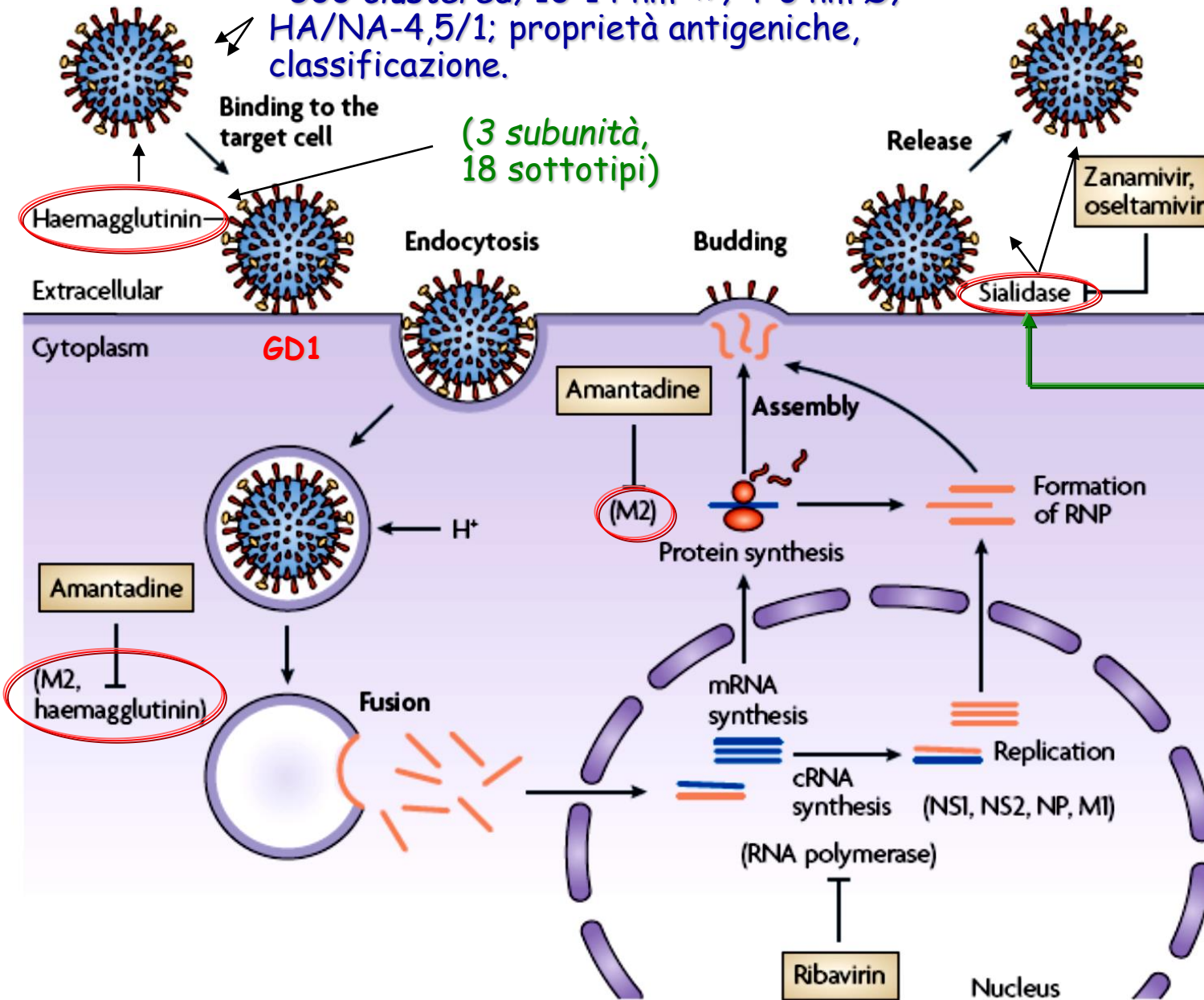


cell membrane

virus membrane



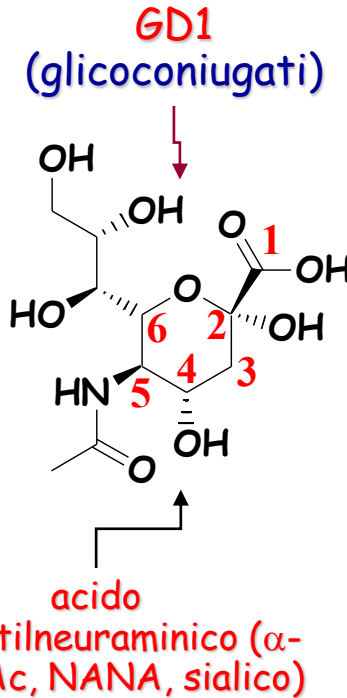
~500 clustered; 10-14 nm ⇔; 4-6 nm Ø;  
 HA/NA-4,5/1; proprietà antigeniche,  
 classificazione.



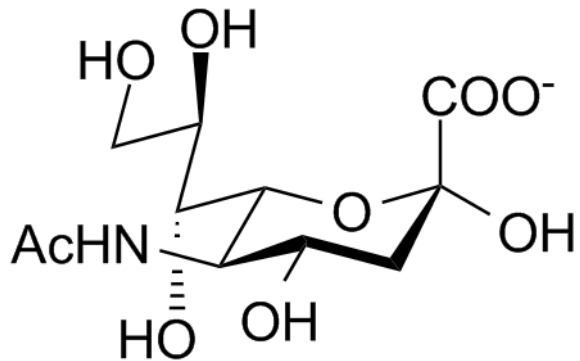
(3 subunità,  
 18 sottotipi)

Glicoproteine  
 di superficie  
 carbohydrate-  
 recognizing

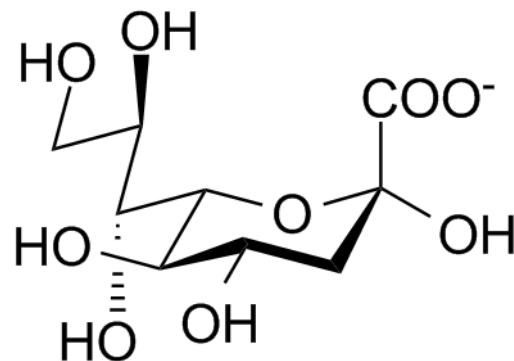
Nota anche  
 come  
 neuraminidasi  
 exoglicoidrolasi  
 (4 subunità, 5  
 sottotipi)



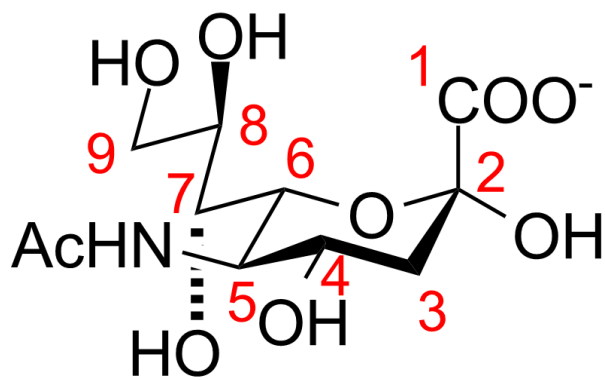
La presenza di acido sialico nel muco associato alle membrane mucose è una barriera alla propagazione di infezioni.



