



BIOLOGICKÉ  
CENTRUM  
AV ČR, v. v. i.

# Vývoj a testování nových antivirotik aktivních proti viru klíšťové encefalitidy

Daniel Růžek

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

Parazitologický ústav Biologického centra AVČR,  
České Budějovice



VU VeL

## Obsah...

- Obecná informace o viru klíšťové encefalitidy
- Testování nukleosidových analogů proti viru KE a jiným flavivirům
- Možnosti využití schválených léků na terapii klíšťové encefalitidy



VU VeL



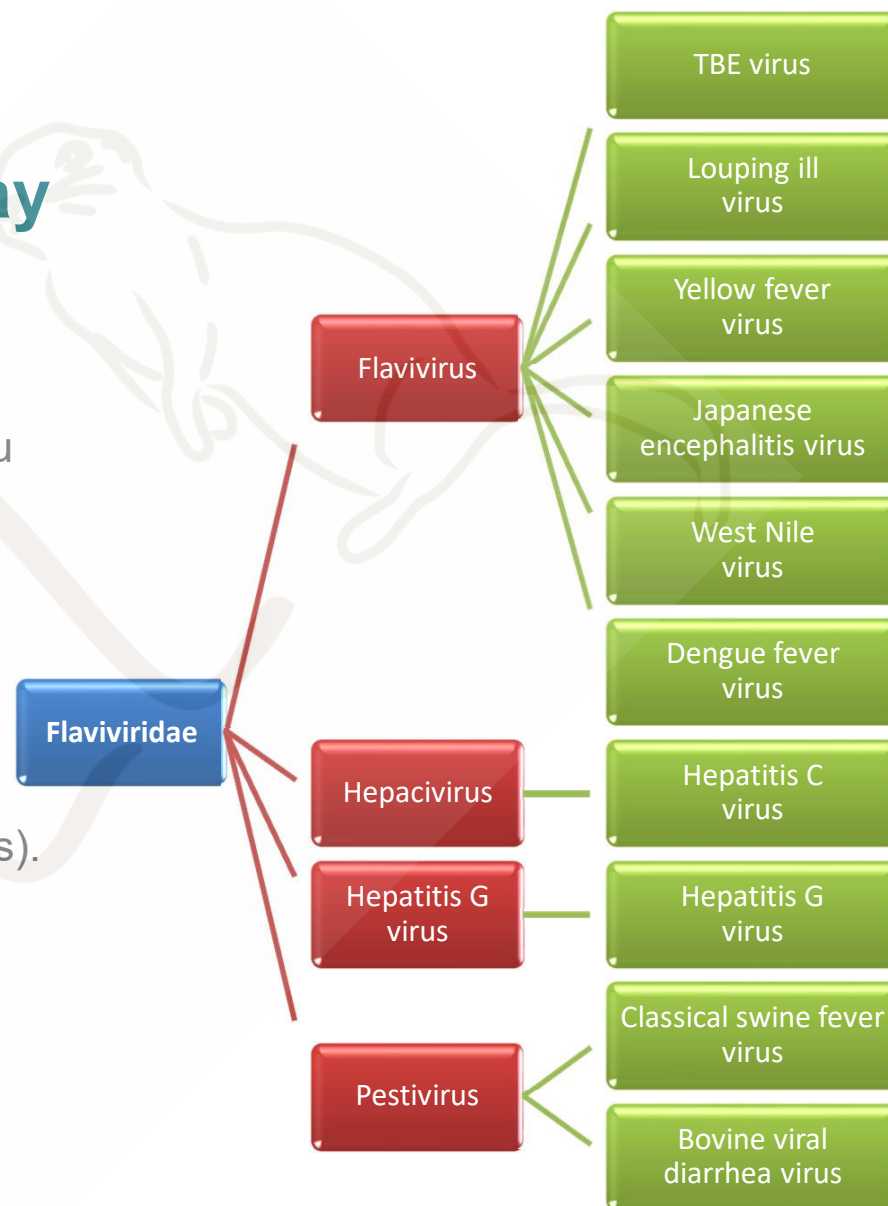
BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

# Virus klíšťové encefalitidy

## Zástupce čeledi *Flaviviridae*

- Virus KE patří do rodu *Flavivirus* v rámci čeledi *Flaviviridae*, která představuje rodinu asi 70 RNA virů
- řada flavivirů je medicínsky významných (původci neuroinfekcí, hemoragických horeček, teratogenní...)
- Většina flavivirů je přenášena pomocí nakažených členovců, zejména klíšťat a komárů (arboviry – arthropod-borne viruses).

Virus KE patří mezi flaviviry s největším dopadem na člověka



VU VeL

BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

# Objev viru KE

- poprvé popsáno roku 1931, kdy rakouský lékař H. Schneider pozoroval pravidelný sezónní výskyt nemoci, kterou pojmenoval „Epidemische akute Meningitis serosa“
- Lidový komisariát zdravotnictví SSSR v roce 1937 vypravil sérii expedicí na ruský Dálný východ, za účelem zkoumání nového onemocnění tehdy označovaného jako ruská jaro-letní encefalitida.

*„Postupovali jsme v zákrytu za sebou a často jsme se zastavovali, abychom si navzájem sňali klíšťata... Po dvou až tří kilometrovém pochodu lze na sobě nalézt stovku i více klíšťat“*

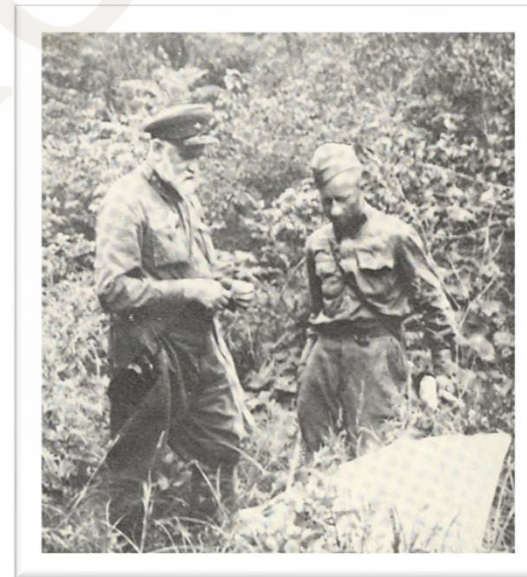


VU VeL

BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

# Objev viru KE

- Řada členů expedice onemocněla, někteří měli těžký průběh, někteří zemřeli, jiní ztratili zrak nebo ochrnuli.
- Michail P. Čumakov – částečné ochrnutí a poškození sluchu
- Podařilo se izolovat nový virus z pacientů, hlodavců i klíšťat
- E. N. Pavlovský definoval teorii o přírodní ohniskovosti



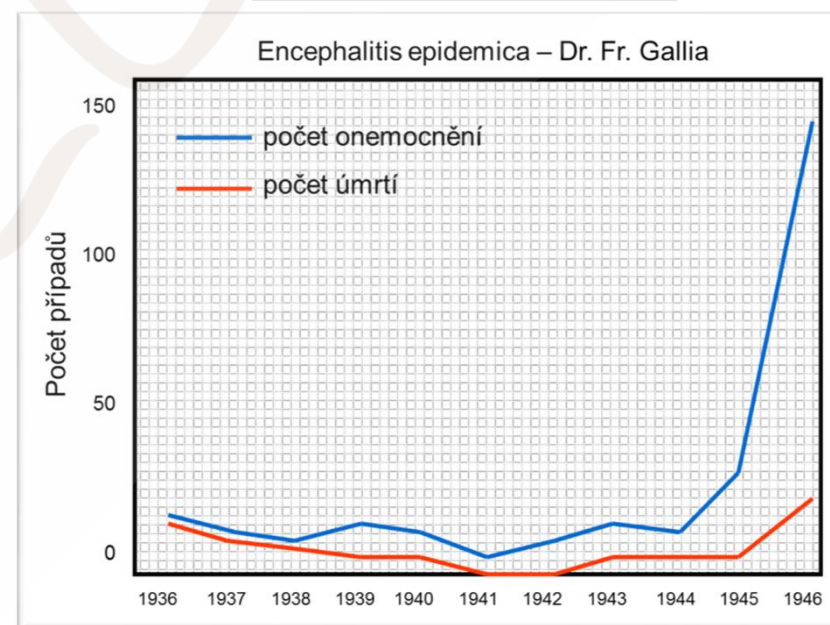
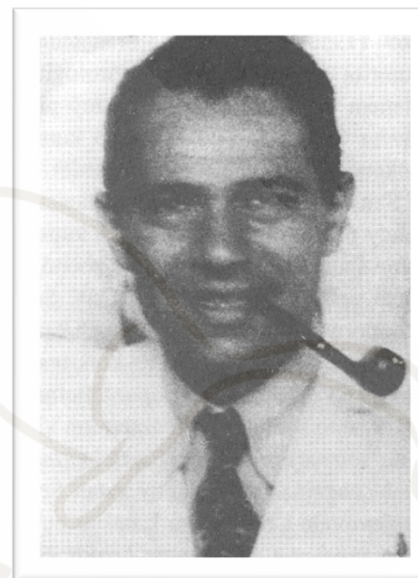
VU VeL

BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

# Objev viru KE ve Evropě

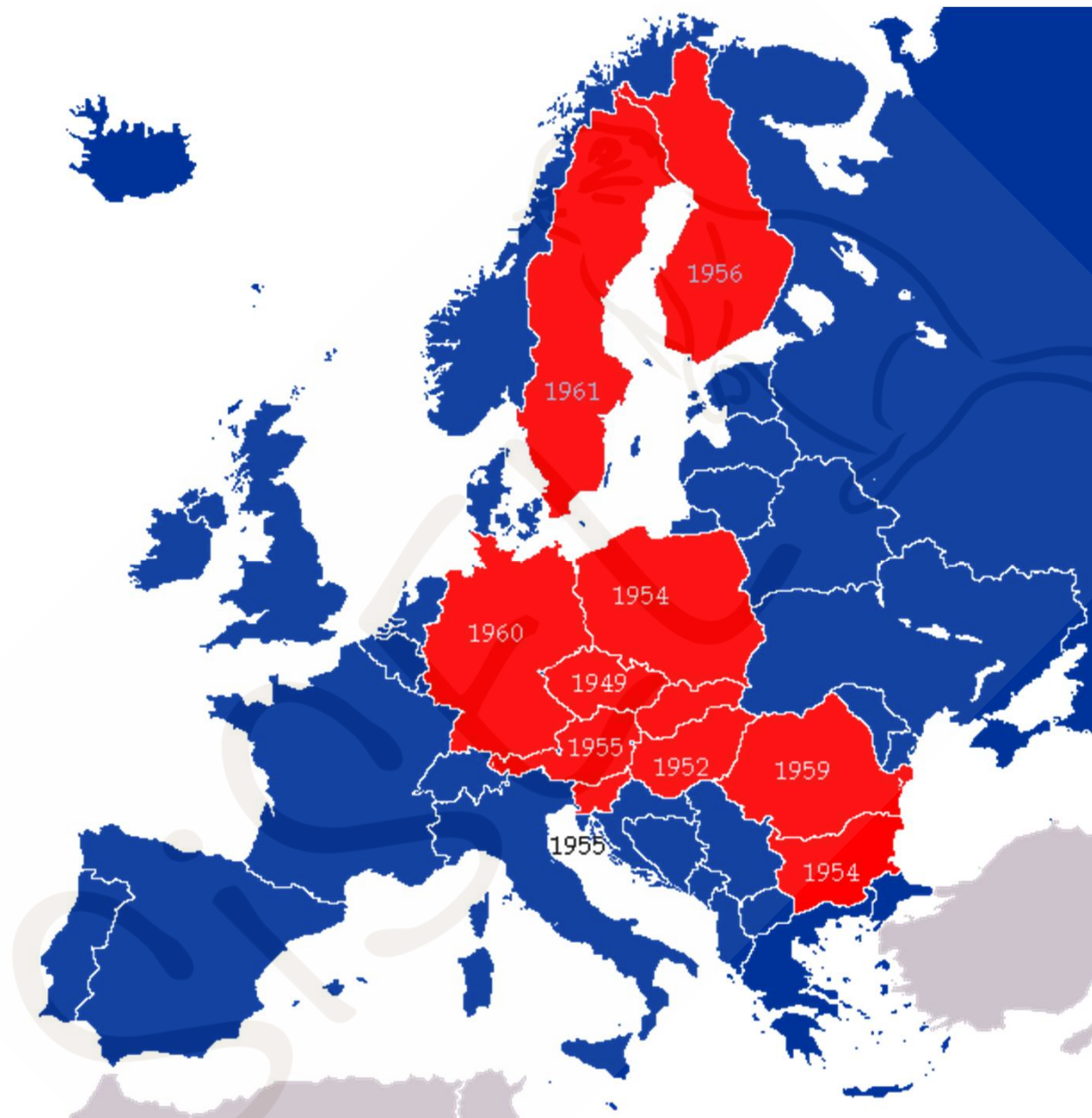
- 1948: Krejčí, Rampas a Gallia – první izolace viru KE v Evropě
- Dr. F. Gallia zemřel následkem klíšťové encefalitidy komplikované sekundární laboratorní infekcí ve věku 38 let
- „Pacient ohrožoval ostatní nemocné, vstal z postele a násilím sousedovi vnucoval snídani, vyhrožoval mu, že ho uškrtní, a skutečně ostatní pacienti ho museli násilím odtrhnout. ....někdy se pacient choval tak, že to působilo, jako by si z lékařů dělal dobrý den.“ „Pacient měl zrakové halucinace (viděl myšky), i sluchové. Stále vykřikoval, že Kristus byl první socialista.“

Lékařské listy, 1949



VU VeL

BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR



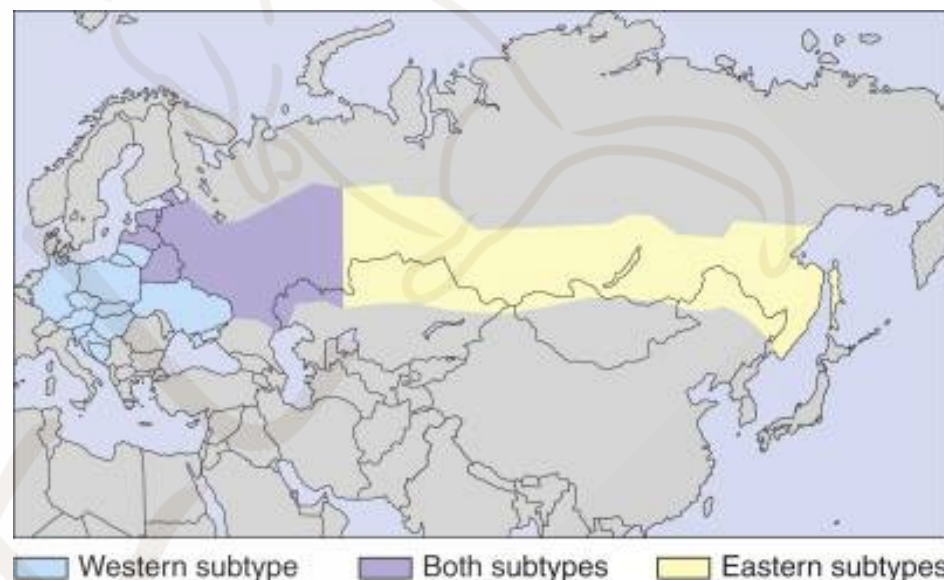
VU VeL

BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

# Virus KE:

## Geografická distribuce

- Virus KE se vyskytuje v většině Evropy a v severní a východní Asii včetně Ruské federace, severní Číny, Japonska a jižní Koreje
- Genetická analýza kmenů z různých oblastí odhalila, že existují 3 genetické linie viru KE (+ nově objevené další dva genotypy na Sibiři).
- Na základě jejich geografické distribuce, byly pojmenovány jako:
  - Evropský subtyp
  - Sibiřský subtyp
  - Dálnovýchodní subtyp
  - Bajkalský subtyp
  - Himalájský subtyp



