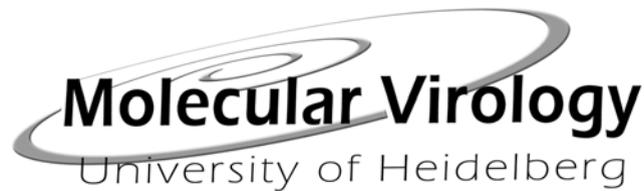


**Molekularbiologie IV: Virologie**

# **Therapie und Prävention von Virusinfektionen**



**Ralf Bartenschlager**

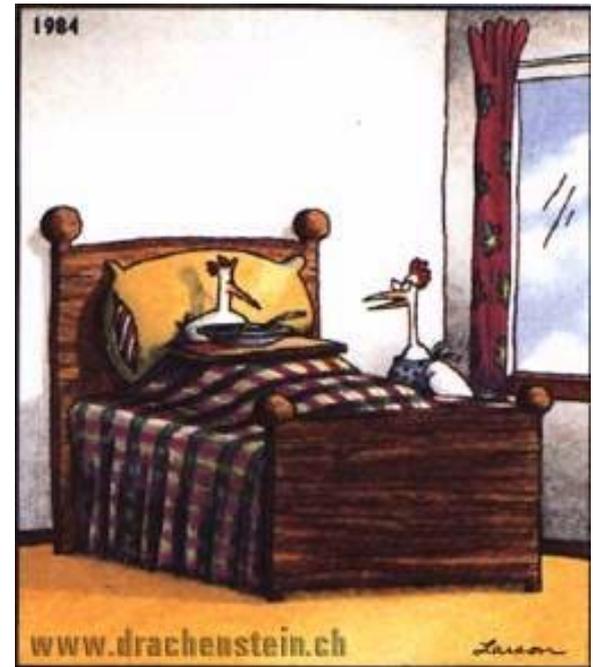
Abteilung Molekulare Virologie, Hygiene Institut

INF 345, 1.OG

**<http://molecular-virology.uni-hd.de>**

# Probleme für die Kontrolle von Viruserkrankungen

- Viren sind obligate Zellparasiten:
  - Wenige virusspezifische Angriffsziele
- Hohe Replikationsrate, häufig hohe Mutationsrate
- Fehlende *in vitro* und *in vivo* Vermehrungssysteme (HCV, HPV)
- Symptome oft erst nach Virusausscheidung



"Quit complaining and eat it! ... Number one, chicken soup is good for the flu—and number two, it's nobody we know."

# Entwicklung antiviral wirksamer Substanzen

Virusvermehrungssystem  
in Zellkultur

Random Screening:  
Testen von Substanz-  
Bibliotheken  
auf antivirale Wirksamkeit

Bestimmung des  
antiviralen targets

Identifizierung viraler  
Zielmoleküle  
essentiell für Replikation;  
ohne funktionelle Homologe  
in der Wirtszelle