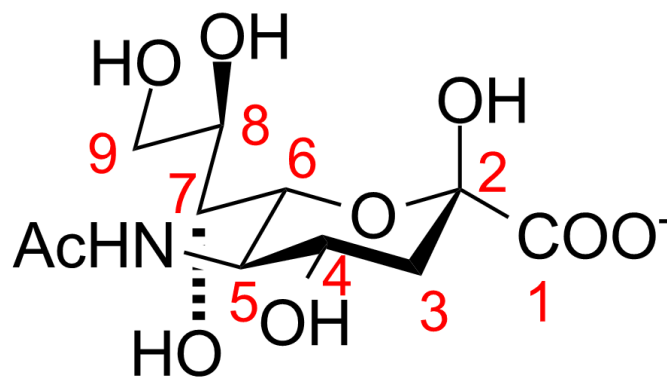
N-Acetylneuraminic acid  
Neu5Ac  
(NANA)



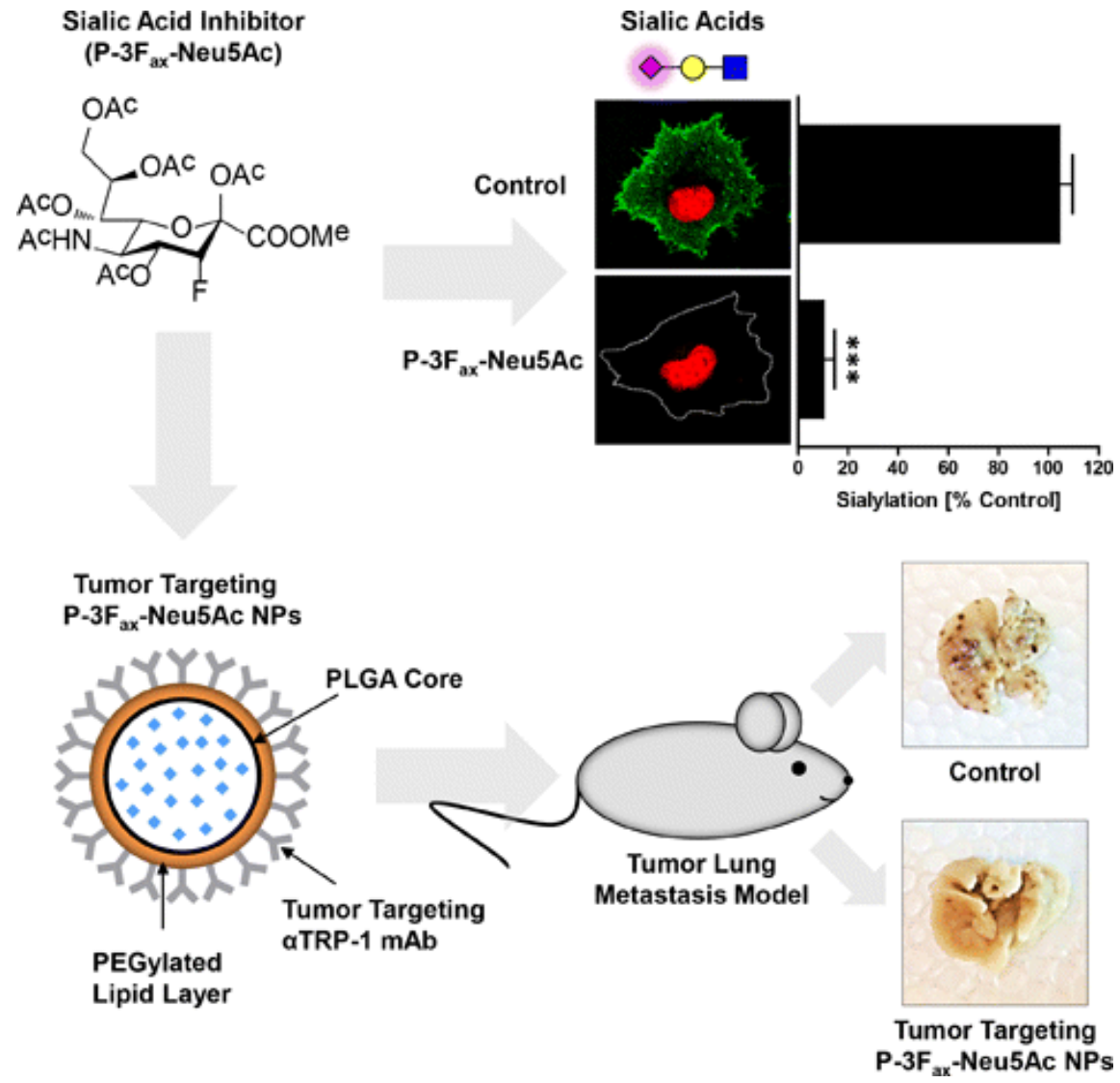
2-Keto-3-deoxynonic acid  
Kdn



$\alpha$ -anomer

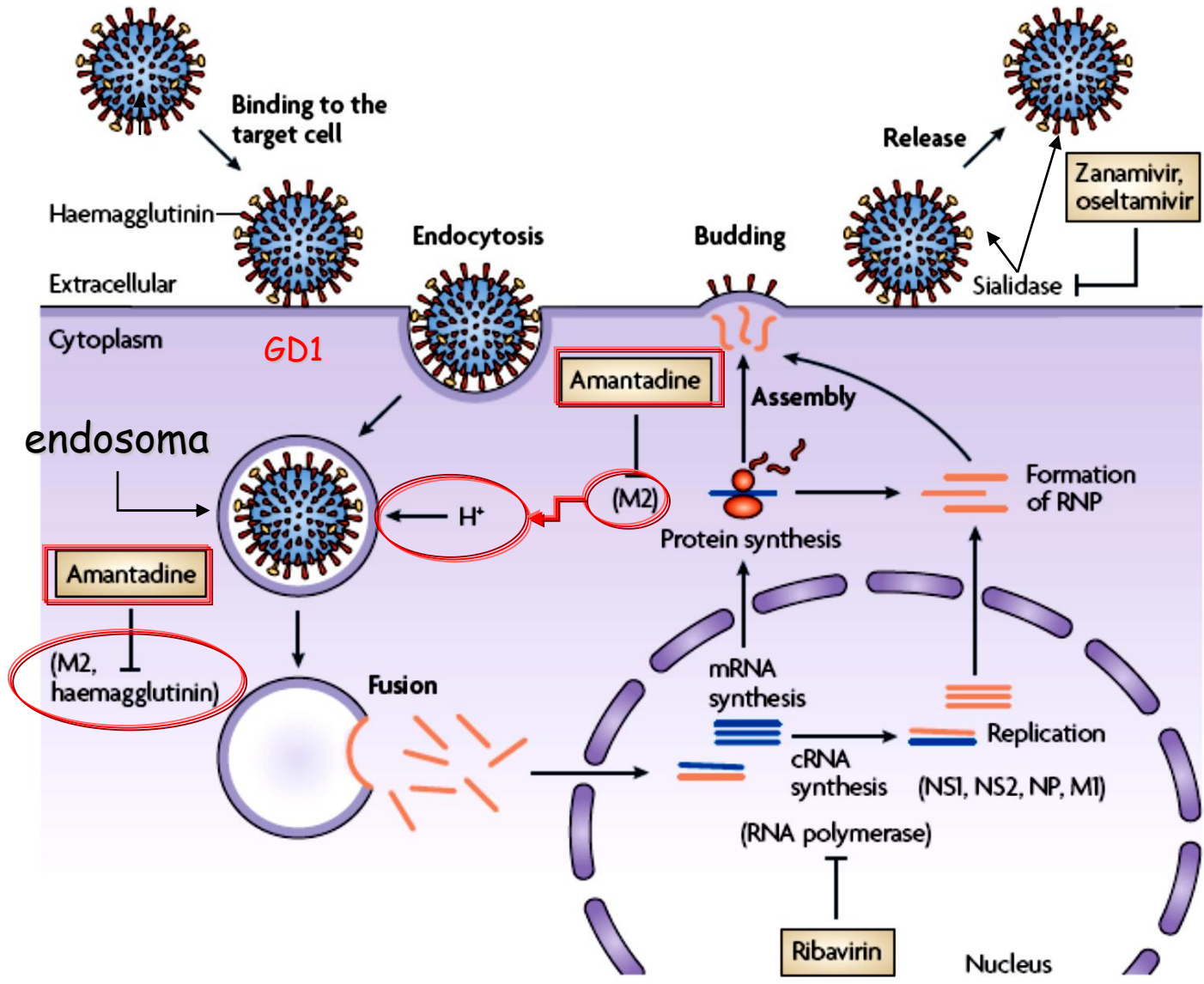


$\beta$ -anomer



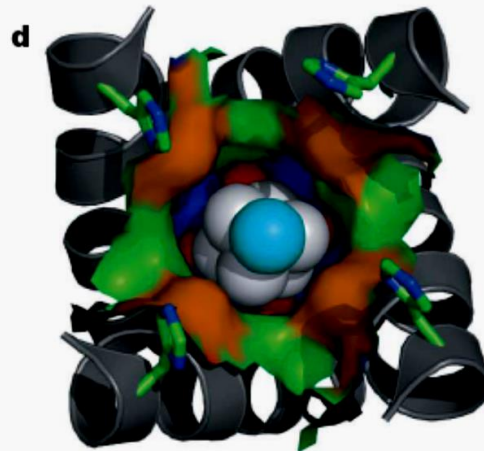
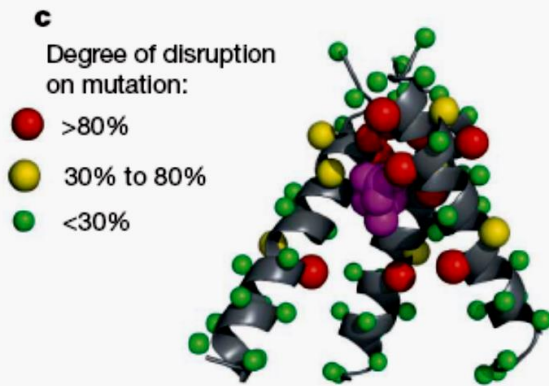
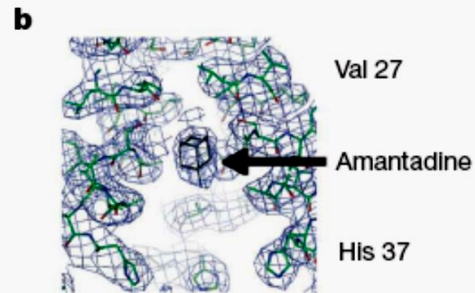
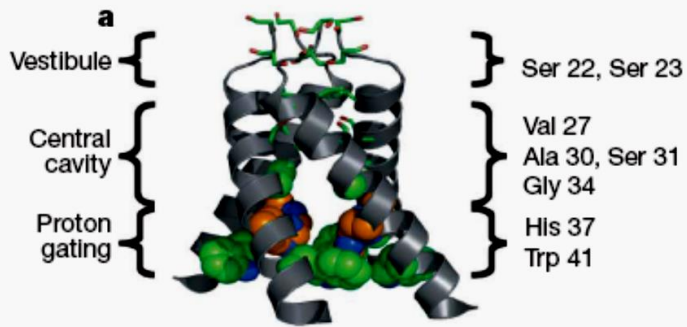
Targeted Delivery of a Sialic Acid-Blocking Glycomimetic to Cancer Cells Inhibits Metastatic Spread *ACS Nano*, 2015, 9 (1), pp 733–745

**Proteina M2: canale H<sup>+</sup> (pH attivato); p. omotetrameric, transmembranale**



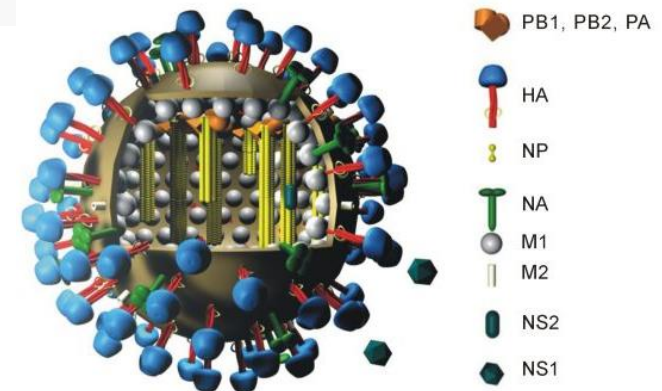
La proteina M2 media l'acidificazione della regione interna della particella virale intrappolata nell'endosoma.