<https://www.evereast.co.uk/journal/responsible-adults-vaccinations>

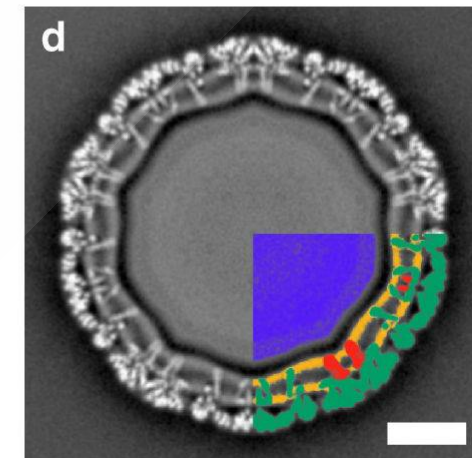
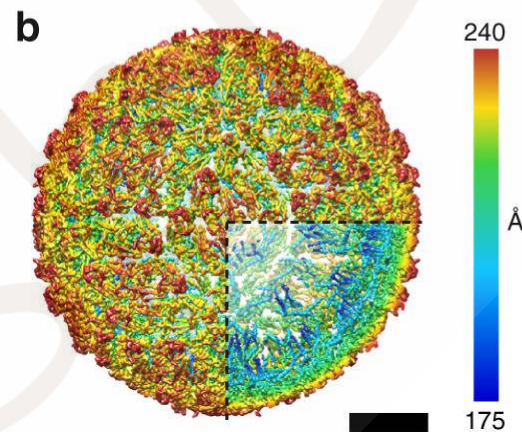
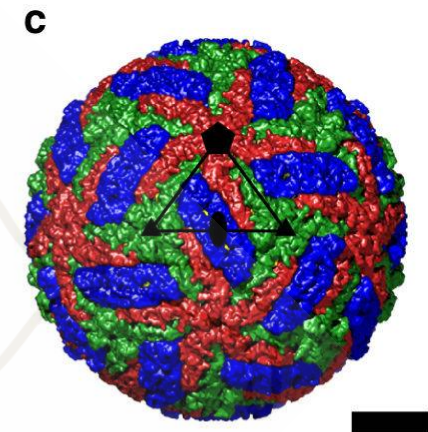
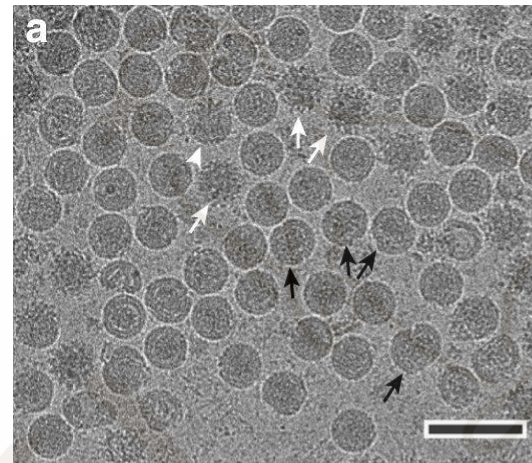


VU VeL

BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

# Virus KE:

- Genom viru je tvořen **jednořetězcovou (+)RNA** (11 kb) – kóduje 1 otevřený čtecí rámec (polyprotein kóduje 3 strukturní a 7 nestrukturních proteinů)
- Částice viru jsou **sférického/kulovitého tvaru**, o průměru přibližně 50 nm.
- Virion sestává z **nukleokapsidu** obklopeného **lipidovým obalem**.
- Zralý virion je tvořen **3 strukturními proteiny**:
  - **Obalový (E) protein** je hlavním virovým antigenem (zodpovídá za vazbu virové částice na receptor na povrchu hostitelské buňky)
  - **Kapsidový (C) protein** tvoří kapsid a spolu s virovou RNA vytváří nukleokapsid
  - **Membránový (M) protein** – integrován do virového obalu



Fuzik et al., 2018, Nature Comm.



VU VeL



BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

## Hostitelé:

### Přenos viru KE alimentárním způsobem

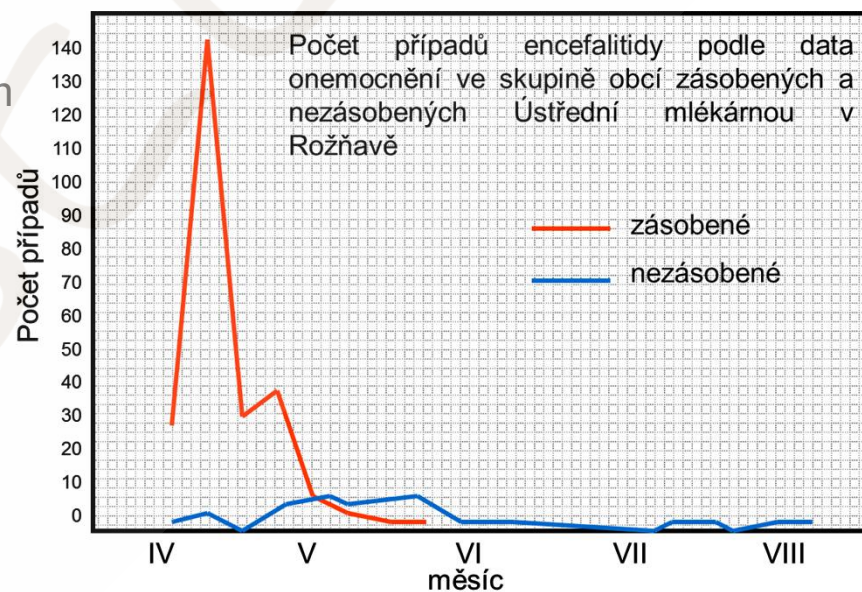
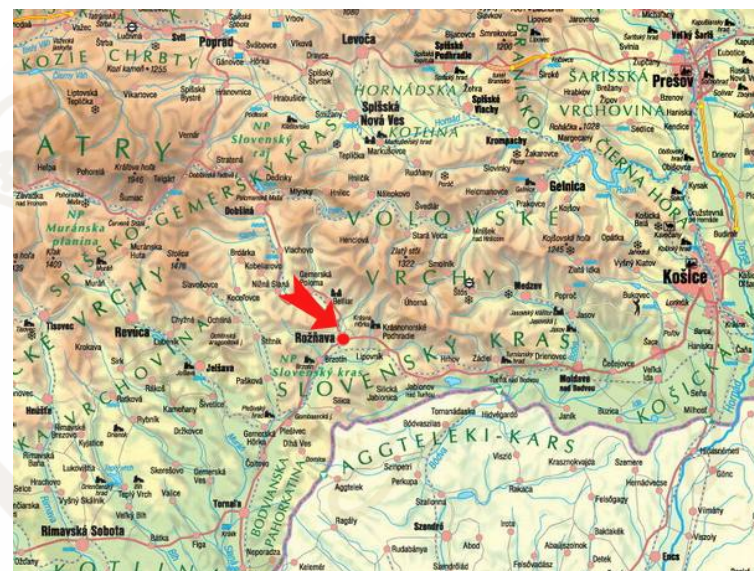
- Případy nákazy člověka virem KE alimentární cestou byly prokázány v Rusku, České republice, Maďarsku, Rakousku, Slovensku, Litvě, Estonsku, Albánii, Bosně a v Srbsku
- lidé byli nakaženi po konzumaci nepasterizovaného či nedostatečně tepelně upraveného mléka a mléčných výrobků
- z posledních epidemií možno jmenovat: 2007 – Maďarsko – 154 exponovaných osob, z toho 25 potvrzených případů; 2008 – Rakousko – 7 exponovaných osob, z toho 4 potvrzené případy; dále 2011 Maďarsko, 2012 Slovinsko a další sporadické případy infekce v České republice, na Slovensku a v dalších zemích endemického výskytu nákazy.



VU VeL

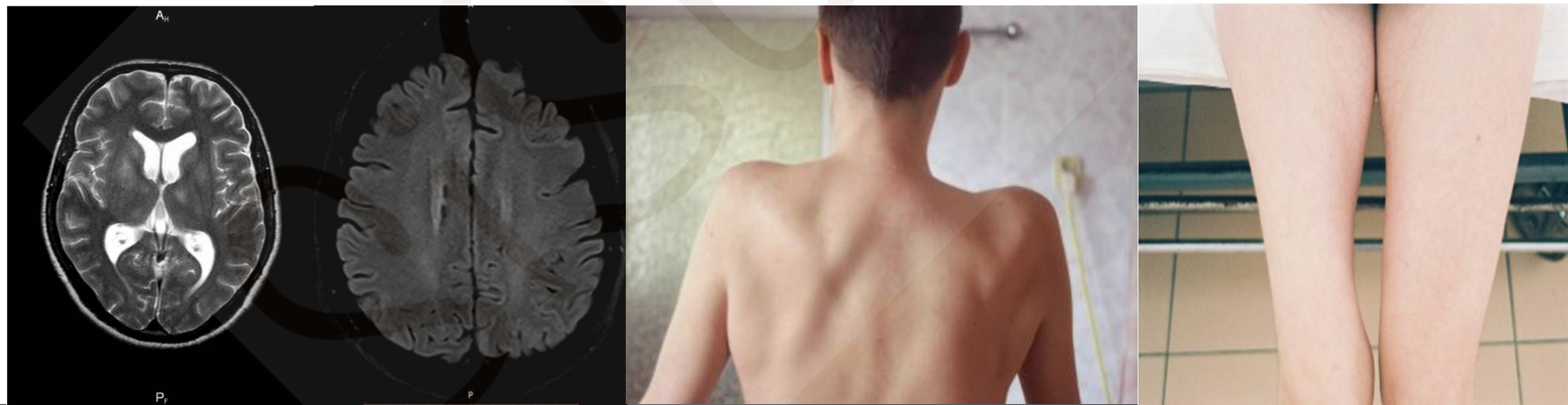
# Přenos viru KE alimentárním způsobem: Rožňavská epidemie (1951)

- Nakaženo přes 660 lidí mlékem z místní mlékárny, z nich 271 bylo hospitalizováno
- v mlékárně byl porouchán pasterizační přístroj
- kravské mléko bylo pančováno mlékem kozím
- jedná se o největší epidemii alimentární KE v historii



# Klíšťová encefalitida u člověka

- **Inaparentní infekce** – bezpříznaková forma se serokonverzí
- **Chřipkové onemocnění** ( případně 1. fáze onemocnění): teplota, bolest hlavy, kloubů a nevolnost.
- **Meningitida**: teplota, bolest hlavy, světloplachost, závrať, zvracení a meningeální dráždění, po několika dnech dochází k ústupu teplot a postupnému ústupu i dalších potíží.
- **Encefalitida**: závažnější postižení funkcí mozku, poruchy spánku, paměti, třes, poruchy vědomí zpomalením psychomotorického tempa, spavost až bezvědomí, delirantní stavy, zmatenost. Poruchy hybnosti (obrn) hlavových nervů...
- **Encefalomyelitida** je charakterizována rozvojem chabých obrn, často jde o postižení horních končetin.

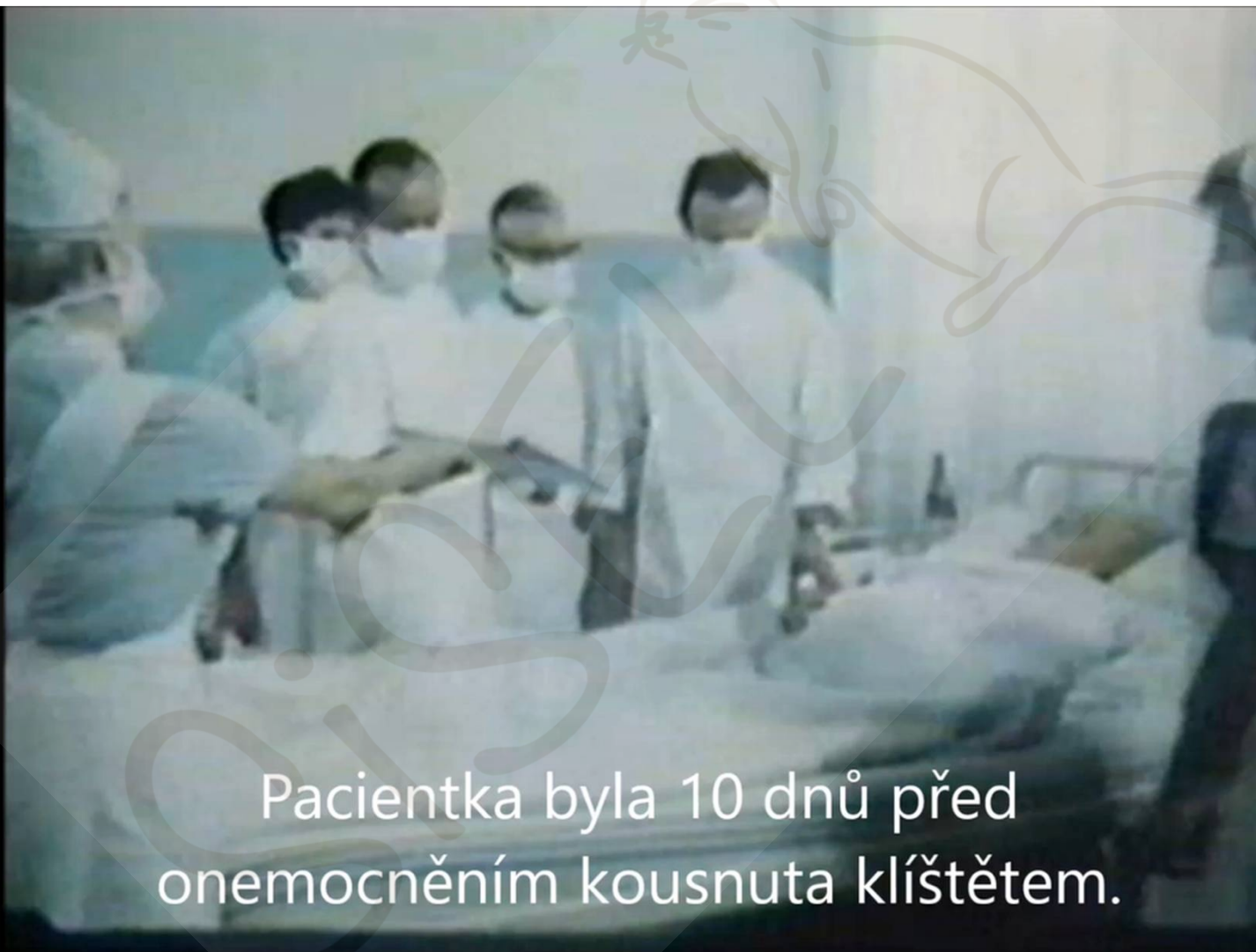


VU VeL

BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

Zdroj obrázků: Růžek et al., 2018 Antiviral Res.

## Klíšťová encefalitida u člověka



Pacientka byla 10 dnů před  
onemocněním kousnuta klíštětem.



