

Gripa in inhibitorji virusne nevraminidaze

Influenza and viral neuraminidase inhibitors

Tanja Rozman Peterka, Marija Sollner Dolenc

POVZETEK: Gripa oz. influenza je visoko infektivna respiratorna bolezen, ki povzroča periodične epidemije in pandemije. Cepiva zaradi velike antigenske variabilnosti virusa influence zagotavljajo le delno zaščito, protivirusna terapija z amantadinom in rimantadinom pa ni široko uporabna zaradi omejenega spektra delovanja, stranskih učinkov in hitrega razvoja rezistence. Nove možnosti za nadzor influence so inhibitorji encima nevraminidaze-b sialidaze. Encim je nujen za virusno replikacijo in infektivnost, njegovo aktivno mesto pa je ohranjeno pri vseh podtipih virusa influence A in B. Uspešen pristop pri razvoju učinkovitih inhibitorjev virusne nevraminidaze je bilo racionalno načrtovanje spojin s pomočjo poznavanja mehanizma delovanja encima, njegove kristalne strukture in kompleksa s substratom ter inhibitorji in z uporabo računalniškega molekulskega modeliranja. Z razvojem učinkovitih in selektivnih inhibitorjev virusne nevraminidaze, kot sta zanamivir in oseltamivir, je encim postal pomembna tarča za zdravljenje in preprečevanje infekcij, povzročenih z virusi influence.

Ključne besede: influenza, sialidaza, nevraminidaza, zanamivir, oseltamivir

ABSTRACT: Flu or influenza remains a very serious respiratory illness. It is highly infective and causes periodic epidemics and pandemics. Protection against influenza through vaccination is limited due to the antigenic variation of the influenza virus, while the use of older antiviral agents amantadine and rimantadine is limited because of lack of activity against influenza B viruses, unfavorable tolerability and rapid emergence of resistance. Influenza neuraminidase inhibitors comprise a potent new compound class that was specifically designed to target the active site of the neuraminidase - sialidase enzyme, which is conserved across all type A and B influenza neuraminidase subtypes. The enzyme is essential for virus replication and infectivity. The successful strategy which has resulted in the development of potent influenza virus sialidase inhibitors relies on several factors: the information from the X-ray crystallographic studies of influenza virus sialidase; rational drug design techniques like molecular modelling and advances in computational chemistry analysis; and an understanding of the enzyme mechanism. Influenza neuraminidase has been validated as a target for the development of anti-influenza drugs as demonstrated by the efficiency and selectivity of zanamivir and oseltamivir in the treatment and prevention of influenza virus infections.

Key words: influenza, sialidase, neuraminidase, zanamivir, oseltamivir

1 Uvod

Influenca, splošno znana kot gripa, je ena izmed najstarejših in najbolj pogostih bolezni pri človeku. Je visoko infektivna bolezen, ki povzroča periodične epidemije in pandemije (1). V prejšnjem stoletju so zabeležili kar tri velike pandemije influence leta 1918, 1957 in 1968. Največja med njimi, imenovana »španska gripa«, je med leti 1918-1919 zahtevala preko 40 milijonov mrtvih, kar je več, kot je bilo umrlih med prvo svetovno vojno (2). »Azijska influenza« leta 1957 in pandemija leta 1968 pa sta samo med prebivalci Združenih držav Amerike povzročili okoli 100 000 smrtnih primerov (3). Zaradi velikega števila obolelih v času epidemij in pandemij ter precejšnje smrtnosti povzroča influenza ogromne izgube v gospodarstvu (1, 2).

Influenca je akutna bolezen, ki jo povzročajo virusi influence tipa A in B. Širijo se po zraku, v obliki kapljic in prizadenejo respiratorni sistem. Simptomi, poleg respiratornih težav, vključujejo oslabelost, bolečine v mišicah in povišano temperaturo od 38 do 40 °C (1, 4). Najpogostejši zaplet povezan z influenco je pljučnica. Tveganje za smrt zaradi zapletov je signifikantno večje pri rizičnih skupinah, kot so starejši

ljudje, dojenčki in ljudje s kroničnimi obolenji pljuč ter boleznimi srca (1, 5). Svetovna zdravstvena organizacija je zaradi velike obolevnosti, smrtnosti in izgub v gospodarstvu vzpostavila sistem nadzora nad gripo (6). Vsako leto poskušajo oceniti antigenske spremembe virusa influence in izdelati primerno cepivo (1). Vendar so možnosti za nadzor influence omejene. Cepivo zaradi velike antigenske variabilnosti virusa influence zagotavlja le delno zaščito, zato je potrebno stalno spremljanje virusov, njihove spremenljivosti, dopolnjevanje cepiva in revakcinacija ljudi (4). Protivirusna terapija s prvo generacijo protivirusnih zdravil proti influenci, amantadinom in njegovim derivatom rimantadinom (inhibitorji ionskih kanalčkov v virusni ovojnici, ki preprečujejo sproščanje virusnih ribonukleoproteinov), ni široko uporabna zaradi omejenega spektra delovanja le na viruse influence tipa A, stranskih učinkov na centralni živčni sistem in hitrega razvoja rezistence (4, 7, 8). Nove možnosti pri zdravljenju in preventivi gripe je ponudilo odkritje, da je aktivno mesto encima virusne nevraminidaze- sialidaze ohranjeno pri različnih podtipih virusov influence (9). Encim je nujen za virusno replikacijo in infektivnost, njegovo aktivno mesto pa ostaja ohranjeno tudi med genskimi spremembami.