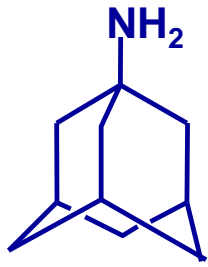




M2 consiste di 3 segmenti proteici (97a.a.) **(i)** un dominio N-terminale extracellulare (1-23); **(ii)** un dominio transmembrana (TM) (24-46); **(iii)** un dominio C-terminale intracellulare (47-97); il dominio TM forma il poro del canale ionico (**target Amantadine e Rimantadine**).

perturbazione del pKa del residuo critico His

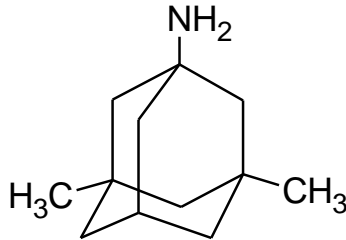




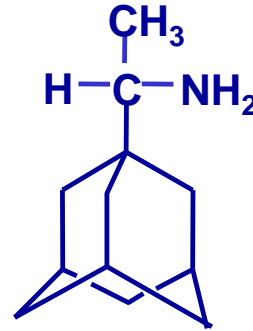
## AMANTADINA

1-adamantilammina  
(*Mantadan*)

1-adamantilammina



**Memantina** (AD/PD; antagonista NMDA)  
(*Ebixa, Ezemantis, Marixino, gen.*)



## RIMANTADINA

(*RS*)-1-(1-adamantyl)  
etanammina

*Flumadine*, in USA  
(non disponibile in Italia)

## MECCANISMO D'AZIONE

**Amantadina:** blocco della proteina M2 del virus dell'influenza A.

**Rimantadina:** blocco della proteina M2 del virus dell'influenza A possibile interferenza con il ciclo replicativo virale (ruolo di una proteina virale espressa dal gene virale M2)

## USI TERAPEUTICI

Profilassi per os (virus influenzale A). **Efficacia del 70-90%** nel prevenire l'influenza.

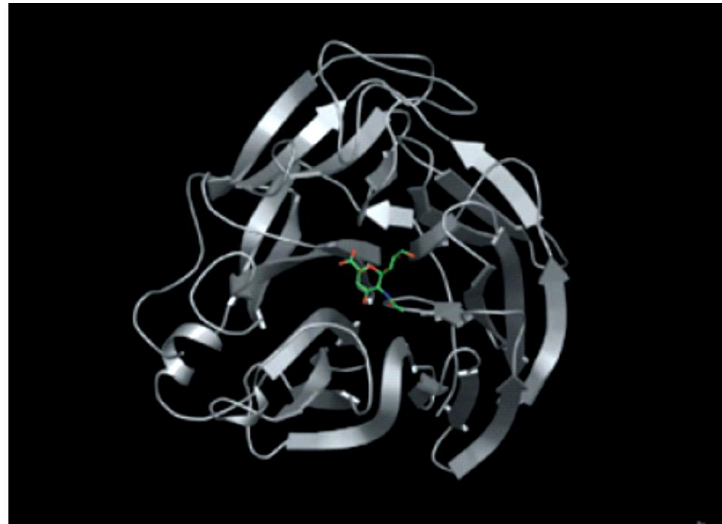
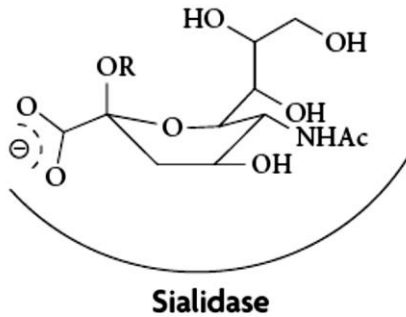
**Entro 48 ore** dall'avvenuto contagio, limitano **la sintomatologia** riducendo significativamente frequenza e gravità delle complicanze respiratorie.

Non presentano attività contro il virus dell'influenza B.

Resistenza a questi farmaci (umani, uccelli, suini) > del 90%

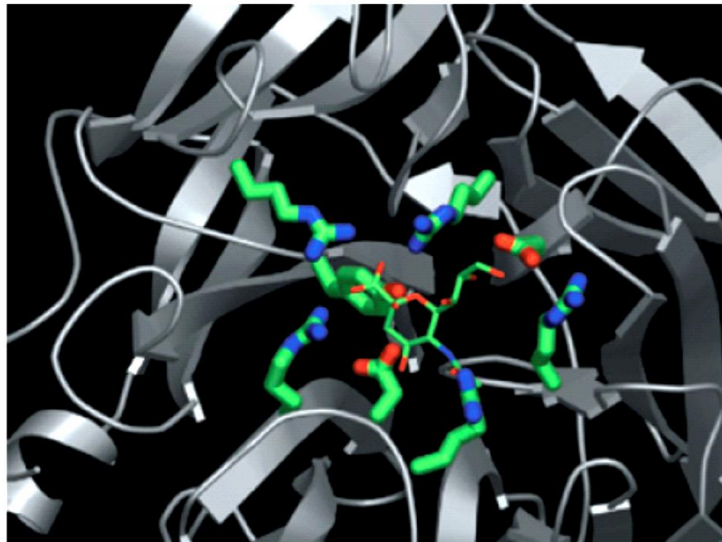
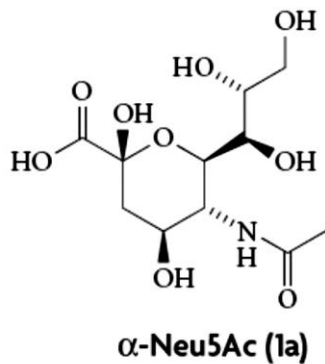
# Strutture X-ray ad alta risoluzione di complessi tra **sialidasi** e piccole molecole di inibitori incluso Neu5Ac