VU VeL

BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

Zdroj: Klíšťová encefalitis II. Ústav zdravotní výchovy  
Praha; ČSAV. Krátký film Praha 1968. Upraveno.

# Klíšťová encefalitida u člověka

Úmrtí: 0,6%

Poruchy hybnosti alespoň přechodné 11,7 %

Významnější obrny: 6,1 %  
(chabá obrna paže při myelitidě v 1%)

Mozečkové poruchy (rovnováha, třes aj.) 81 %

Poruchy vědomí: spavost 17 %  
těžké bezvědomí 4 %

Psychické poruchy

mírnější 13 %

těžké poruchy (halucinatorní) 3 %

## ▪ Následky

Bolest hlavy: 69,4 %

Třes: 54,5 %

Poruchy spánku: 32,9 %

Závratě: 31,3 %

Poruchy koncentrace: 24,9 %

Postencefalitický syndrom: 24,3 %



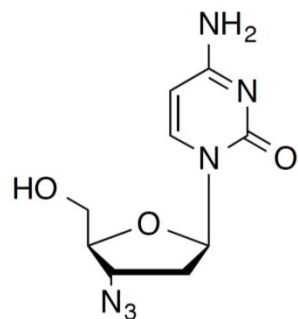
VU VeL



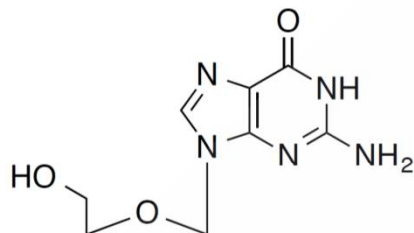
BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

Zdroj : MUDr. Václav Chmelík, Nemocnice ČB

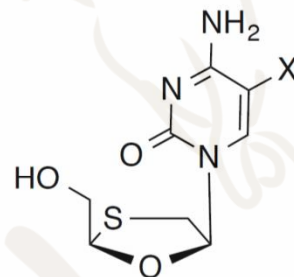
# Nucleosides – one of the best classes of drugs on the market



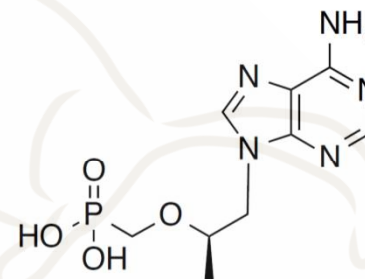
AZT, HIV



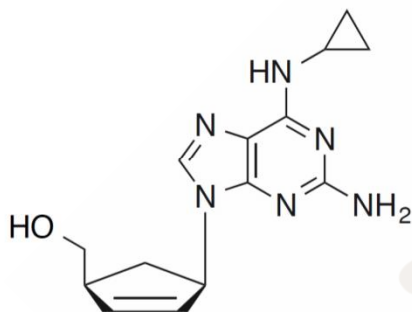
Acyclovir, Herpes



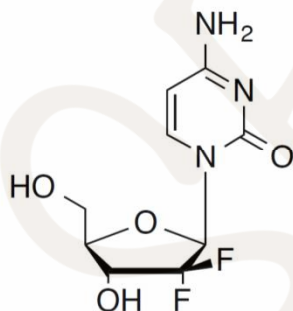
X=H; 3TC, Lamivudine  
X=F; (-)-FTC, Emtricitabine  
HIV and HBV



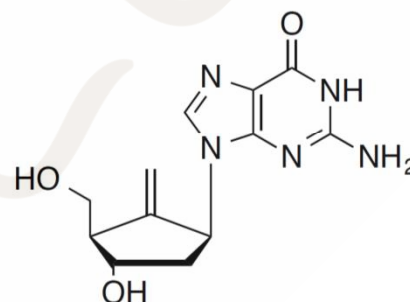
Tenofovir, HIV and HBV



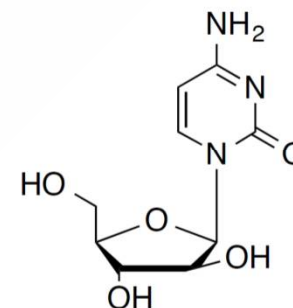
Abacavir, HIV



Gemcitabine, cancer



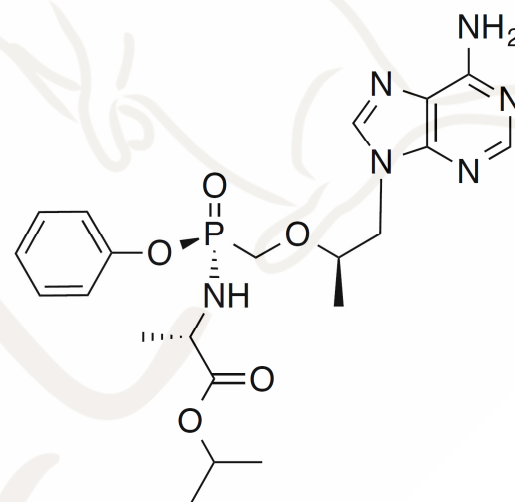
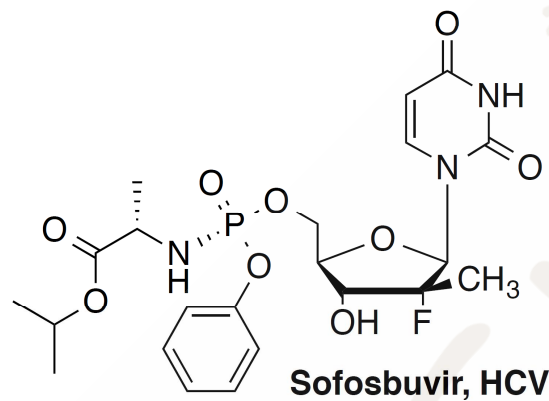
Entecavir, HBV



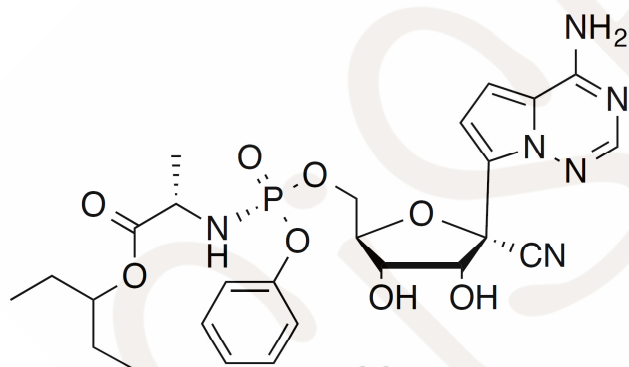
Ara-C, cancer

**In general (not always!) we know their mechanism of action and can usually find X-ray or NMR structures to work from**

# Some of the newer nucleosides



**Tenofovir alafenamide, TAF**  
HIV, HBV



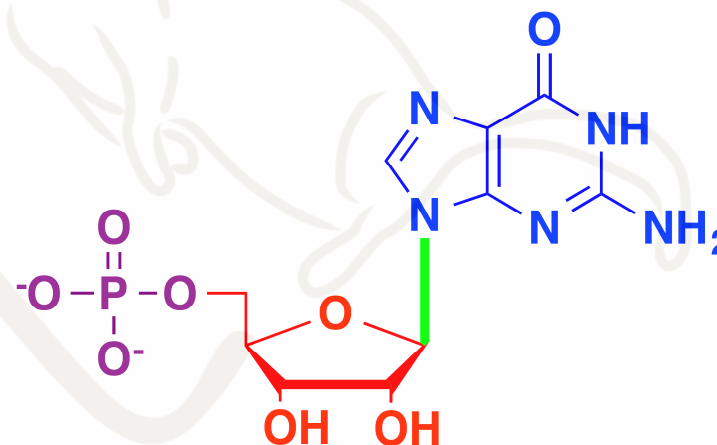
**GS-5734 - active against MERS, Ebola and other viruses**



VU VeL

# Typical targets for modifications in nucleoside drug design

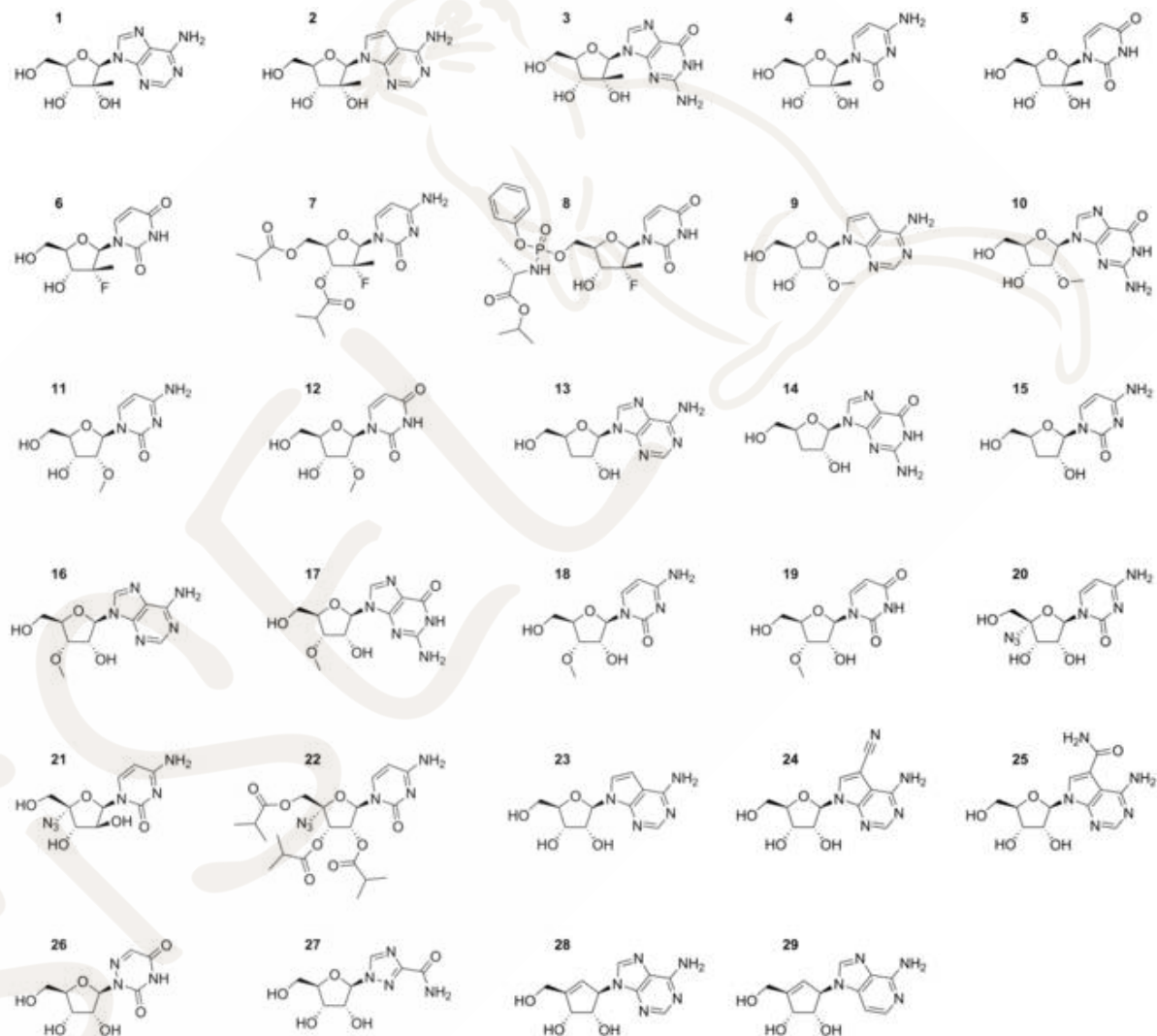
- **Sugar**
- **Base**
- **Phosphate group**
- **Glycosidic Bond**
- **Or... a combination**



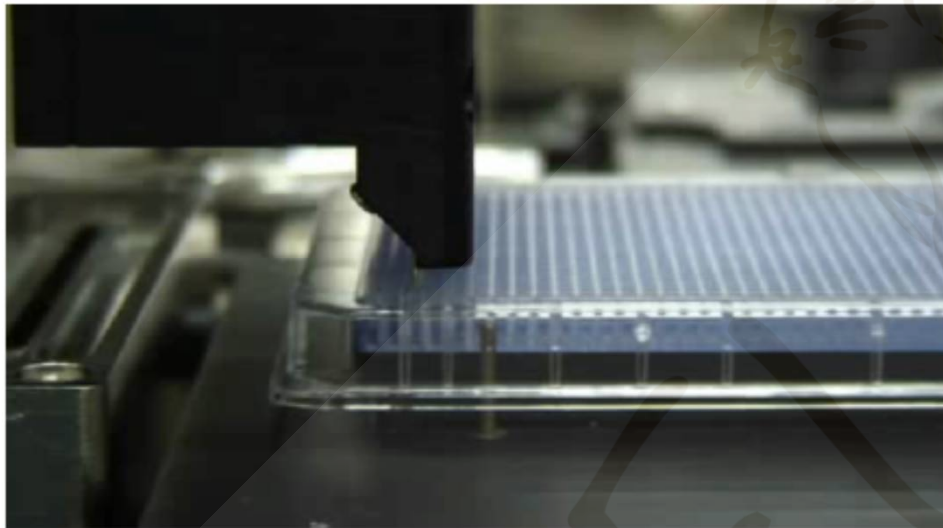
**Atoms can simply be (i) added to or (ii) taken away from the various parts of the scaffold - or (iii) they can replace an atom in the scaffold itself**