Tanja Rozman Peterka, mag. farm., LEK farmacevtska družba d. d., Razvoj in raziskave, Verovškova 57, Ljubljana; izr. prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm., Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, Ljubljana

Pregledni članki - Review Articles

Encim nevraminidaza je postal tako pomembna tarča pri razvoju protivirusnih zdravil za zdravljenje in preprečevanje influence (4).

1.1 Virusi influence

Virusi influence spadajo v družino virusov *Orthomyxoviridae*. Delimo jih na tipe A, B in C, vendar sta klinično pomembna le tipa A in B (10). Virusi influence tipa A lahko okužijo živali in človeka, medtem ko je tip B patogen le za človeka (4, 11). Viruse influence tipa A delimo na več podtipov, ki se razlikujejo v sestavi glikoproteinov hemaglutinina (HA) in nevraminidaze (NA), ki se nahajata na površini virusa (10, 12). Poznamo 15 različnih HA (H1-H15) in 9 NA (N1-N9) (4, 11), kombinacijo le-teh pa uporablja kot osnovni princip za označevanje tipov in podtipov virusov influence tudi Svetovna zdravstvena organizacija in je pomembna pri epidemioloških analizah ter razločevanju virusov (1). Trenutno prisotni podtipi človeških virusov influence imajo pretežno kombinacijo treh različnih hemaglutininov (H1, H2 in H3) in dveh nevraminidaz (N1 in N2) (3). **Hemaglutinin (HA)** omogoča vezavo virusa na receptor, ki vsebuje sialno kislino in se nahaja na površini tarčne celice v respiratornem traktu. Omogoči zlitje virusne in celične membrane gostiteljske celice. Je glavna tarča protiteles in s tem tudi cepiv (4). **Nevraminidaza (NA)** oz. **sialidaza** je encim, ki cepi terminalno sialno kislino na receptorju gostiteljske celice za hemaglutinin in s tem omogoča sproščanje novo nastalih virusov iz gostiteljeve celice ter preprečuje njihovo agregacijo (4).

Virusi influence so podvrženi pomembni variabilnosti glikoproteinov, ki se nahajajo na površini virusa (HA in NA). Okužba ali vakcinacija z enim podtipom virusa daje le malo ali nič zaščite proti drugim različnim podtipom virusov influence, zato ne moremo doseči trajne imunizacije. Genetske spremembe so vzrok epidemij, ki se pojavijo, ko nastane nova variacija virusa (4). Vsako leto cepivo temelji na tistih podtipih virusov influence, za katere pričakujejo, da se bodo pojavili tisto sezono. Cepljenje priporočajo za populacijo ljudi s povečanim tveganjem, to so starejši ljudje, ljudje s kroničnimi obolenji pljuč in boleznimi srca. Občasno pa pride do takšnih genetskih sprememb virusa, ki zelo povečajo njegovo virulentnost, spremljen virus je usoden ne le za rizično skupino ljudi, ampak za širšo populacijo sicer zdravih ljudi (13, 14).

Poznamo dva načina, ki privedeta do antigenih sprememb (4, 10). **Antigeni odmik** (*antigenic drift*) je kopičenje točkovnih mutacij. Posledice so spremembe v aminokislinskem zaporedju na antigenih mestih hemaglutinina in/ali nevraminidaze. Te spremembe zmanjšajo vezavo protiteles in zato zmanjšujejo obstoječo imunost v populaciji. Vzrok je nastanek epidemij. Antigeni odmik se pojavlja pri

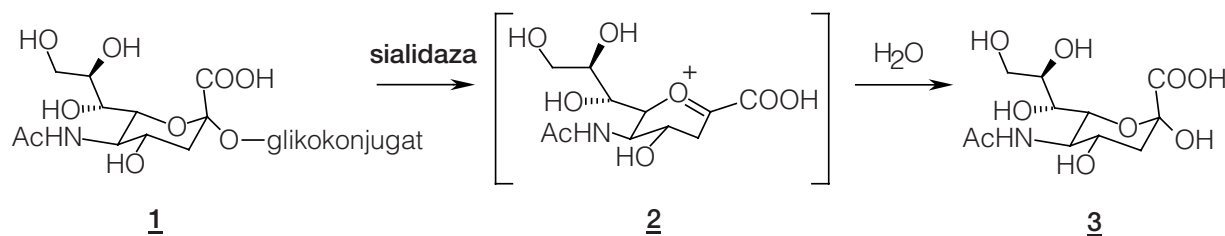
obeh tipih virusov influence (A in B). **Antigeni premik** (*antigenic shift*) je bolj dramatična in nenadna sprememba, ki se pojavi v hemaglutininu in/ali nevraminidazi le pri virusih influence tipa A. Spremembe so posledica nadomestitve celotnega virusnega gena z zapisom za HA ali NA z genom iz živalskega virusa influence (npr.: ptičjega). Ker je v populaciji malo ali nič imunosti proti takšnim variacijam virusa, nastanejo pandemije, ki imajo za posledico visoko obolevnost in tudi smrtnost.