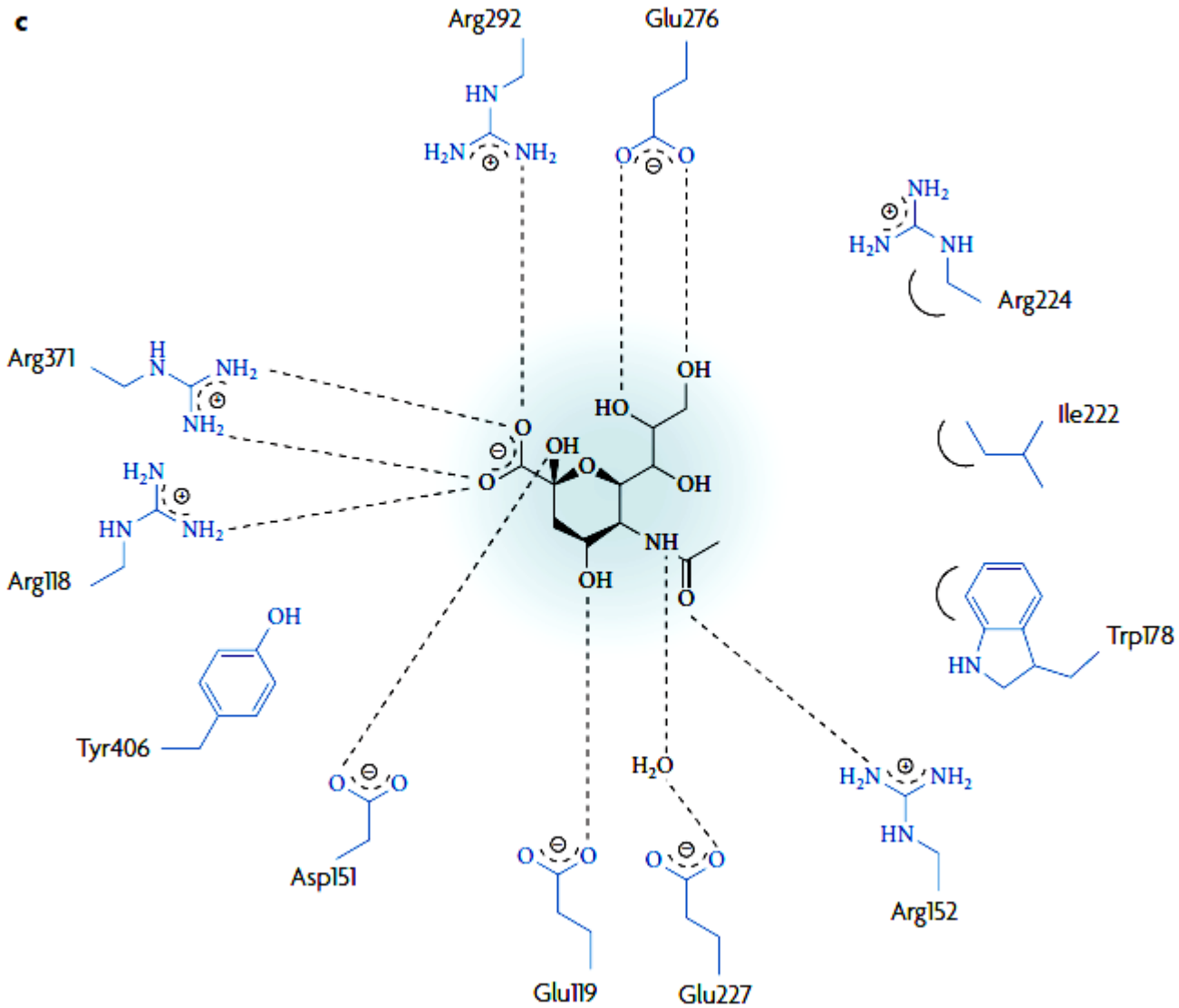
**a**



**8 aa** altamente conservati + ulteriori **10 aa** invariati, in tutti i ceppi di virus influenzali, in prossimità del sito attivo

**b**





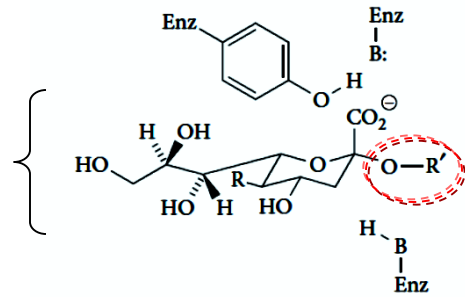
The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors.  
 Nature Reviews Drug Discovery, volume 6, december 2007

residui terminali di Neu5Ac legati ( $\alpha$ -chetali\*)

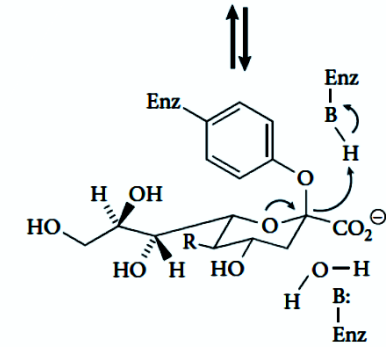
meccanismo enzimatico della sialidasi del virus dell'influenza:

- facilita il rilascio della progenie dei virioni;
- facilita la mobilità dei virioni nel tratto respiratorio

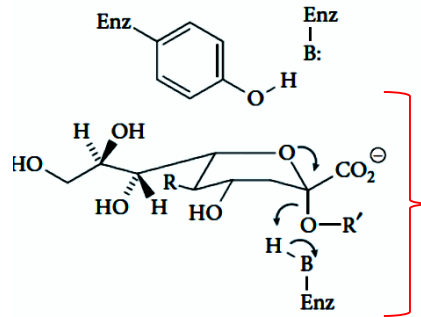
\* Conformazione a semisedia distorta



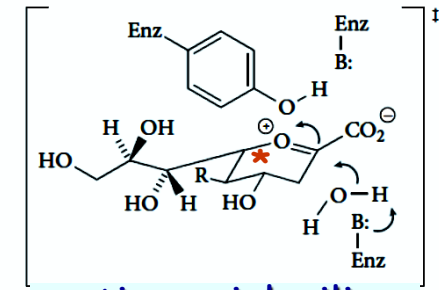
R = NHAc



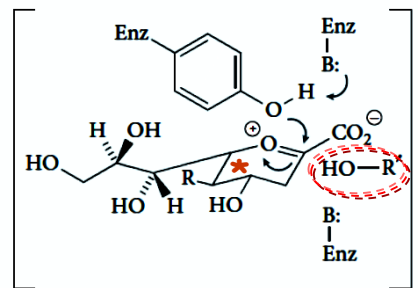
glicosil-enzima intermedio



semisedia distorta

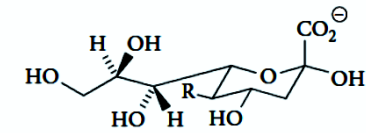


catione sialosilico

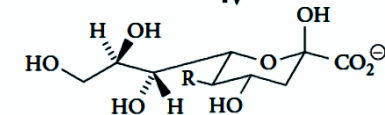


catione sialosilico

anomero  $\alpha$



1a



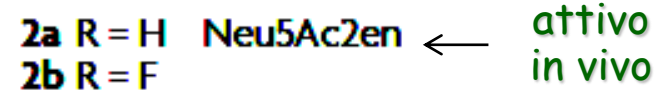
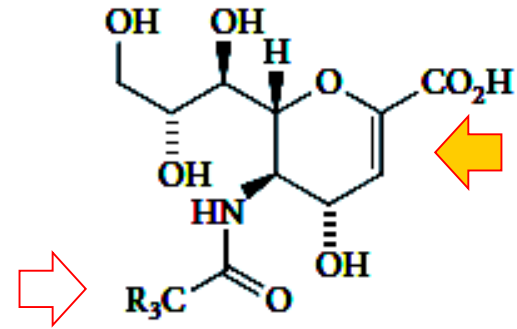
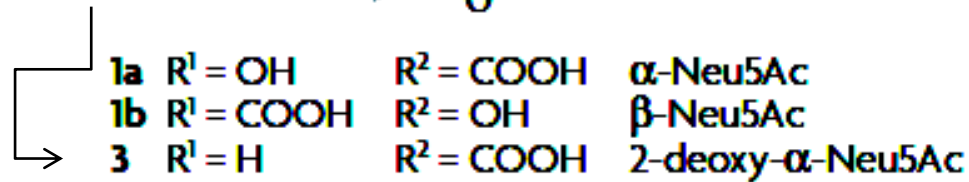
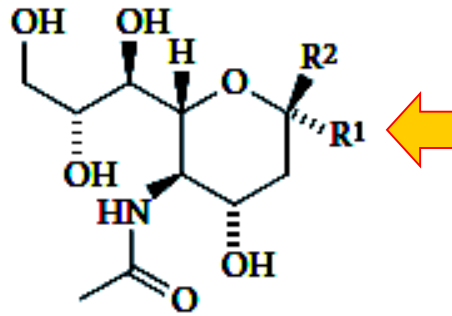
1b