# Antivirová terapie klíšťové encefalitidy



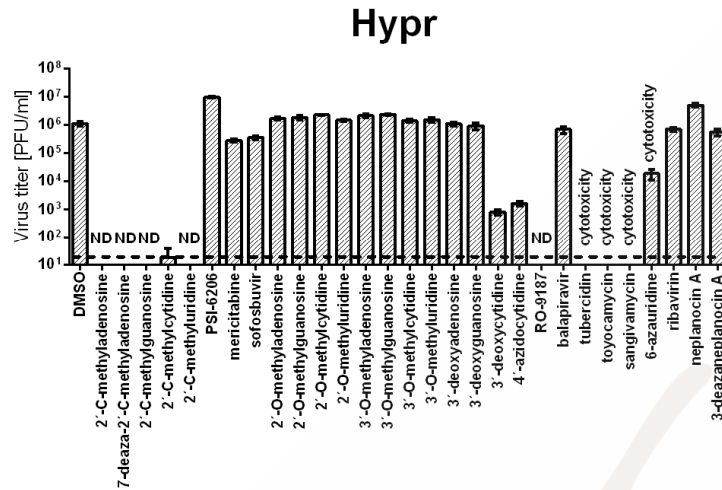
## High throughput screening



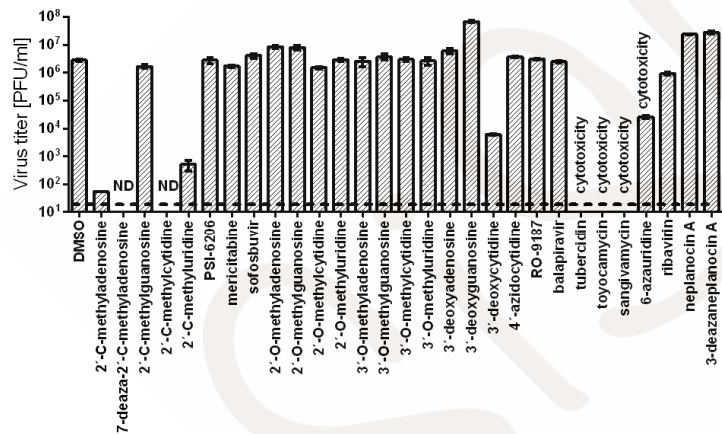
VU VeL

# Antivirová terapie KE

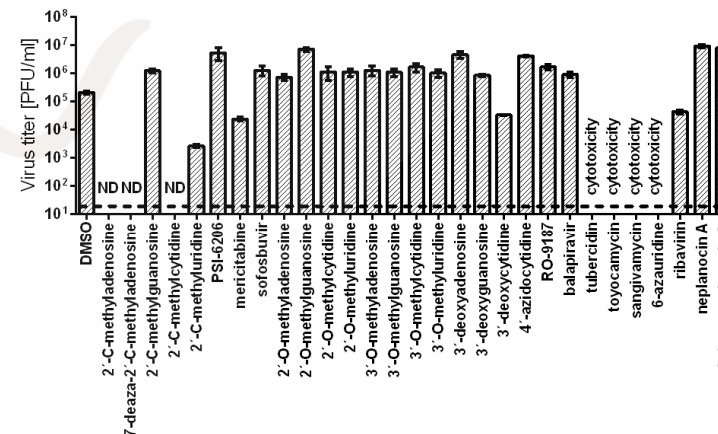
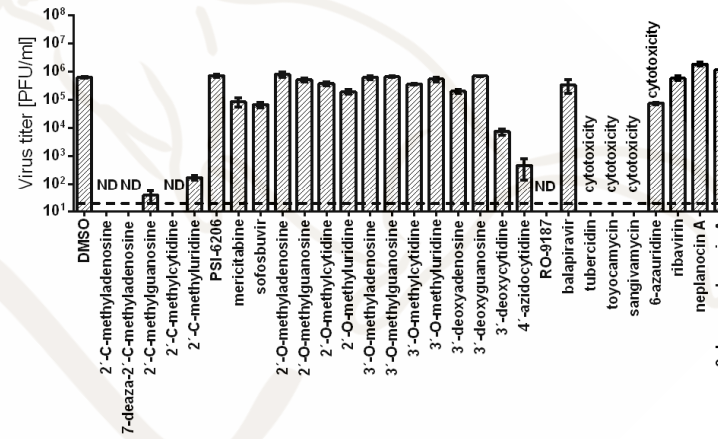
PS



UKF-NB4



Neudörfl



VUwL

BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

Eyer et al., 2015, Antimicrob. Agents Chemother.  
Eyer et al., 2016, Antiviral Res.  
Eyer et al., 2017, Antiviral Res.

# Antivirová terapie KE

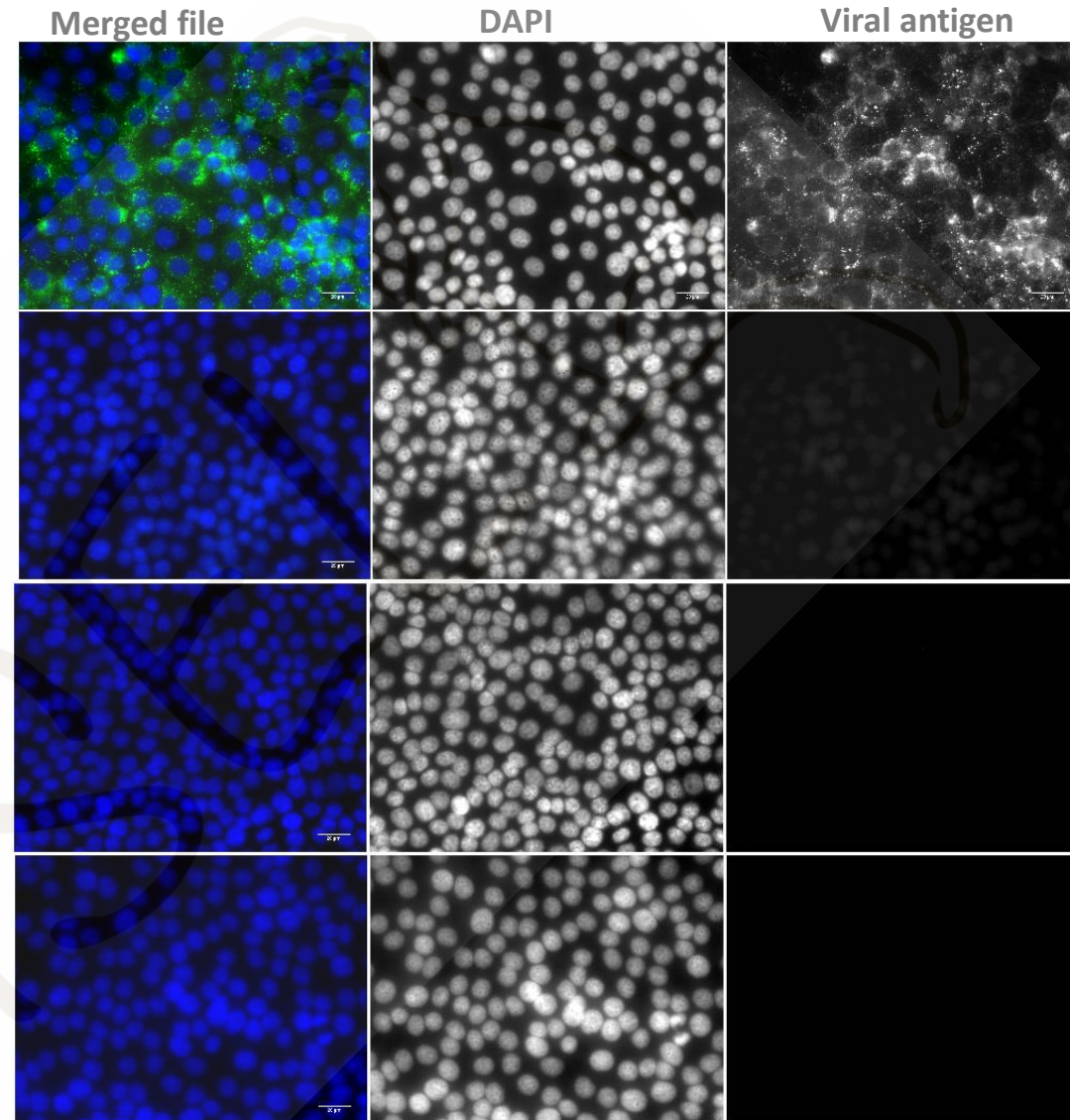
Inhibition of viral  
antigen expression by  
nucleoside analogues

DMSO

7-deaza-2'-C-  
methyladenosine

2'-C-methyladenosine

2'-C-methylcytidine



VU VeL

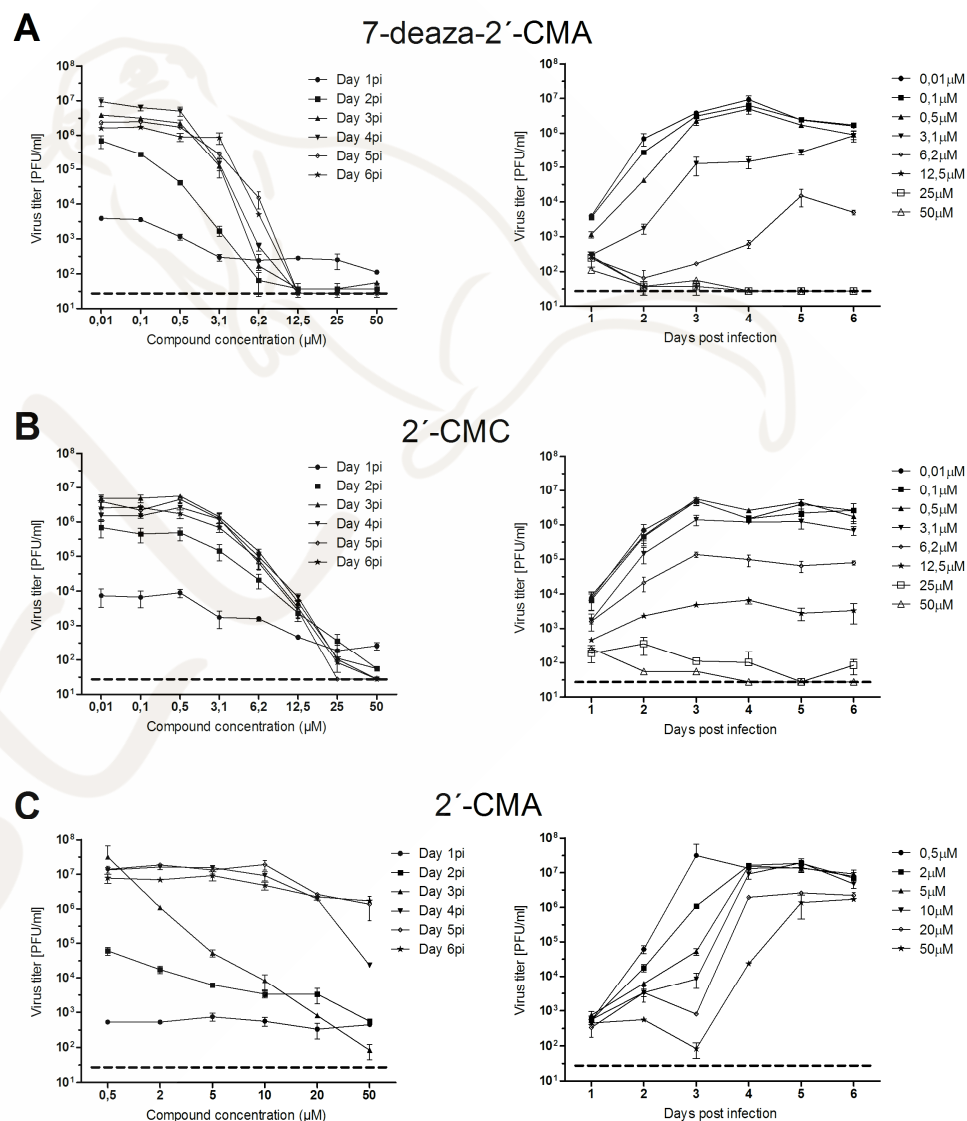
BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

Eyer et al., 2015, Antimicrob. Agents Chemother.

# Antivirová terapie KE

## Farmakologické vlastnosti testovaných látek

Compound	EC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)	SI CC <sub>50</sub> /EC <sub>50</sub>
2'-C-methyladenosine	1.4 ± 0.1	> 50	> 37.0
7-deaza-2'-C-methyladenosine	1.1 ± 0.3	> 50	> 46.6
2'-C-methylcytidine	1.8 ± 0.4	~ 50	~ 28.4



VUVeL

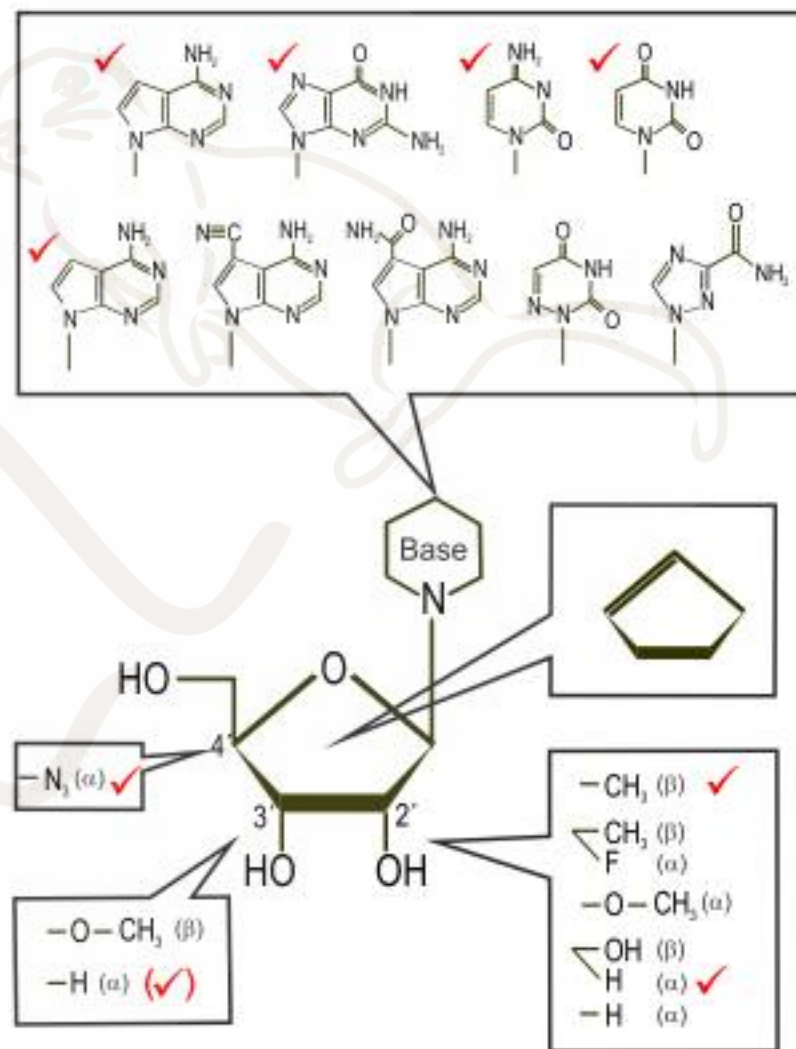
BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

Eyer et al., 2015, Antimicrob. Agents Chemother.  
Eyer et al., 2016, JID

# Antivirová terapie KE

Activity accompanied with the following combinations of heterobase and ribose substitution:

Heterobase identity/modification	Ribose substitution	Ribose position
Adenine	-CH <sub>3</sub> (β)	C2'
7-Deazaadenine	-CH <sub>3</sub> (β)	C2'
Guanine	-CH <sub>3</sub> (β)	C2'
Cytosine	-CH <sub>3</sub> (β)	C2'
	-H (α)	C3'
	-N <sub>3</sub> (α)	C4'
	OH (β) + -N <sub>3</sub> (α)	C2' + C4'
	H(α)	
Uracil	-CH <sub>3</sub> (β)	C2'