Za razliko od hemaglutinina je aminokislinsko zaporedje v aktivnem mestu nevraminidaze zelo malo spremenjeno med antigeno zelo različnimi podtipi virusov influence. Kljub temu, da večji del NA variira med posameznimi podtipi virusov influence, kristalografske analize kažejo, da aminokislinsko zaporedje in tridimenzionalna struktura aktivnega mesta nevraminidaze ostaja ohranjena (4). Vseh 11 aminokislinskih ostankov, ki določajo in omejujejo žep v aktivnem mestu encima, tvori interakcije s substratom.

1.2 Encim nevraminidaza

Nevraminidaza oz. sialidaza je glikoprotein - encim, ki se nahaja na površini virusa influence tipa A in B. Ima pomembno vlogo pri virusni replikaciji in njegovi infektivnosti (8, 15). Encim katalizira cepitev $\alpha(2-6)$ - ali $\alpha(2-3)$ -glikozidne vezi med terminalno sialno kislino (N-acetilnevraminsko kislino) in sladkornim ostankom (8, 10) (slika 1). Cepitev te vezi je nujna za širjenje virusa po dihalnih poteh, saj omogoča sproščanje virusov iz okužene celice in preprečuje agregacijo sproščenih virusov.

Aktivno mesto nevraminidaze vsebuje večje število polarnih in ioniziranih aminokislin, ki interagirajo s polarnim substratom - sialno kislino (9). Vsi aminokislinski ostanki nevraminidaze, ki interagirajo s substratom, so ohranjeni pri obeh tipih virusov influence (9). S temi aminokislinskimi ostanki tvorijo interakcije tudi kompetitivni inhibitorji. Negativno nabita karboksilna skupina substrata in inhibitorjev tvori ionske interakcije z Arg triado (Arg 118, 292 in 371), N-acetilna skupina pa tvori polarne in nepolarne interakcije z Arg 152, Trp 178 in Ile 222 (15). Aktivno mesto nevraminidaze lahko razdelimo na tri večje dobro definirane vezavne žepe. **Žep 1** vsebuje polarne ostanke Glu 276, Glu 277, Arg 292, Asn 294 in hidrofobni Ala 246. Kljub temu, da je žep 1 po strukturi zelo polaren, nova dognanja kažejo tudi na možnost nepolarnih interakcij, s katerimi razlagajo večjo afiniteto novejših inhibitorjev do encima (15). **Žep 2** sestavljajo Ile 222, Arg 224 in Ala 246. Tretje vezavno mesto - **žep 3** je večje in vsebuje hidrofobne in hidrofilne ostanke (Glu 119, Asp 151, Arg 152, Trp 178, Ser 179, Ile 222 in Glu 227); sem se vežeta C-4 hidroksilna in 5 N-acetilna



Slika 1: Mehanizem cepitve sialne kisline z encimom sialidazo
Figure 1: Neuraminidase enzyme mechanism

skupina sialne kisline, vendar ne tvorita interakcij z vsemi aminokislinskimi ostanki v tem žepu (15).

2 Inhibitorji virusne nevraminidaze

Prve inhibitorje virusne sialidaze (nevraminidaze) so odkrili z naključnim rešetanjem različnih molekul, zato so le-ti imeli nizko učinkovitost, slabo selektivnost in/ali pomanjkanje *in vivo* aktivnosti (npr. derivati oksamske kisline **4**) (16). Prvi inhibitor virusne sialidaze, po strukturi podoben substratu, pa je bil Neu5Ac2en (**5**) ($K_i \approx 10^{-5}$ - 10^{-6} M), ki je mimetik prehodnega stanja (**2**, slika 1). Neu5Ac2en je *in vitro* učinkovit inhibitor virusne sialidaze, vendar je slabo selektiven in neučinkovit *in vivo* (12, 16). Preproste strukturne spremembe na Neu5Ac2en, npr. priprava trifluoroacetamido derivata (**6**) niso vplivale na izboljšanje *in vivo* inhibicije. V literaturi so kot inhibitorji opisani tudi številni analogi sialne kisline: npr. fluorirani derivat **9** ($K_i = 8 \cdot 10^{-6}$ M), analog fosforne (V) kisline **10** ($K_i \approx 10^{-4}$ - 10^{-5} M), vendar noben izmed teh analogov ni kazal signifikantnega izboljšanja inhibicije virusne sialidaze (16).