anomero  $\beta$

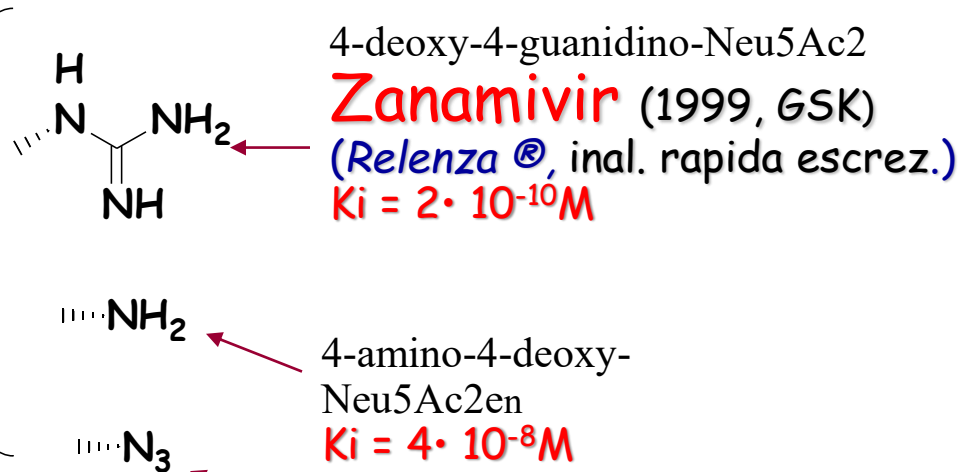
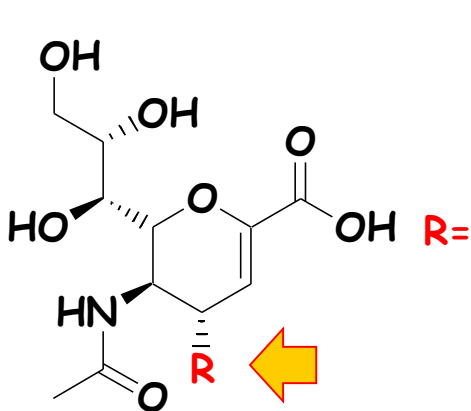


# Structure-based inhibitor design

I° composto attivo in vivo

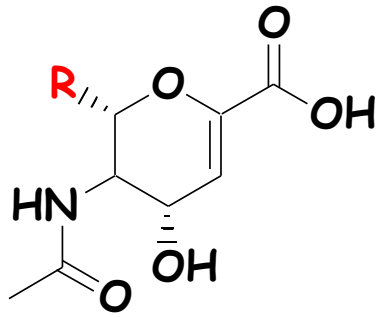


non attivo in vivo  
( $K_i = 4 \cdot 10^{-6} M$ )

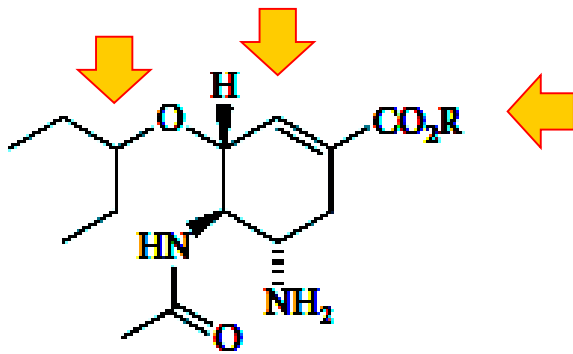


Inibitori, in vitro ed in vivo, della replicazione virale nell'influenza A e B

Intermedio di sintesi



R = X-alcyle, arile, ...  
X → O, N, S

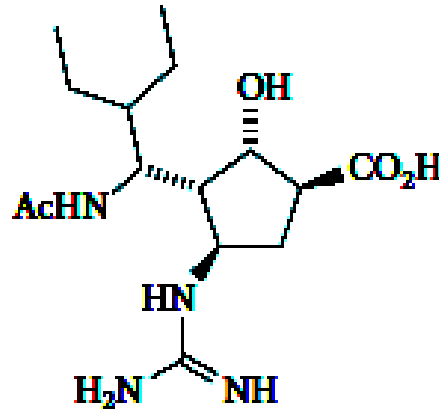


**8** R = H GS4071  
**11** R = Et GS4104, Oseltamivir

**Oseltamivir**

Gilead Sciences- Roche  
(*Tamiflu*)

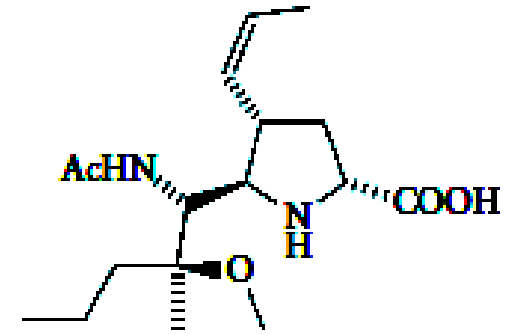
Prodrug → acido (h.l. 6-10 hr)



**Peramivir**

1812

Bio Csl Inc  
(*Rapivab*. 2014)