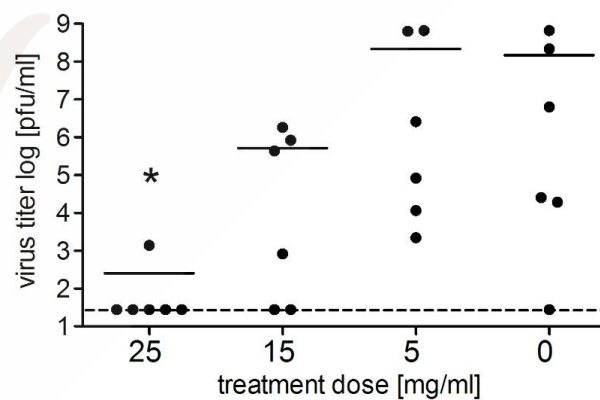
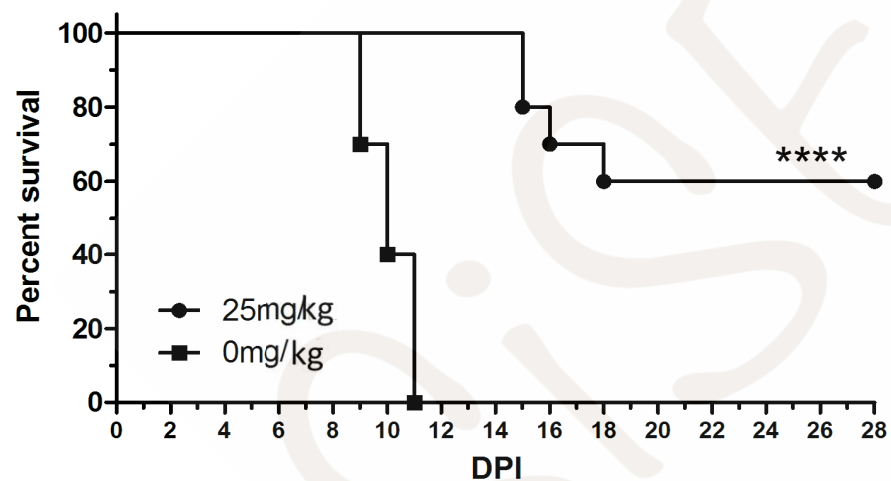
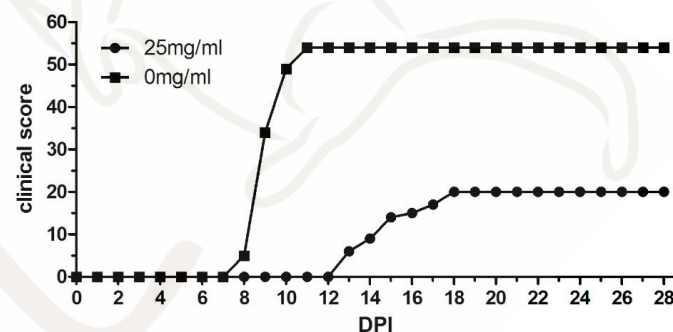
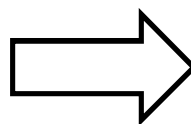


VU VeL

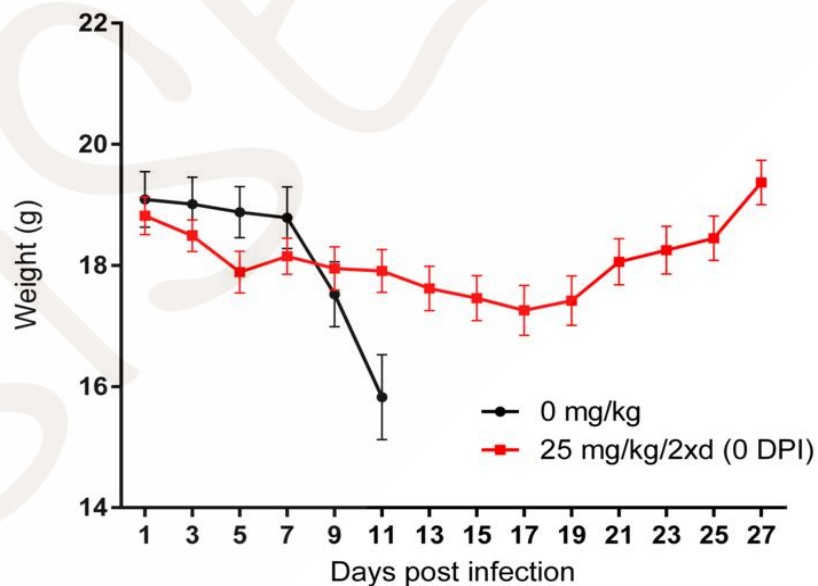
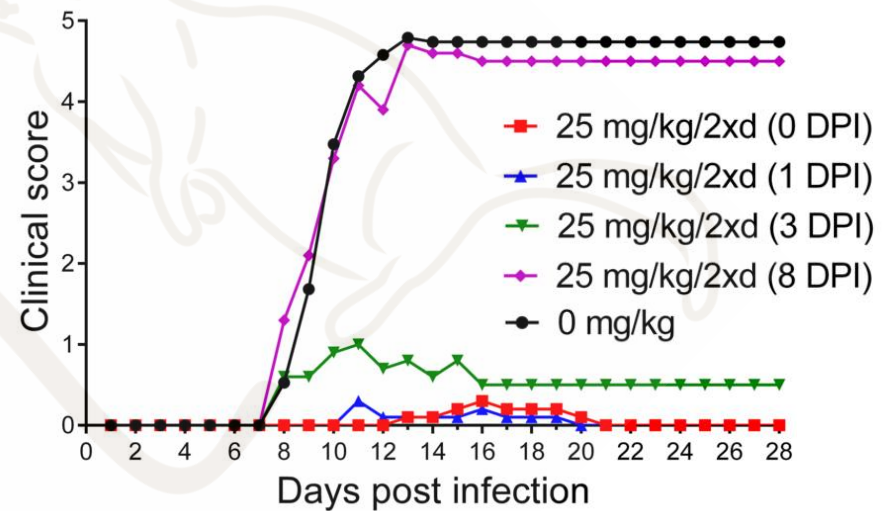
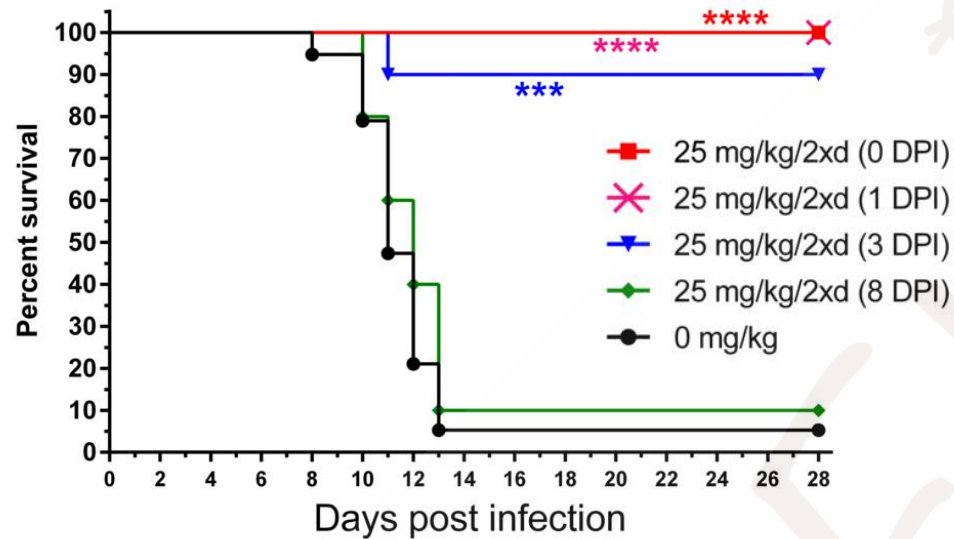
BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

Eyer et al., 2015, Antimicrob. Agents Chemother.  
Eyer et al., 2016, Antiviral Res.

## Účinnost 7-deaza-2'-CMA proti viru KE na myším modelu



# Antivirová terapie západonilské horečky



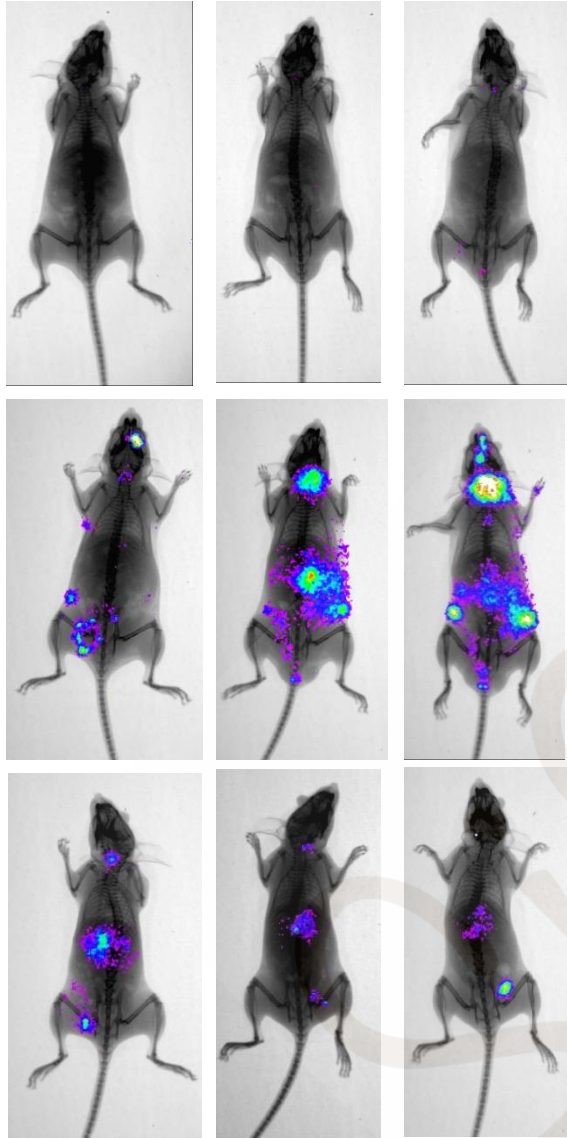
Eyer et al., 2019, AAC

Days post infection

1

4

5



## Monitoring the course of infection using *in vivo* imaging system

Non-infected

TBEV infected, non-treated

TBEV infected, treated with  
7-deaza-2'-CMA (50 mg/kg)

Overlay

20.00 30.00 40.00 50.00 60.00



VU VeL

BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

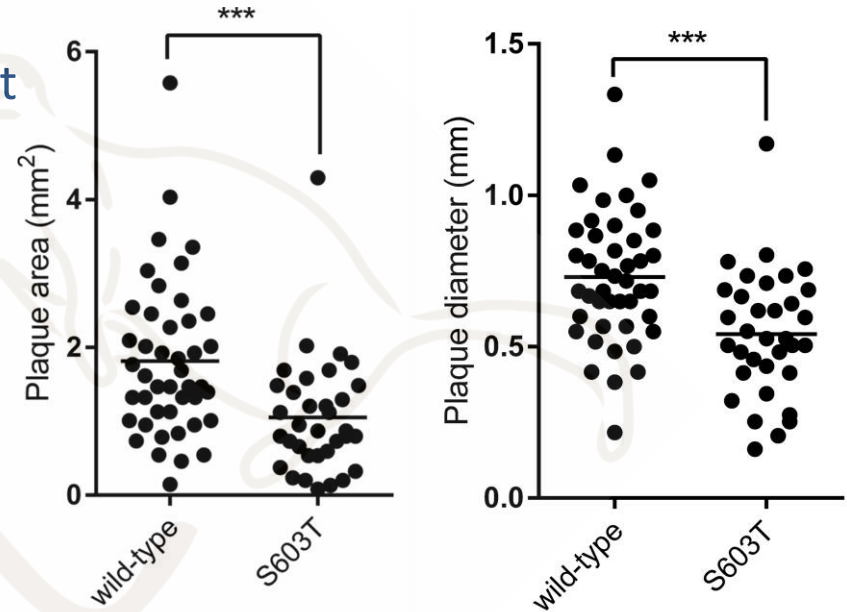
Eyer et al., 2017, JVI

# Antiviral therapy of TBE

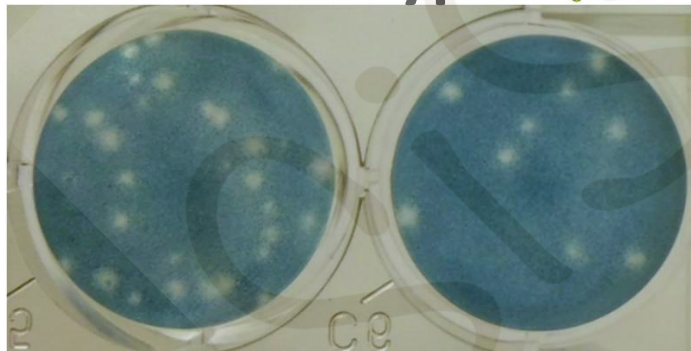
*In vitro* selection of drug-resistant TBEV mutant



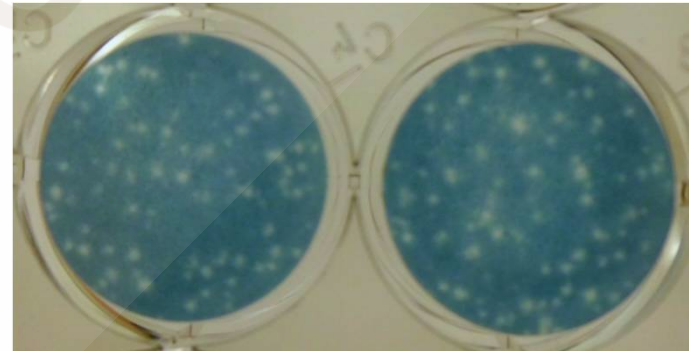
Concentration of the antiviral compound



Wild type



Mutant



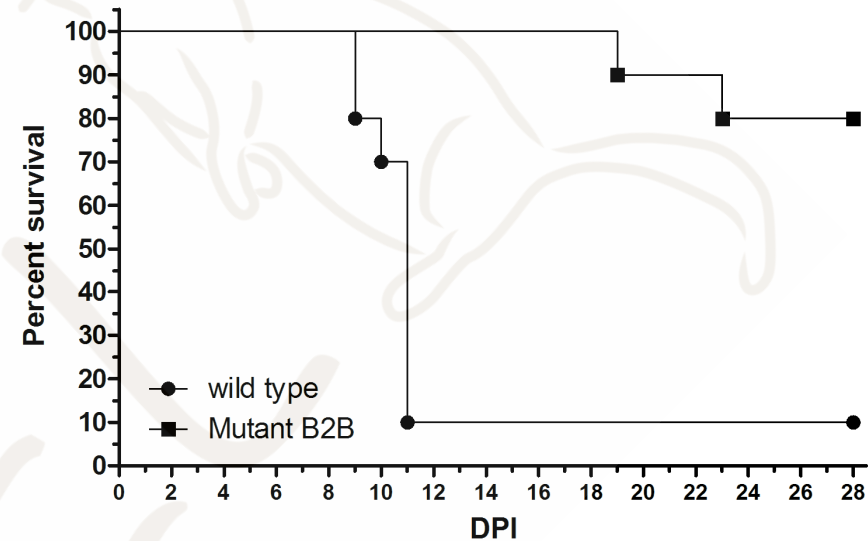
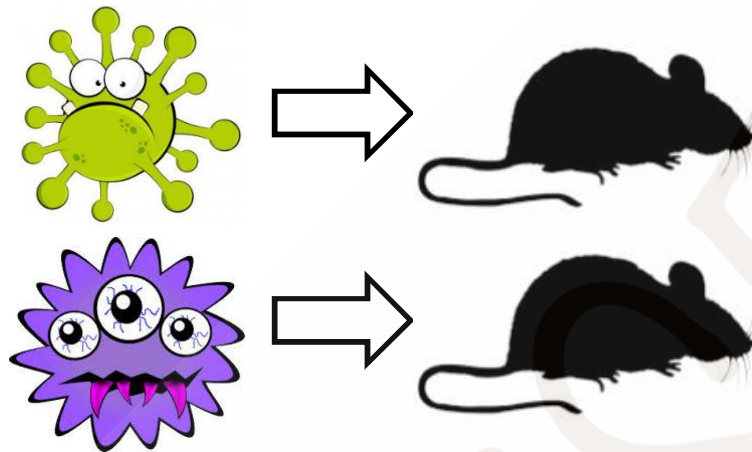
VU VeL

BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

Eyer et al., 2017, JVI

# Antiviral therapy of TBE

Survival of mice after infection with the 7-deaza-2'-CMA-resistant mutant and wild type TBEV