Uspešen pristop pri razvoju učinkovitih inhibitorjev virusne sialidaze je bilo racionalno načrtovanje spojin, ki so po svoji strukturi primerne za vezavo v aktivno mesto encima. V veliko pomoč pri tem je bilo poznavanje kristalne strukture encima in njegovega kompleksa s substratom in inhibitorji, poznavanje mehanizma delovanja encima in uporaba molekulskega modeliranja. Na podlagi strukturnih informacij in študij biokemičnih mehanizmov cepitve sialne kisline so predvidevali, da poteka proces katalize preko sialoilnega kationa, kot intermedija v prehodnem stanju (**2**, slika 1) (15, 16). Pripravili so spojine, ki ga oponašajo. Takšne mimetike prehodnega stanja po njihovi strukturi lahko razdelimo na (15, 16):

- analoge sialne kisline z dihidropiranovim obročem (zanamivir),
- analoge sialne kisline z benzenovim obročem,
- cikloheksenske analoge sialne kisline (oseltamivir),
- analoge sialne kisline s petčlenskimi obroči.

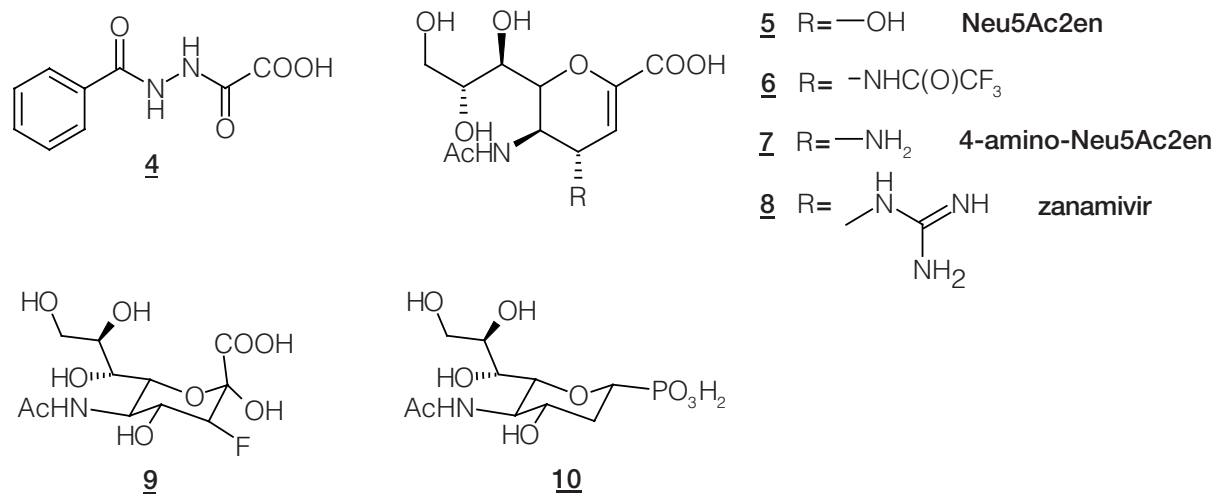
2.1 Analogi sialne kisline z dihidropiranovim obročem

Z določitvijo kristalne strukture kompleksa Neu5Ac2en s sialidazo so dobili informacije potrebne za ustrezne modifikacije Neu5Ac2en za razvoj bolj učinkovitih inhibitorjev. Ugotovili so, da zamenjava hidroksilne skupine na C-4 z amino skupino omogoča ionske interakcije z Glu 119 na aktivnem mestu ter da je žep na tem mestu dovolj velik za vezavo večjih bazičnih skupin, kot je gvanidinska skupina, ki lahko tvori ionske interakcije z Glu 119 in Glu 227 (16).

S pripravo spojin 4-amino-Neu5Ac2en (**7**) in 4-gvanidino-Neu5Ac2en (**8**) so dobili učinkovita *in vitro* in *in vivo* inhibitorja virusne sialidaze A in B tipa virusa influence. Spojina **8** z generičnim imenom zanamivir je učinkovita že v subnanomolarnih koncentracijah ($K_i \approx 10^{-11}$ M) in je tudi registrirana kot zdravilo za zdravljenje ter preventivo gripe (17). Zaradi neustrezne biološke uporabnosti in hitrega metabolizma se uporablja v obliki inhalacij. Pomembna je selektivnost zanamivirja glede na ostale virusne, bakterijske in sesalske sialidaze. Selektivnost razlagajo na podlagi arhitekture aktivnega mesta različnih sialidaz, ki je le pri sialidazi virusa influence takšna, da se vanj lahko prilega relativno velik bazičen C-4 substituent, kot je gvanidinska skupina (16).