Etablierung eines  
Testsystems für dieses  
Zielmolekül

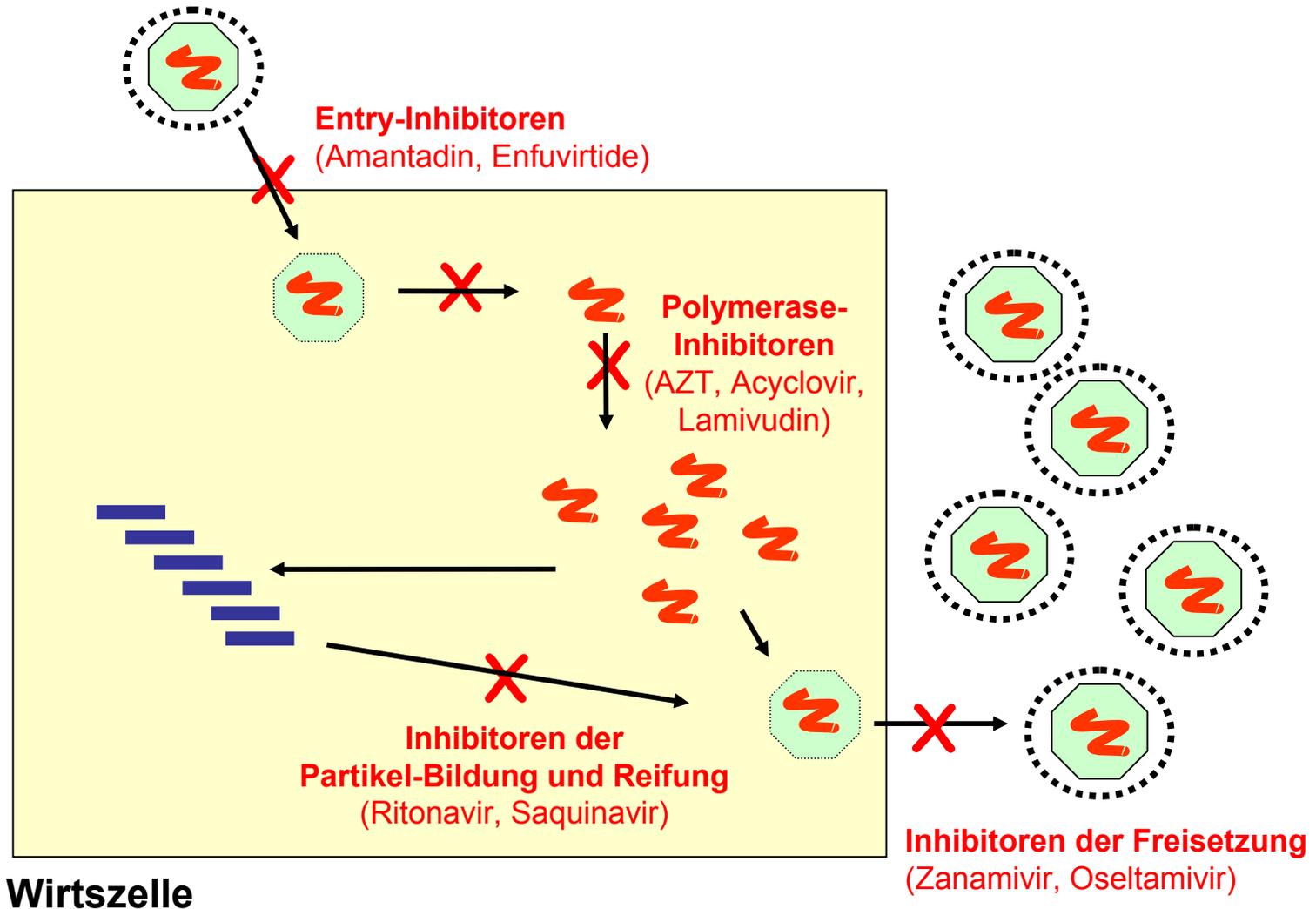
Random Screening oder  
rational drug design

Funktionelle und strukturelle Optimierung des Inhibitors

Wirksamkeit im Versuchstier (*in vivo*)

Sicherheit und Wirksamkeit im Probanden/Patienten

# Angriffspunkte antiviraler Medikamente



# Antivirale Therapiestrategien

---

## Polymerase-Inhibitoren

RT-Inhibitoren  
Polymerase-Inhibitoren

HIV, HBV  
Herpesviren

Ribavirin

RNA-Viren  
HCV, RSV, Lassa, Hanta

Protease-Inhibitoren

HIV  
(HCV, SarsCoV, Picorna)