Comparison of Survival Curves	
Log-rank (Mantel-Cox) Test	
Chi square	12.66
df	1
P value	0.0004
P value summary	***
Are the survival curves sig different?	Yes
Gehan-Breslow-Wilcoxon Test	
Chi square	13.42
df	1
P value	0.0002
P value summary	***
Are the survival curves sig different?	Yes



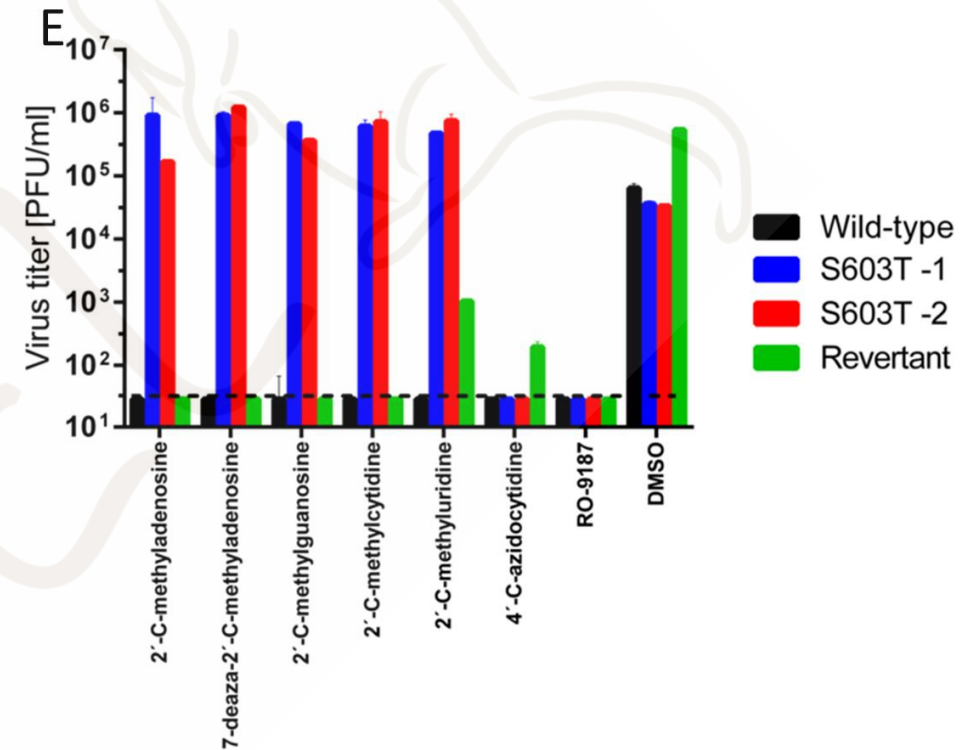
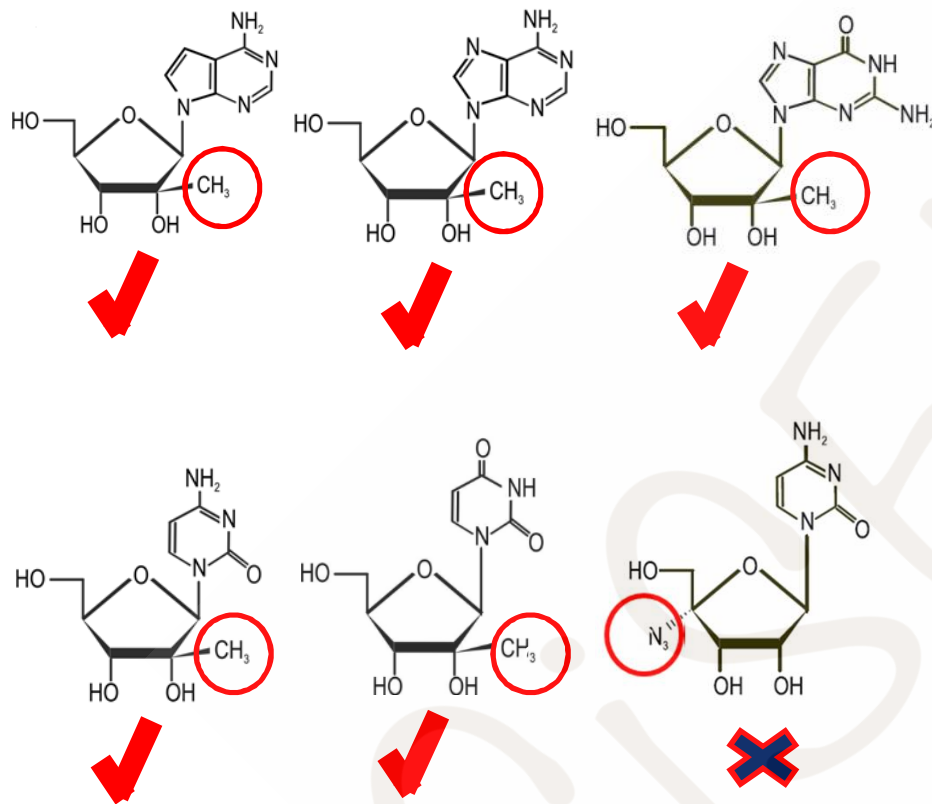
VU VeL

BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

Eyer et al., 2017, JVI

# Antiviral therapy of TBE

Drug-resistance profiles of 7-deaza-2'-CMA-resistant mutant obtained *in vitro*



VU VeL

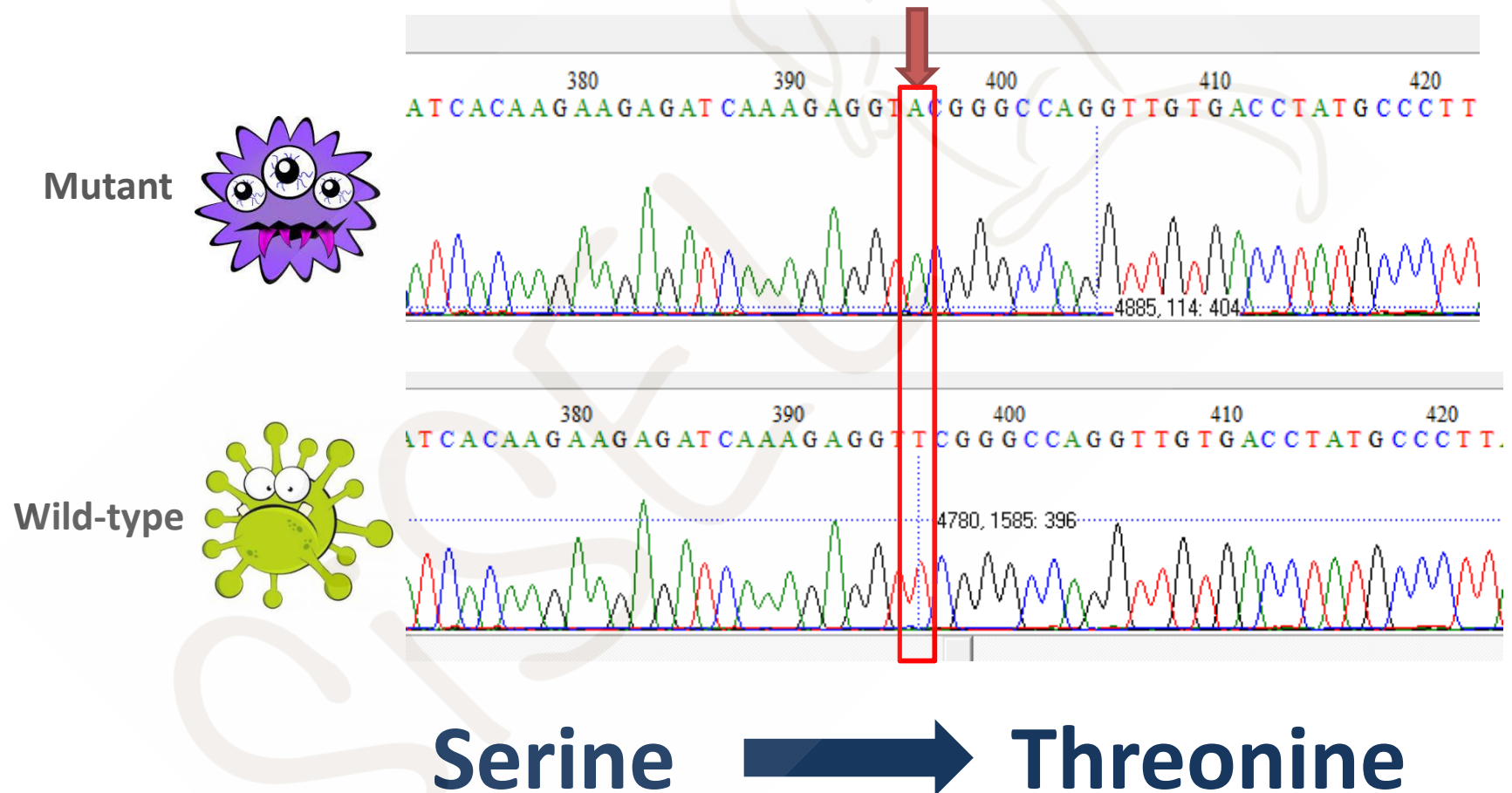


BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

Eyer et al., 2017, JVI

# Antiviral therapy of TBE

Identification of the crucial point mutation in NS5 region of 7-deaza-2'-CMA-resistant mutant



VU VeL



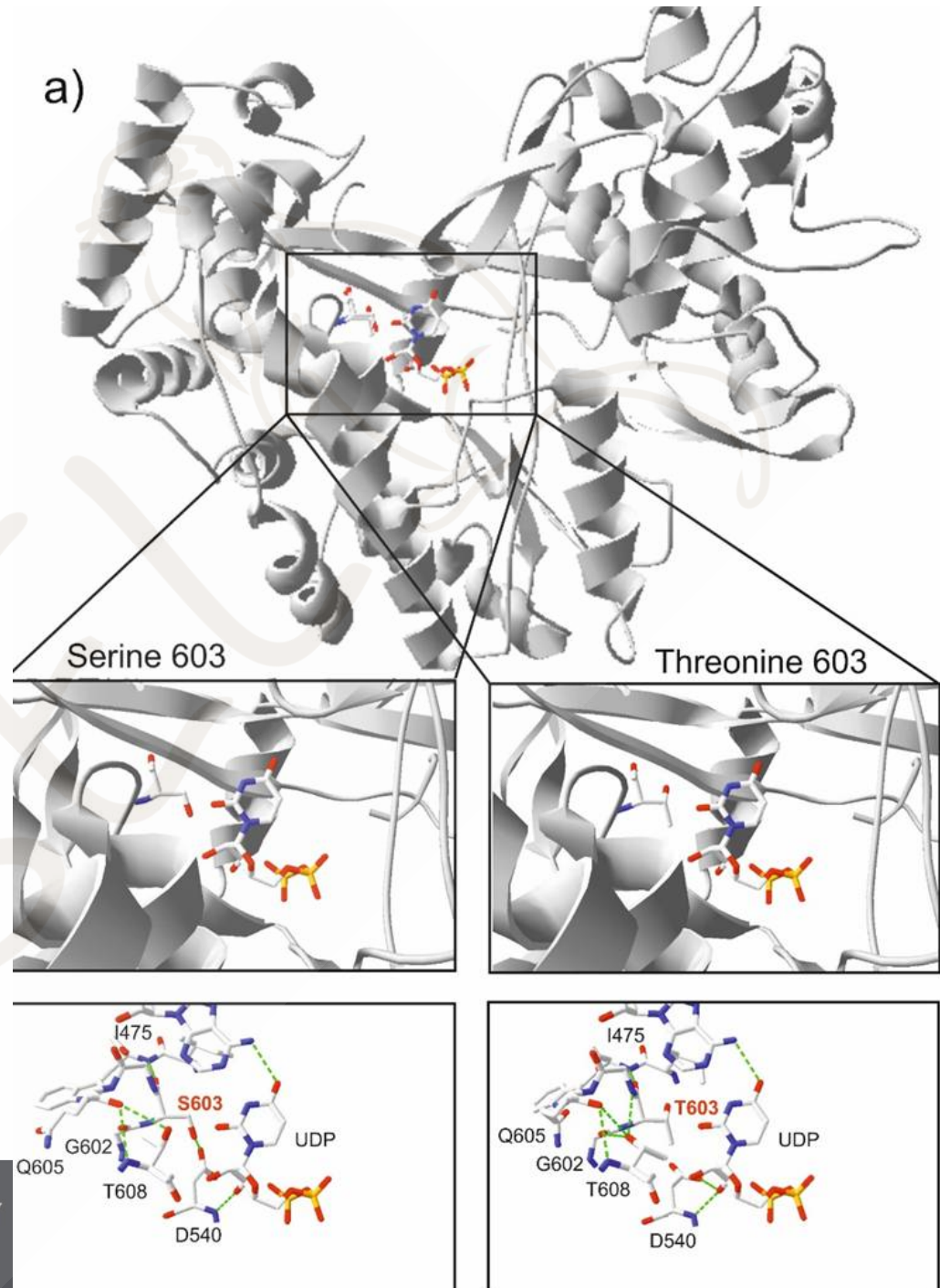
BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

Eyer et al., 2017, JVI

# Antiviral therapy of TBE

Identification of the crucial point mutation in NS5 region of 7-deaza-2'-CMA-resistant mutant

a)