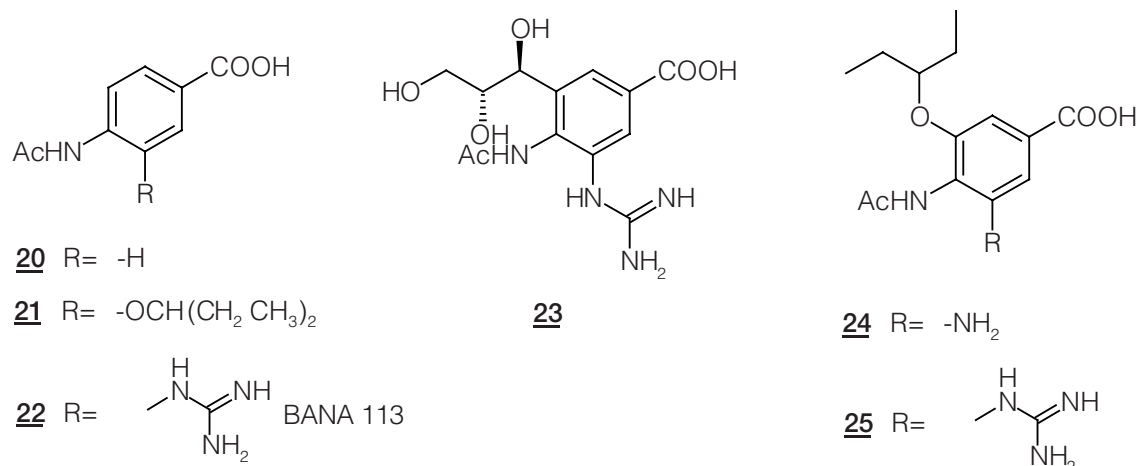
Raziskovalci so poskusili pripraviti tudi številne analoge zanamivirja, ki bi imeli ustrežnejše farmakokinetične lastnosti (16). Substitucija gvanidinskega dušika z različnimi skupinami (**11**) ali uporaba drugih dušik vsebujočih substituentov (**12**, **13**) na mestu C-4 je negativno vplivala na inhibicijo sialidaze. Tudi acetamidna skupina na mestu C-5 je pomembna za inhibicijo encima, z njeno odstranitvijo (**14**) se je 25000-krat zmanjšala afiniteta do encima. S substitucijo tega mesta s trifluoroacetamidno (**15**) in sulfonamidno funkcionalno skupino (**16**) so dobili še vedno učinkovite inhibitorje, ki pa so imeli manjšo afiniteto do encima kot zanamivir ($K_i \approx 2 \cdot 10^{-8}$ M in $9 \cdot 10^{-8}$ M).

Modifikacije stranske glicerolne verige zanamivirja so dale vpogled za strukturne zahteve na tem mestu. Skrajšanje stranske verige (**17**) je vplivalo na izgubo afintete. Najbolj zanimiva modifikacije stranke

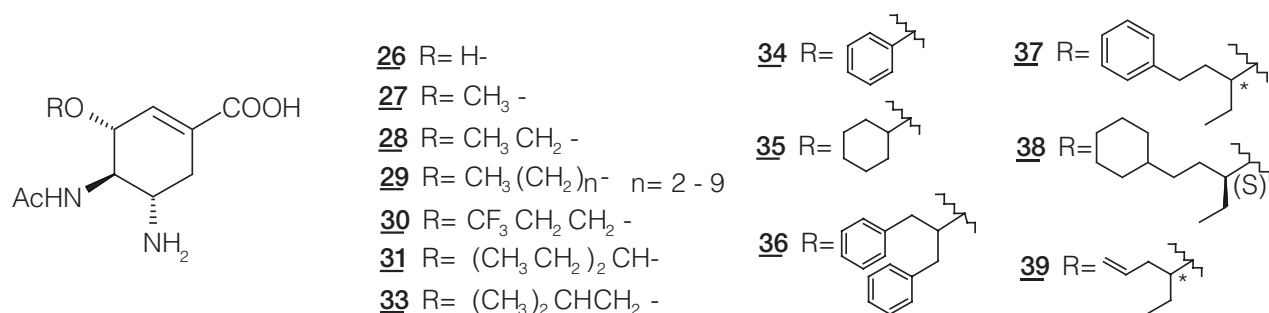


Slika 2: Inhibitorji virusne nevraminidaze
Figure 2: Virus neuraminidase inhibitors

Gripa in inhibitorji virusne nevraminidaze



Slika 4: Inhibitorji virusne nevraminidaze: analogi sialne kisline z benzenovim obročem
 Figure 4: Virus neuraminidase inhibitors: benzene analogs of sialic acid



Slika 5: Inhibitorji virusne nevraminidaze: analogi sialne kisline z cikloheksenovim obročem
 Figure 5: Virus neuraminidase inhibitors: cyclohexene analogs of sialic acid

vezavi 3-pentilne stranske skupine GS 4071, ki tvori hidrofobne interakcije, ki jih pred tem niso opazili pri vezavi sialne kisline. Na podlagi kristalografskih študij analogov so ugotovili, da v aktivnem mestu encima obstaja hidrofobni žep, ki ga sestavljajo aminokisliline Glu276, Ala246, Arg224 in Ile222 in v katerega se po velikosti in obliki prilaga 3-pentilna skupina in signifikantno vpliva na povečanje vezavne afinitete spojine **31** (15, 19, 20).

Izkazalo se je, da ima GS 4071, ki je bil razvit za peroralno uporabo, zelo slabo biološko uporabnost. Pretvorba GS 4071 v ustrezen etilni ester- predzdravilo **oseltamivir** (GS 4104) (**30**), je izrazito povečala biološko uporabnost, tako da je spojina primerna za peroralno aplikacijo (15).