**10**

A-315675

<i>Timeline</i>	<i>Regulatory landmark</i>
October 1999	US FDA approved the oseltamivir for treatment of influenza in adults <sup>[1]</sup>
November 2000	US FDA approved the oseltamivir for prophylaxis of influenza in patients 13 years and older <sup>[1]</sup>
December 2000	US FDA extended use of oseltamivir for treatment of patients 1-year and older, symptomatic for not more than 2 days <sup>[1]</sup>
December 2000	Oseltamivir was approved for the treatment of influenza in adults and adolescents in Japan <sup>[1]</sup>
December 2001	Oseltamivir's use as treatment of influenza was extended to include children more than 40 kg in Japan <sup>[1]</sup>
June 2002	EMA approved oseltamivir for treatment of influenza in patients 1-year and older <sup>[1]</sup> EMA approved the oseltamivir for prophylaxis of influenza in patients 13 years and older <sup>[1]</sup>
July 2004	Japan expanded use of oseltamivir as prophylaxis of influenza in adults and adolescents <sup>[1]</sup>
October 2005	Oseltamivir approved for influenza in India <sup>[2]</sup>
May 2009	WHO prequalified a generic version of oseltamivir "Antiflu" under its prequalification program <sup>[3]</sup>
June 2010	India approved the oseltamivir for the treatment of children 6-12 months of age during a pandemic influenza outbreak <sup>[4]</sup>
December 2012	US FDA approved the oseltamivir for treatment of infants 2 weeks or older, symptomatic for not more than 2 days <sup>[5]</sup>

US FDA=US food and drug administration, EMA=European medicines agency, WHO=World health organization

A cocktail of pandemic panic, publicity propaganda, and scientific misconduct turned a new medicine with only modest efficacy into a blockbuster. It appears that the multiple regulatory checks and balances gave way as science lost its primacy and pharmaceutical enterprise lost no time in making the most of it.

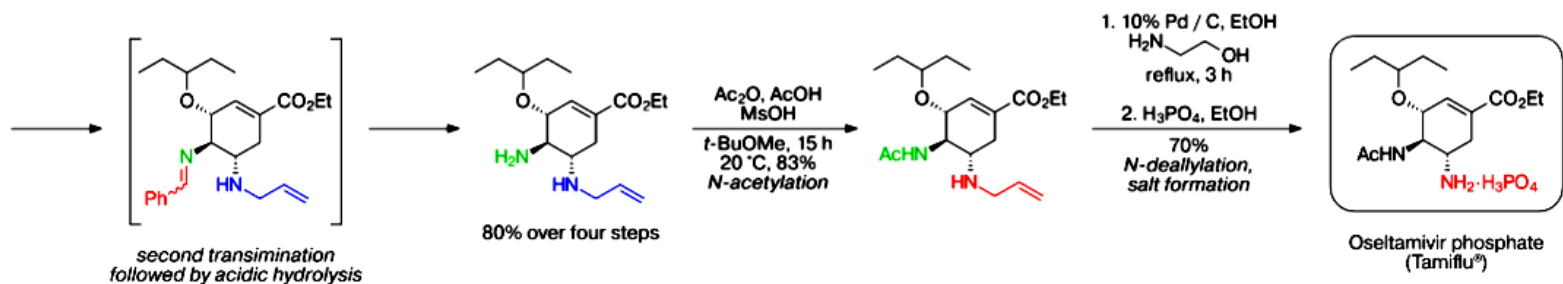
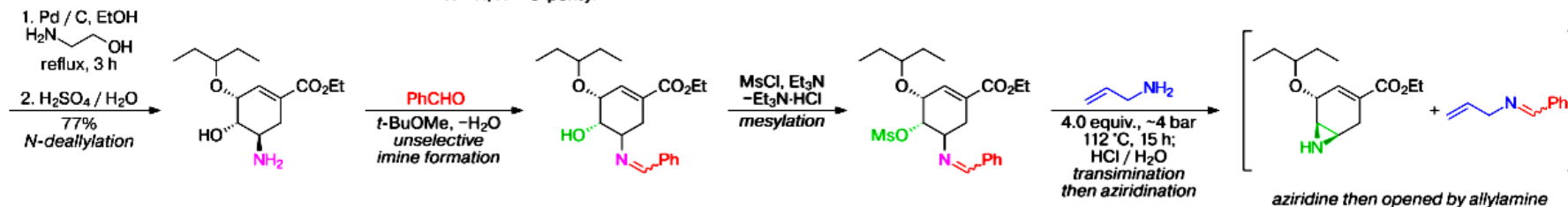
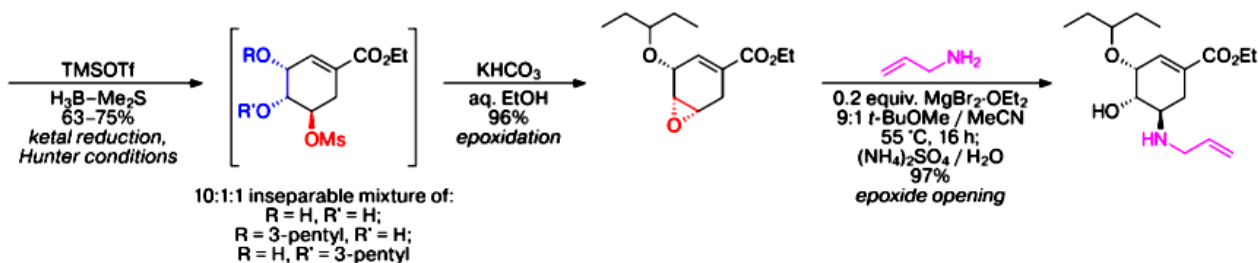
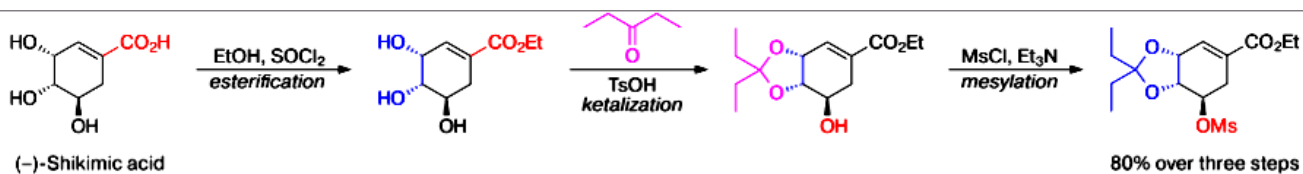
This reminds one of Prof R. P. Feynman's statements after Challenger space shuttle disaster.

“Reality must take precedence over public relations as nature can't be fooled”

The Tamiflu fiasco and lessons learnt. Indian J Pharmacol. 2015 Jan-Feb; 47(1): 11–16.