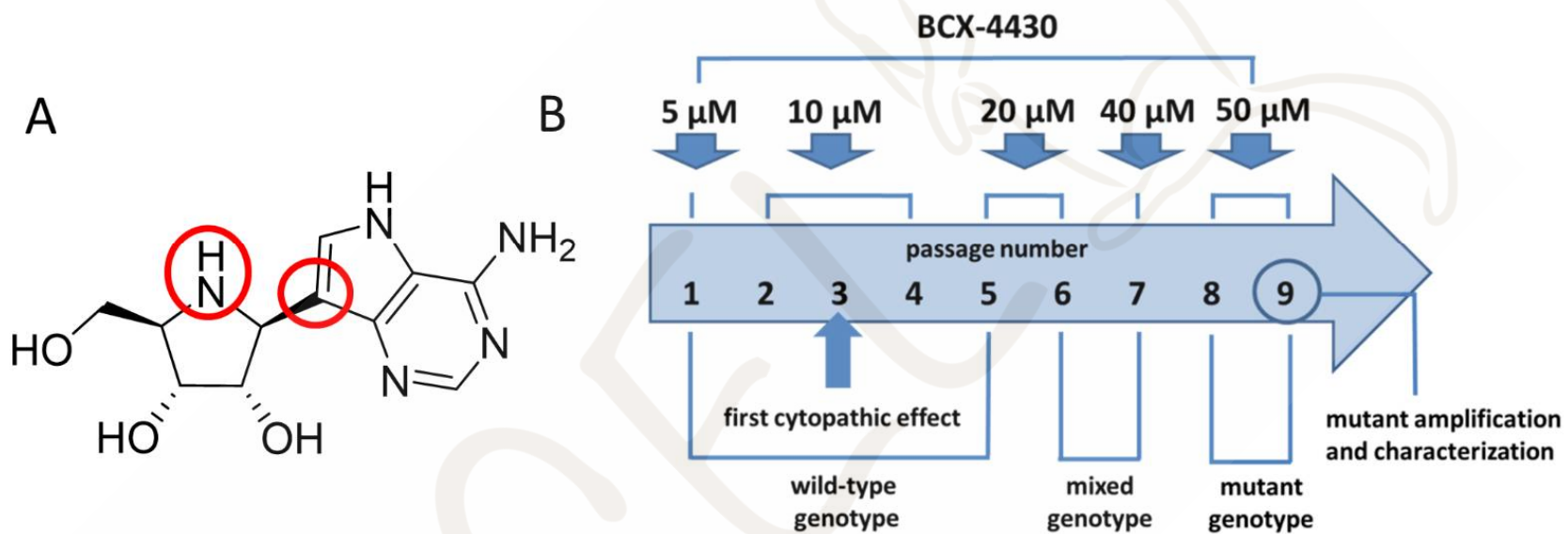


VU VeL

BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR

# Antivirová terapie KE

Galidesivir

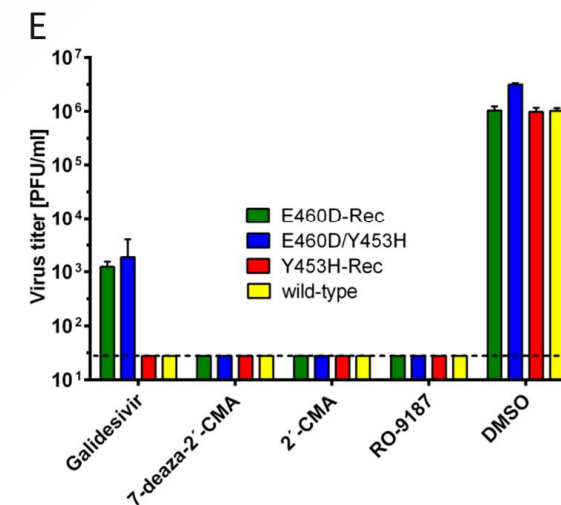
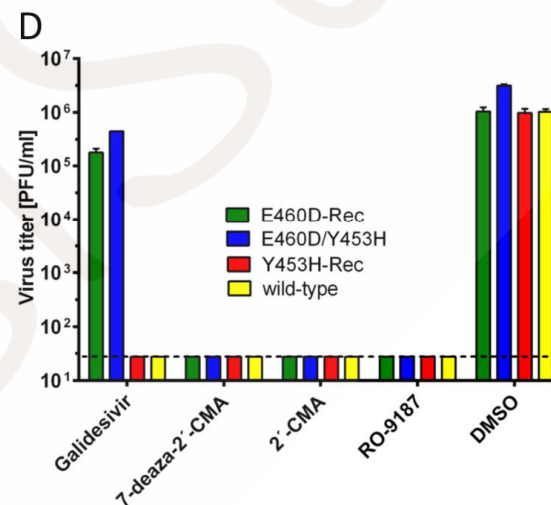
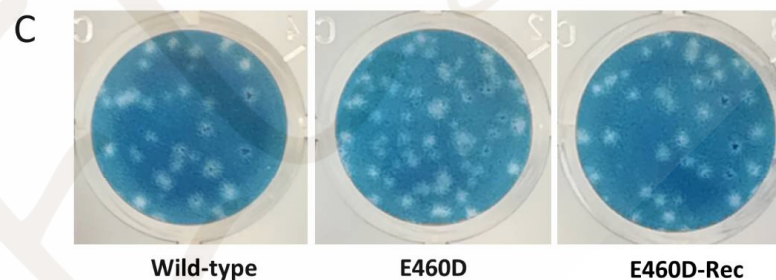
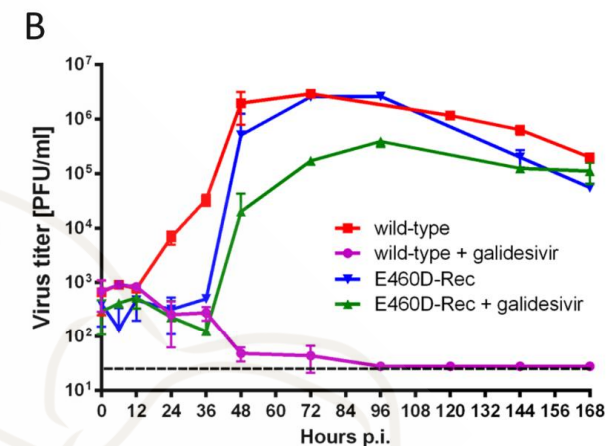
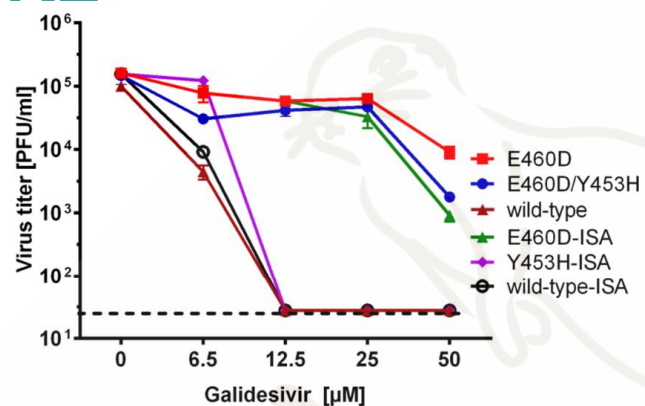