Vpliv mesta dvojne vezi v cikloheksenem obroču je dobro viden pri primerjavi inhibitorne aktivnosti analogov s 3-pentilno stransko verigo (**40**, **41**, **42**). Spremembe mesta dvojne vezi zelo zmanjšajo afiniteto do encima, iz česar lahko sklepamo, da je le izomer **31** dober mimetik strukture prehodnega stanja (15). Izosterne zamenjave O z S, NH in CH₂ so pokazale, da imajo C-3 karba, tio in aza izosteri primerljivo inhibitorno aktivnost (15).

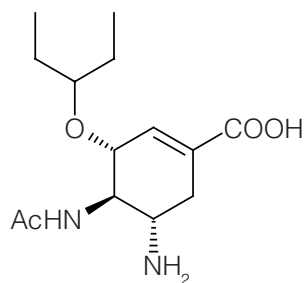
2.4 Analogi sialne kisline s petčlenskimi obroči

Pripravili so tudi analoge sialne kisline, kjer so za osnovni skelet uporabili ciklopentanski, pirolidinski in tetrahidrofuranski obroč (21, 22, 23). Od teh sta zelo učinkovita inhibitorja nevraminidaze peramivir oz. BCX-1812 (**43**) s ciklopentanskim skeletom in spojina A-315675 (**44**) s pirolidinskim obročem, medtem ko so derivati s tetrahidrofuranovim obročem (**45**, **46**) slabši inhibitorji nevraminidaze kot njihovi pirolidinski analogi (22). Učinkovina peramivir je v fazi kliničnih testiranj, spojina A-315677 (predzdravilo A-315675) pa v predklinični fazi razvoja (21).

3 Terapevtska uporaba inhibitorjev virusne nevraminidaze

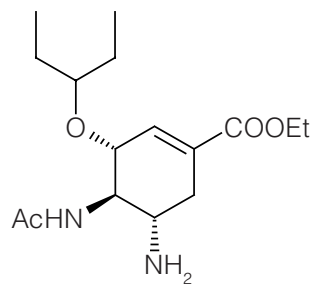
Zanamivir (**8**) in oseltamivir (**32**) sta učinkovita *in vitro* in *in vivo* inhibitorja sialidaze virusa influence tipa A in B, ki se uporabljata za zdravljenje in preprečevanje gripe (24, 25, 26). Zanamivir ima neustrezno biološko uporabnost po peroralni aplikaciji, zato se uporablja lokalno v obliki inhalacij. Oseltamivir (**32**) pa je predzdravilo

Pregledni članki - Review Articles

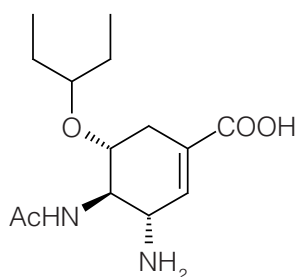


31 GS 4071

IC₅₀ = 1 nM tip A influenze
 IC₅₀ = 3 nM tip B influenze

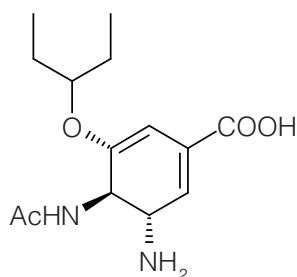


32 GS 4104 oseltamivir



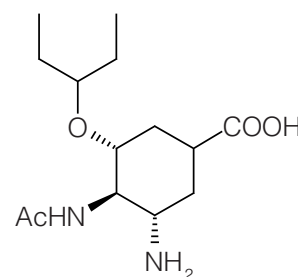
40

IC₅₀ = 30 nM tip A
 IC₅₀ = 500 nM tip B



41

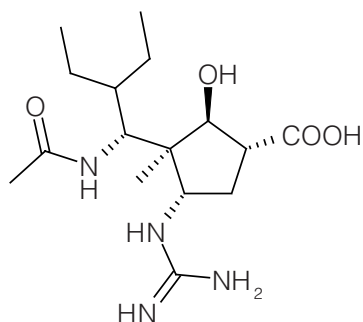
IC₅₀ = 1500 nM tip A
 IC₅₀ = 6600 nM tip B



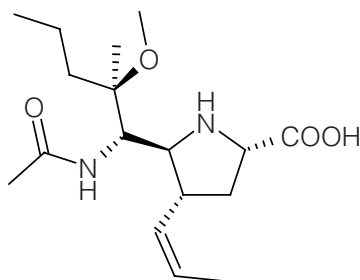
42

IC₅₀ = 380 nM tip A
 IC₅₀ = 1800 nM tip B

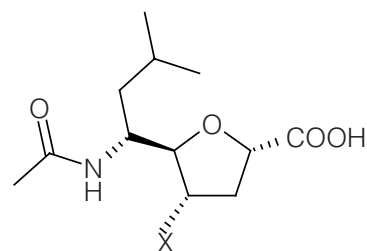
Slika 6: Inhibitorji virusne nevraminidaze: GS 4071, oseltamivir in analogi
 Figure 6: Virus neuraminidase inhibitors: GS 4071, oseltamivir and analogs



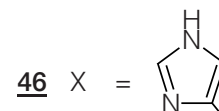
43 peramivir (BCX-1812)