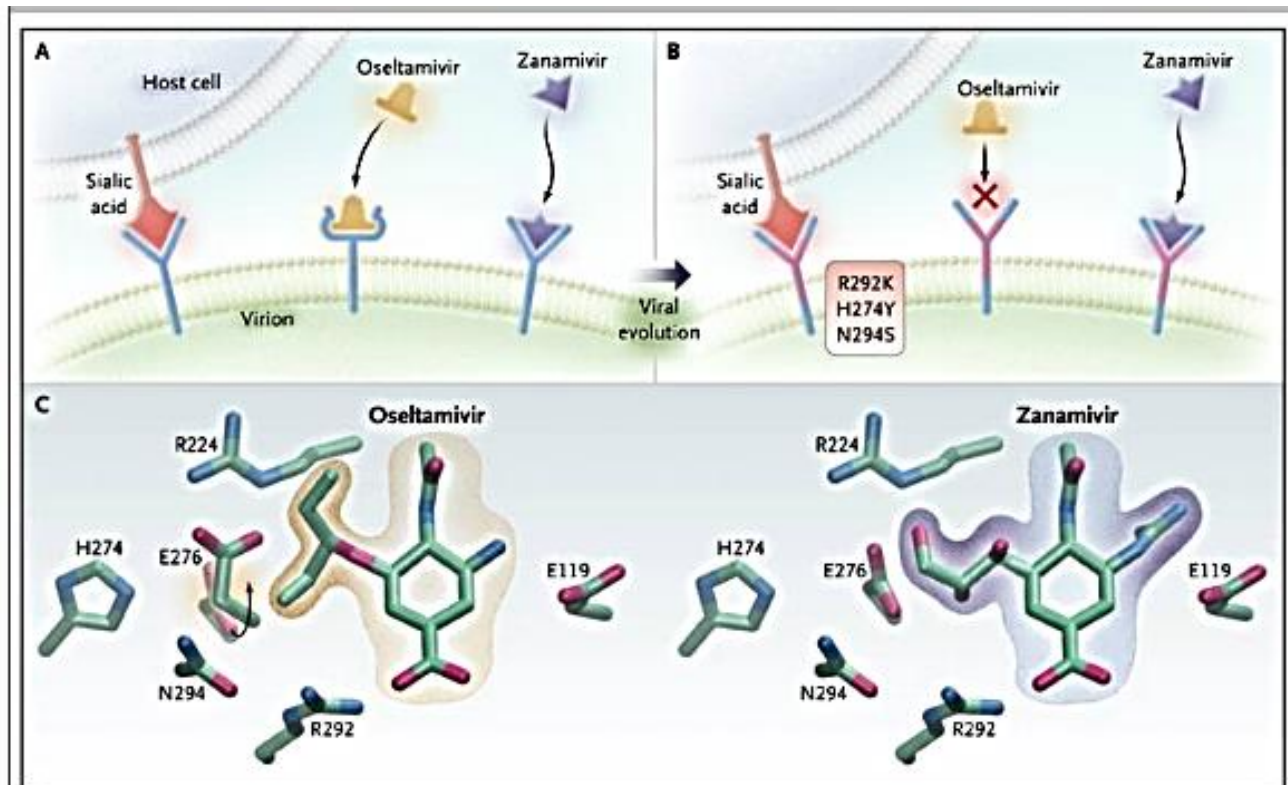
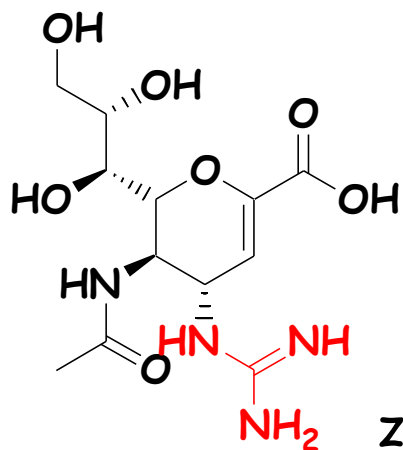
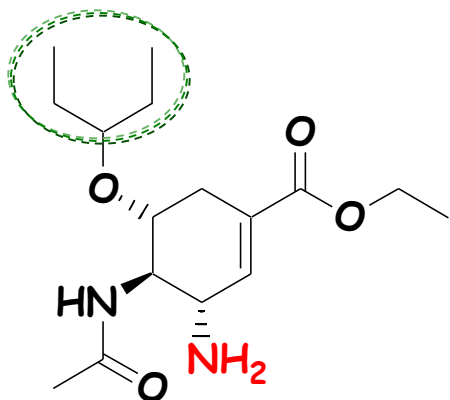
# Trussardi synthesis



# Resistenza all'oseltamivir

n engl j med 360;10; march 5, 2009

[http://www.nejm.org/action/showMediaPlayer?doi=10.1056%2FNEJM Mp058291&aid=NEJMp058291\\_attach\\_2&area=](http://www.nejm.org/action/showMediaPlayer?doi=10.1056%2FNEJM Mp058291&aid=NEJMp058291_attach_2&area=)



Perché oseltamivir possa collocarsi nel sito attivo della neuraminidasi, gli aminoacidi devono modificare la loro conformazione per accomodare il gruppo idrofobico; mutazioni che limitano questo riarrangiamento generano resistenza. Nell'inverno 2008 il ceppo circolante di influenza A (H1N1) risultò resistente all'oseltamivir.

## A Multidrug Strategy for the Future.

Over time, influenza viruses will probably develop resistance to any single antiviral agent. Treatment with several compounds that act at different stages of the viral life cycle would be more effective and make it less likely that any single mutation could confer resistance. This strategy may become feasible as new agents, such as the following, become available<sup>1</sup>:

**Intravenous zanamivir:** A therapy for patients hospitalized with severe influenza and for those in whom neither oral nor inhaled routes are an option

**Peramivir:** An as-yet-unlicensed neuraminidase inhibitor that is being developed in intravenous and intramuscular formulations

**Long-acting inhaled neuraminidase inhibitors:** A therapy based on the enhanced potency of dimeric derivatives of zanamivir that will probably be available in the next few years; administration may be possible in a single dose for treatment or once a week for prophylaxis

**Fludase (DAS181):** A sialidase fusion construct that cleaves the sialic acid receptors that influenza viruses use for attachment, removing influenza receptors from the airway epithelium and preventing infection of lung cells

**Cyanovirin-N:** A hemagglutinin inhibitor that may block viral entry

**Short interfering RNAs:** A therapy that may hold promise for influenza

**T-705:** A substituted pyrazine compound that is active against neuraminidase-inhibitor-resistant and amantadine-resistant viruses and that probably inhibits the RNA polymerase

The recent discovery of the active site of a key endonuclease activity in the PA subunit of the influenza polymerase molecule could lead to a new class of drugs targeting the essential polymerase function of "cap-snatching."<sup>5</sup> Other promising antiviral avenues under investigation include signal transduction inhibitors, interferon inducers, and molecules targeting the interaction between the influenza NS1A protein and the 30-kD subunit of cleavage and polyadenylation specificity factor.

*Rapivab* (approvazione FDA 22 Dic 2014, i.v.)

Proteina ricombinante di fusione (*actinomyces viscous*, flora cavo orale e gastrointestinale) con dominio catalitico della sialidasi → rimozione recettori sialici, potente antivirale ad azione protettiva vs cellule epitelio respiratorio (fase III, inalaz.)

Proteina (cianobatterio *Nostoc ellipsosporum*) attiva vs HIV (GP120/41)