VU VeL

Eyer et al., 2019, Journal of Virology

# Antivirová terapie KE

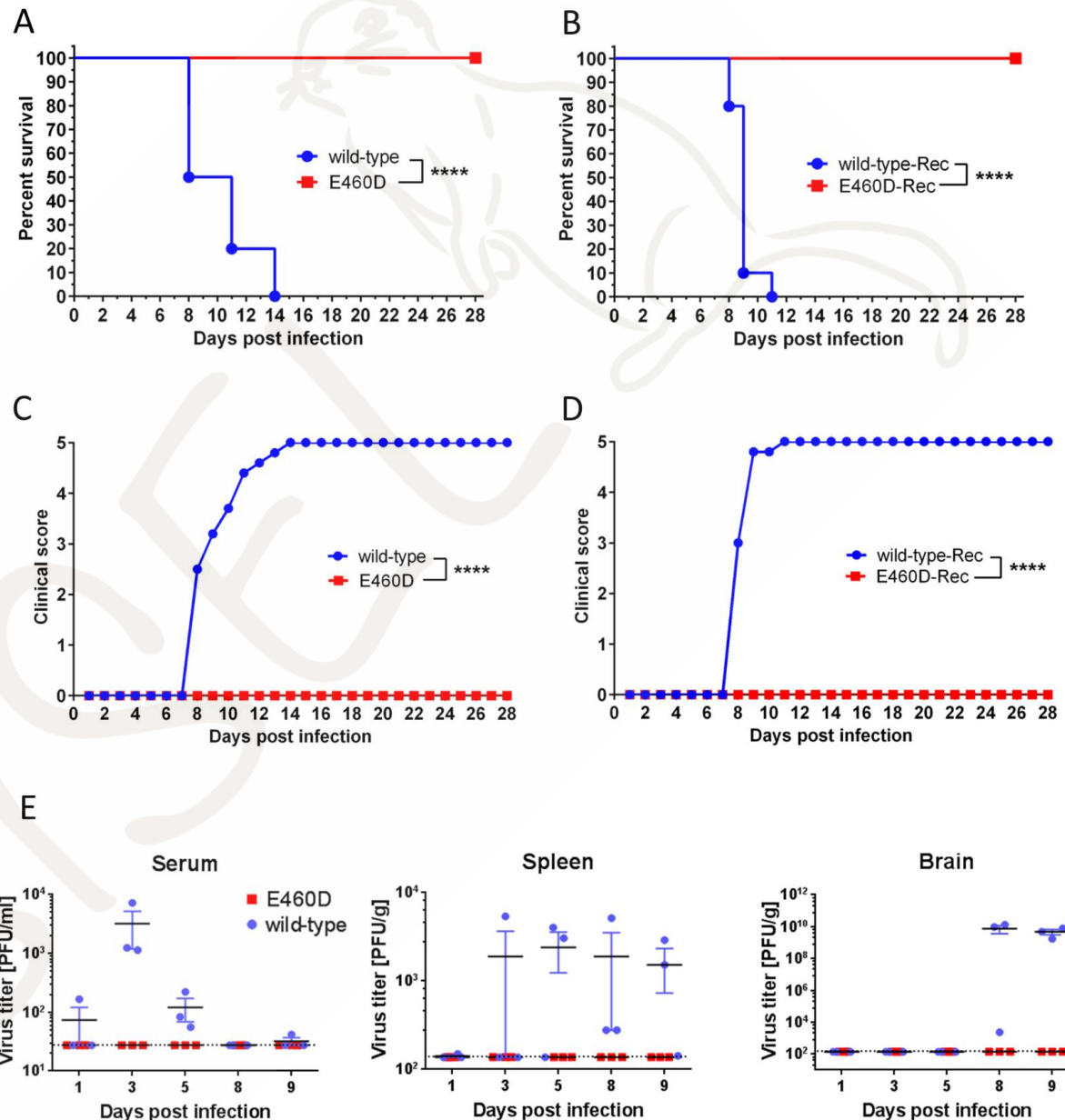
## Galidesivir



VU VeL

# Antivirová terapie KE

Galidesivir

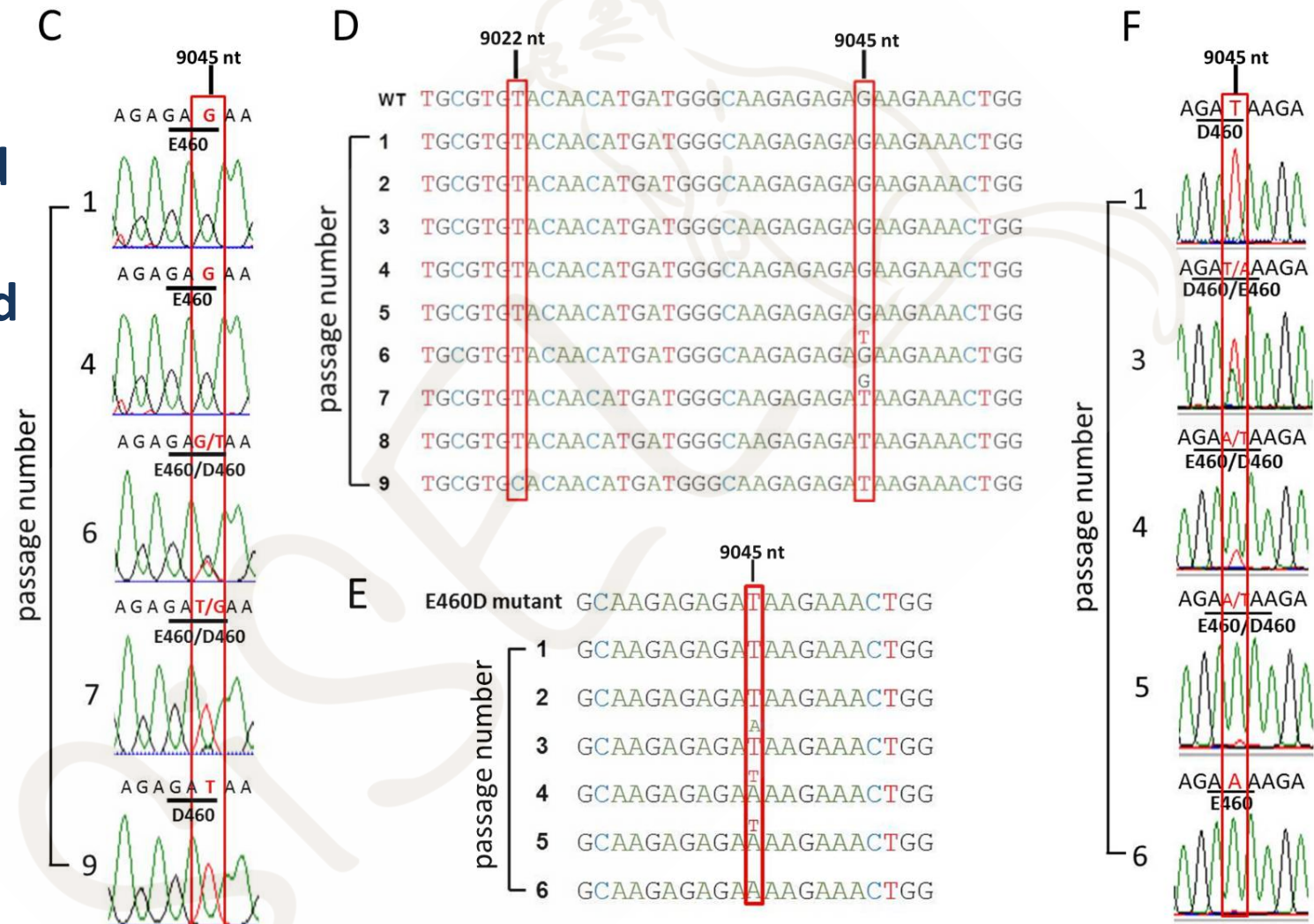


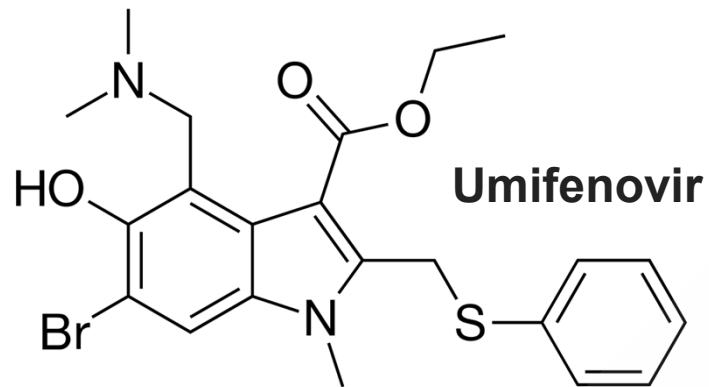
VU VeL

# Antivirová terapie KE

Galidesivir

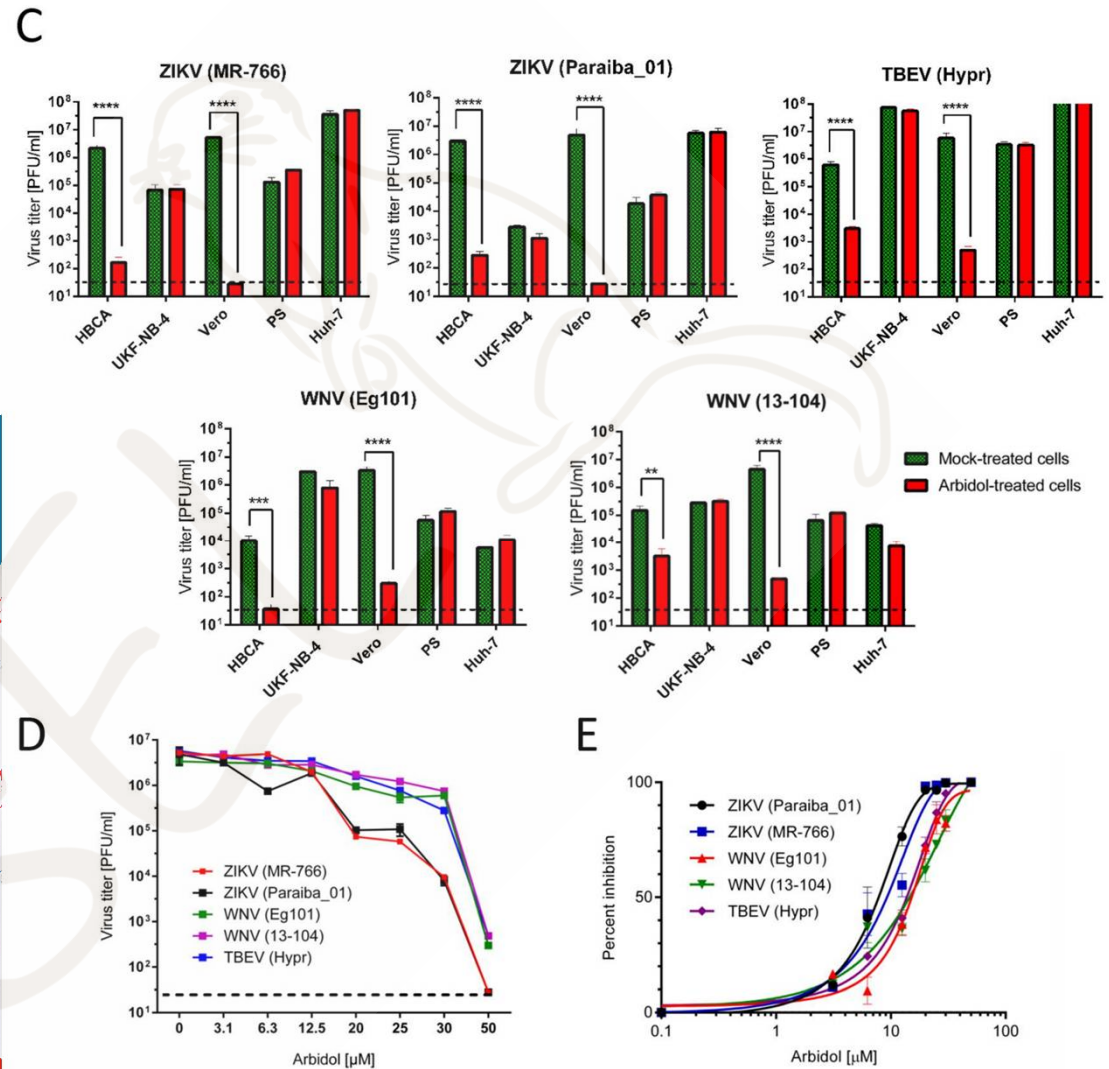
Aspartic acid  
↓  
Glutamic acid





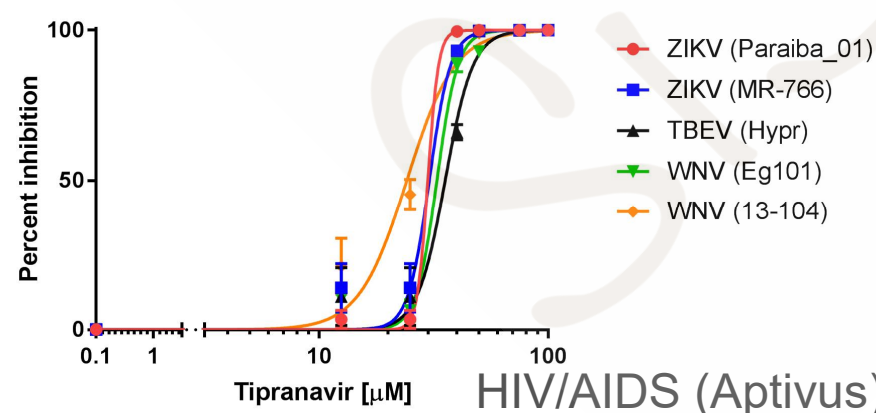
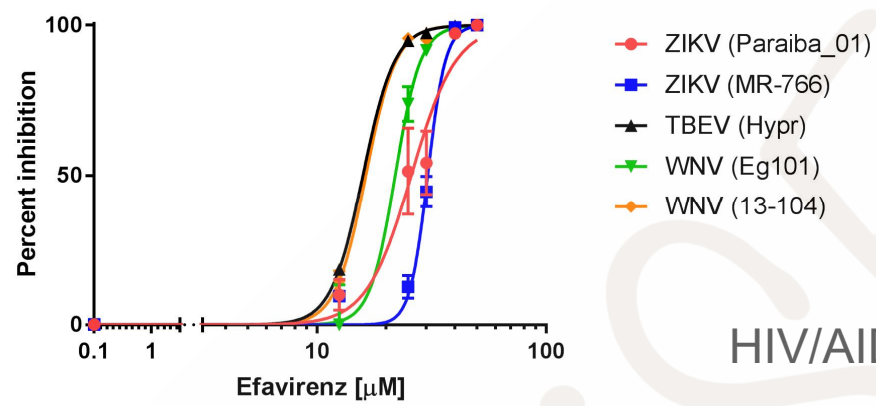
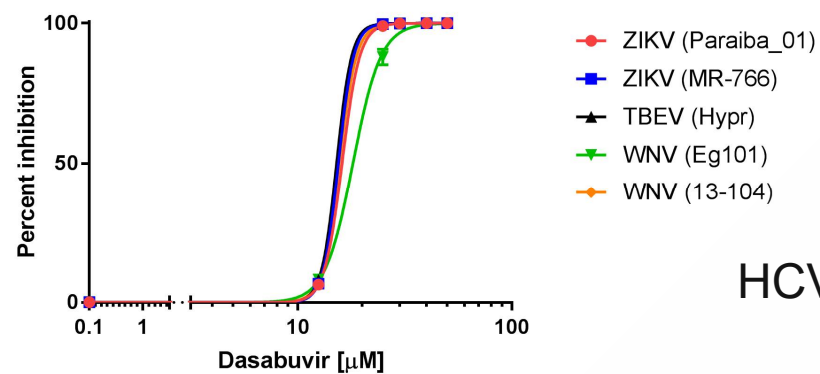
# ARBIDOL

CherryPharmacy.com  
WORLDWIDE SHIPPING **\$0.90** PER capsule



Haviernik et al., 2018, Viruses

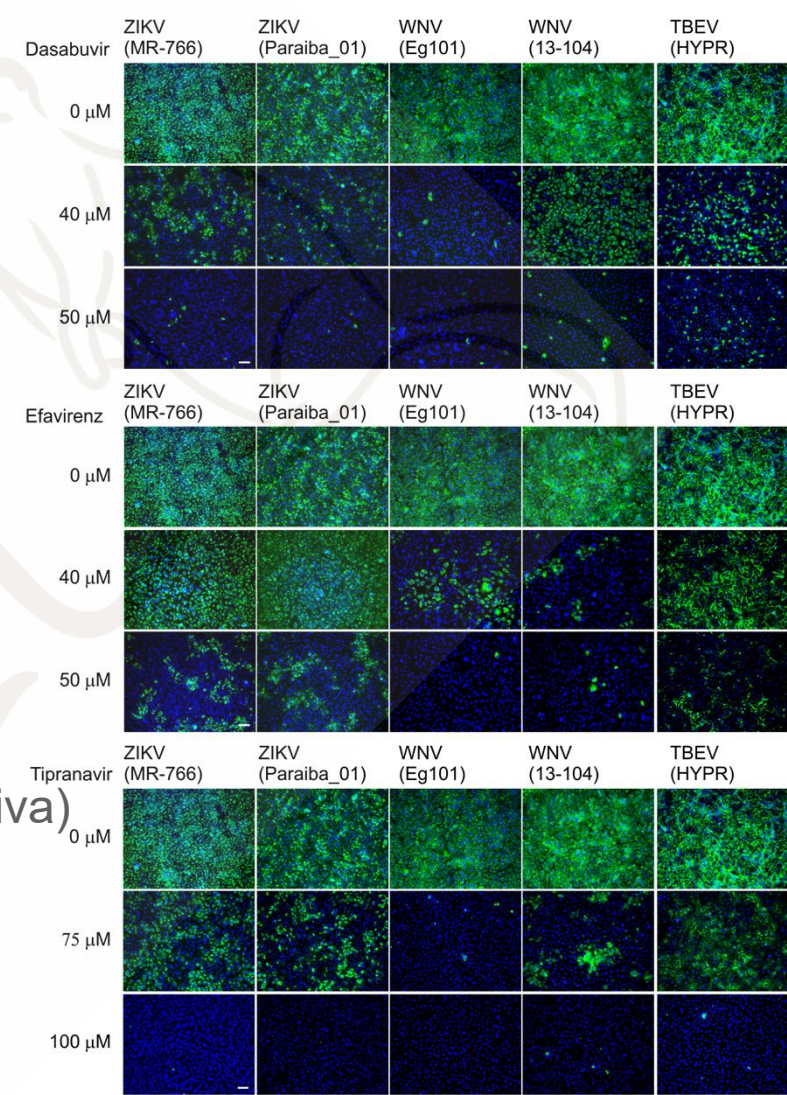
# FDA-approved drugs

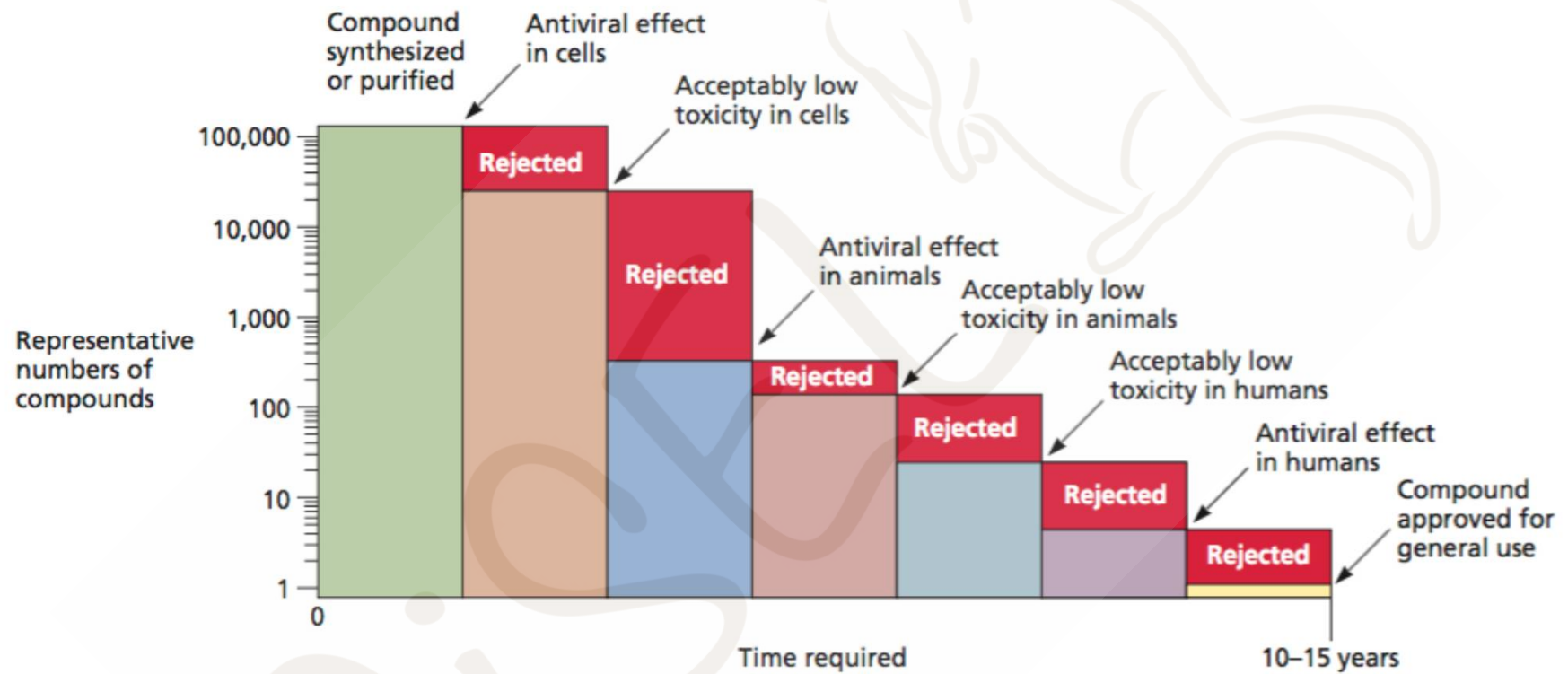


HCV (Exviera)

HIV/AIDS (Sustiva)

HIV/AIDS (Aptivus)

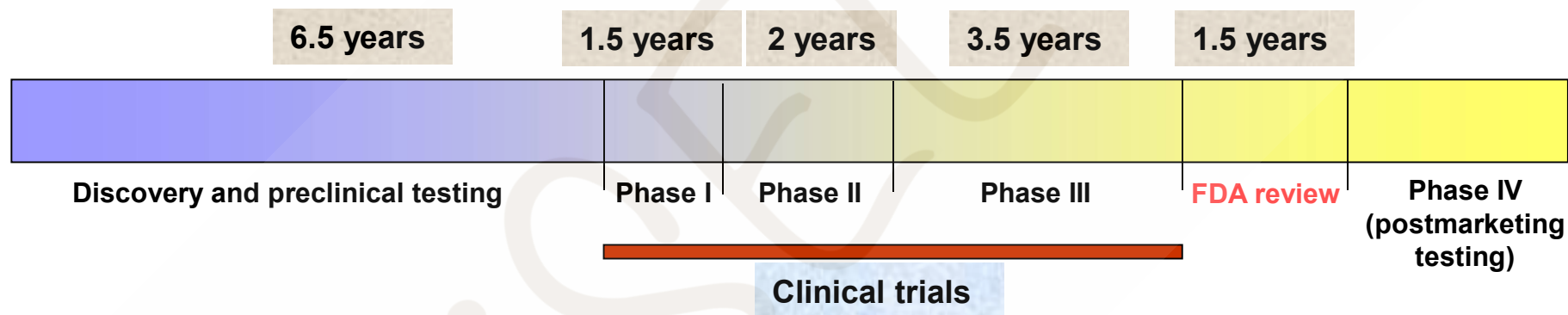




Principles of Virology, ASM Press

# Trpělivost!

vývoj léku trvá zpravidla **15 let**



**Co bude potřeba za 15 let?**

## Jak objevit nový lék?

- systematická práce, znalosti a zkušenosti v oboru
- dobrá pracovní hypotéza
- **tvrdohlavost**
- **šťěstí** v nalezení dobrého partnera – chemik x virolog
- **systematický skrínink** biologických aktivit
- **šťěstí** v nalezení vedoucí struktury
- **šťěstí** v nalezení dobrého kandidáta pro lék
- **šťěstí** v nalezení dobrého partnera z farmaceutického průmyslu
- **šťěstí** v preklinických a klinických testech

**Je potřeba opravdu hodně štěstí**

**a k tomu \$ 800 M a 15 let**

# Poděkování



HOKKAIDO  
UNIVERSITY

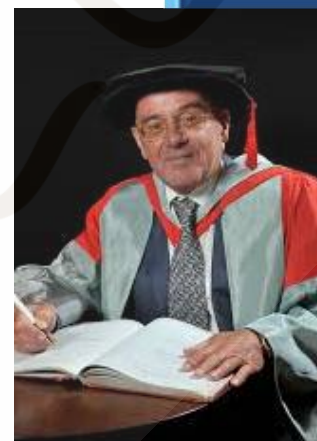
Kentaro Yoshii  
Hirofumi Kondo  
Minato Hirano  
Memi Muto  
Shintaro Kobayashi  
Manabu Igarashi  
Hiroaki Kariwa



Radim Nencka



Ernest A. Gould X. de Lamballerie



Erik De Clercq



Johan Neyts



VUwL



BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR



**Děkuji za pozornost!**



**VU VeL**

BIOLOGY  
CENTRE  
ASCR