44 A-315675



45 X = -COOCH₃



46 X =

Slika 7: Inhibitorji virusne nevraminidaze: analogi sialne kisline s ciklopentenskim, pirolidinskim in tetrahidrofuranovim obročem
 Figure 7: Virus neuraminidase inhibitors: sialic acid analogs with cyclopentene, pyrrolidine and tetrahydrofuran ring

Gripa in inhibitorji virusne nevraminidaze

lo spojine GS 4071 (31) in je uporaben peroralno. Po absorpciji v prebavnem traktu se pod vplivom encimov v krvi pretvori v GS 4071, ki se distribuira v vsa tkiva, tudi na glavno mesto infekcije z virusi influence, zgornji in spodnji respiratorni trakt. Pri terapiji gripe sta zanamivir (10 mg 2 x dnevno) ali oseltamivir (75 mg 2 x dnevno) skrajšala trajanje simptomov gripe, kot so mialgija, povišana temperatura in glavobol za 0,7-1,5 dni (24). Večjo klinično učinkovitost (zmanjšanje simptomov za 1,5-2 dni) so opazili pri pacientih s potrjeno influenco, ki so dobili terapijo v 30-ih urah po pojavu simptomov. Za profilakso gripe so zanamivir (10 mg 1 x dnevno) in oseltamivir (75 mg 1 x dnevno) uporabljali 4-6 tednov, kjer je bila učinkovitost 67-74 % (24). Najbolj pogosti stranski učinki (<5 %) so bili respiratorni. Pri bolnikih, ki so prejeli oseltamivir, pa še glavobol, slabost in bruhanje (24, 26).

4 Rezistenca

Pri uvedbi protivirusne terapije z inhibitorji nevraminidaze pa se pojavlja tudi bojazen, da bi njihova uporaba lahko povzročila nastanek rezistentnih virusov influence. Za spremljanje pojavljanja rezistence so ustanovili »*Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network (NISN)*«, mednarodni sistem nadzora pojavljanja odpornih virusov na inhibitorje nevraminidaze (21, 27). Študije kažejo, da postanejo virusi influence *in vitro* odporni na inhibitorje nevraminidaze le pri dolgotrajnem gojenju v laboratoriju pri visokih koncentracijah učinkovine. Prav tako je dokaj redek pojav nastanek odpornih virusov pri klinični uporabi inhibitorjev nevraminidaze. Pri zdravljenju 789 bolnikov z oseltamivirjem so izolirali na oseltamivir odporne viruse pri 14 bolnikih (1,8 %) (27). Simptomi bolnikov s spremenjenimi virusi so bili enaki kot pri tistih z divjim tipom virusa, bolniki pa so normalno okrevali (28).

Rezistenca na inhibitorje virusne sialidaze nastane zaradi točkovnih mutacij na virusni RNA, kar povzroči spremembo aminokislino blizu ali na aktivnem mestu sialidaze. Odpornost na inhibitorje nevraminidaze pa je lahko tudi posledica spremembe na antigenskem mestu hemaglutinina. Pri ugotavljanju mehanizma rezistence na inhibitorje nevraminidaze so ugotovili naslednje mutacije nevraminidaze (27):

- najbolj pogosta je bila mutacija Arg292Lys (27, 28)
- v manjšem obsegu je prišlo do mutacij Glu119Val, opazili pa so še druge mutacije na mestu 119 (Glu119Gly, Glu119Ala, Glu119Asp) (27)
- opisani so posamezni primeri mutacije His274Tyr (27), en primer mutacije Arg152Lys pri otroku z oslabiljenim imunskim sistemom (27) in mutacijo Asp198Asn pri virusu influence tipa B (21).

Mutirani virusi kažejo zmanjšano infektivnost in virulentnost *in vivo* ter se težko prenašajo iz človeka na človeka. Študije na živalih potrjujejo podatke kliničnih študij, da so virusi odporni na inhibitorje virusne nevraminidaze manj virulentni kot divji tipi virusa, imajo zmanjšano patogenost in infektivnost. To je tudi pričakovano, saj mutacije, na sicer strogo ohranjenem aktivnem mestu encima, zelo oslabijo funkcionalnost nevraminidaze, ki je nujna za širjenje virusov (27, 28).

5 Sklep

Podatki o žrtvah v času velikih pandemij influence v letih 1918, 1957 in 1968 ter pojav ptičje gripe v zadnjih letih v Aziji, v tem letu pa tudi v Evropi, vsekakor vplivajo na zavedanje o nevarnosti gripe. Vendar

ljudje kljub temu gripo še vedno prepogosto enačijo z navadnim prehladom in le-ta pogosto velja za bolezen, ki ogroža le starejše ljudi. Danes, ko živimo v času globalizacije in velike mobilnosti ljudi, lahko hitro pride do širjenja mutiranega virusa in pandemije gripe. Cepiva in zdravila, kot so inhibitorji nevraminidaze, so le začetek nove dobe v boju proti gripi. V literaturi so opisani kot potencialna zdravila za zdravljenje gripe še inhibitorji virusne RNA transkriptaze in replikaze, inhibitorji vezave virusov influence na receptor gostiteljske celice za hemaglutinin in spojine, ki stabilizirajo konformacijo hemaglutinina ter inhibitorni oligoribonukleotidi (29, 30). Vprašanje pa je, katera od njih bodo sploh dosegla fazo kliničnih testiranj in ali bo farmacevtska industrija vlagala denar v drag razvoj novih zdravil, ki morda ne bodo povrnili stroškov razvoja. Zato je toliko bolj pomembno, kako cepiva in zdravila, ki so na razpolago za zdravljenje in preventivo influence, v primeru pandemije ali epidemije uporabiti v klinični praksi, da bo njihov učinek največji.

6 Literatura

1. Kuszewski K, Brydak L. The epidemiology and history of influenza. *Biomed & Pharmacother* 2000; 54: 188-195.
2. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>
3. Palese P. Influenza: Old and new threats. *Nature Medicine* 2004; 10: 82-87.
4. Oxford JS, Lambkin R. Targeting influenza virus neuraminidase – a new strategy for antiviral therapy. *DDT* 1998; 3: 448-456.
5. Cox NJ, Subbarao K. Influenza. *Lancet* 1999; 354: 1277-1282.
6. <http://www.who.int/csr/disease/influenza/en/>
7. Gubareva LV, Kaiser L, Hayden FG. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet* 2000; 355: 827-835.
8. Calfee DP, Hayden FG. New Approaches to Influenza Chemotherapy-Neuraminidase inhibitors. *Drugs* 1998; 56: 537-553.
9. Colman PM, Varghese JN, Laver WG. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* 1983; 303: 41-44.
10. Brown EG. Influenza virus genetics. *Biomed & Pharmacother* 2000; 54: 196-209.
11. <http://www.micro.msb.le.ac.uk/3035/Orthomyxoviruses.html>
12. Varghese JN. Development of Neuraminidase Inhibitors as Anti-Influenza Virus Drugs. *Drug Development Research* 1999; 46: 176-196.
13. Bradbury J. What makes an influenza virus virulent? *Lancet* 1998; 352: 629.
14. Claas ECJ, Osterhaus ADME. New clues to the emergence of flu pandemics. *Nature medicine* 1998; 4: 1122-1123.
15. Lew W, Chen X, Kim CU. Discovery and Development of GS 4104 (oseltamivir): An Orally Active Influenza Neuraminidase Inhibitor. *Current Medicinal Chemistry* 2000; 7: 663-672.
16. Kiefel MJ, Itzstein M. Influenza Virus Sialidase: A Target for Drug Discovery. *Progress in medicinal Chemistry* 1999; 36: 1-28.
17. http://www.gov.si/ivz/knjiznica/reg_zdravil/RZ_ATCJ.HTM
18. Atigadda VR, Brouillette WJ, Duarte F et al. Hydrophobic Benzoic Acids as Inhibitors of Influenza Neuraminidase. *Bioorg. Med. Chem.* 1999; 7: 2487-2497.
19. Williams MA, Lew W, Mendel DB et al. Structure-activity relationships of carbocyclic influenza neuraminidase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1997; 7 (14): 1837-1842.
20. Kim CU, Lew W, Williams MA et al. Structure-Activity Relationship Studies of Novel Carbocyclic Influenza Neuraminidase Inhibitors. *J. Med. Chem.* 1998; 41: 2451-2460.
21. Gubareva LV. Molecular mechanism of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Research* 2004; 103: 199-203.
22. Wang GT, Wang S, Gentles R et al. Design, synthesis, and structural analysis of inhibitors of influenza neuraminidase containing a 2,3-disubstituted tetrahydrofuran-5-carboxylic acid core. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005; 15: 125-128.
23. Kati WM, Montgomery D, Carrick R et al. In Vitro Characterization of A-315675, a Highly Potent Inhibitor of A and B Strain Influenza Neuraminidases and Influenza Virus Replication. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; 46: 1014-1021.
24. McNicholl IR, McNicholl JJ. Neuraminidase Inhibitors: Zanamivir and Oseltamivir. *Ann Pharmacother* 2001; 35: 57-70.
25. Waghorn SL, Goa KL. Zanamivir. *Drugs* 1998; 55: 721-725.
26. Bardsley-Elliott A, Noble S. Oseltamivir. *Drugs* 1999; 58: 851-860.
27. Jackson HC, Roberts N, Wang ZM et al. Management of Influenza. *Clin Drug Invest* 2000; 20: 447-454.
28. Carr J, Ives J, Kelly L et al. Influenza virus carrying neuraminidase with reduced sensitivity to oseltamivir carboxylate has altered properties *in vitro* and is compromised for infectivity and replicative ability *in vivo*. *Antiviral Research* 2002; 54: 79-88.
29. Oxford JS, Bossuyt S, Eswarasaran R, Lambkin R. Drugs to combat the epidemic and pandemic faces of influenza. In: Potter CW. *Perspectives in medicinal virology 7; Influenza*. Elsevier Science 2002: 201-234.
30. Ge Q, Filip L, Bai A et al. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *PNAS* 2004; 101: 8676-8681.