Inhibitoren des Viruseintritts

Fusionsinhibitoren  
(WIN-compounds  
Amantadin, Rimantadin

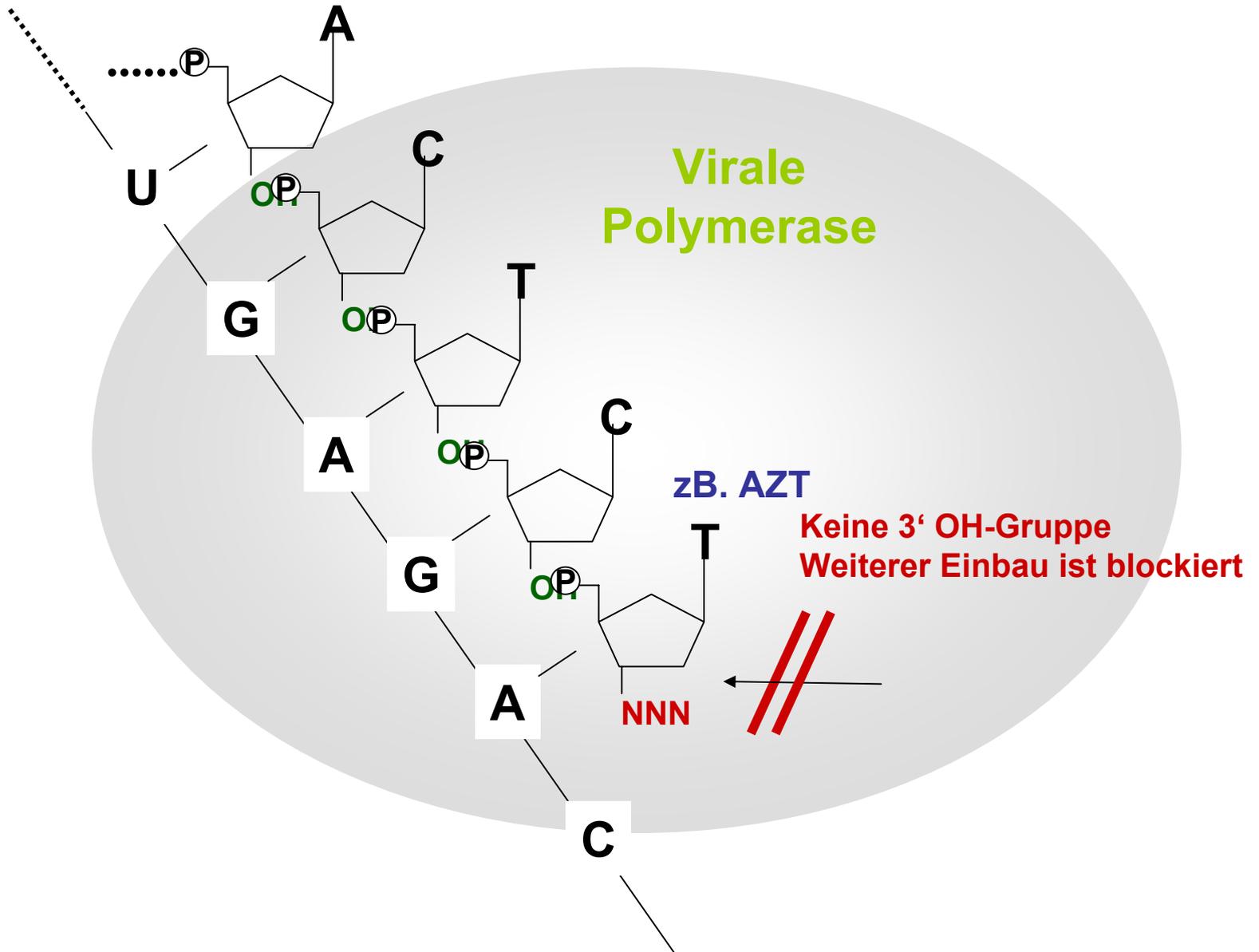
HIV  
Picornaviren)  
Influenza

Inhibitoren der Virusfreisetzung

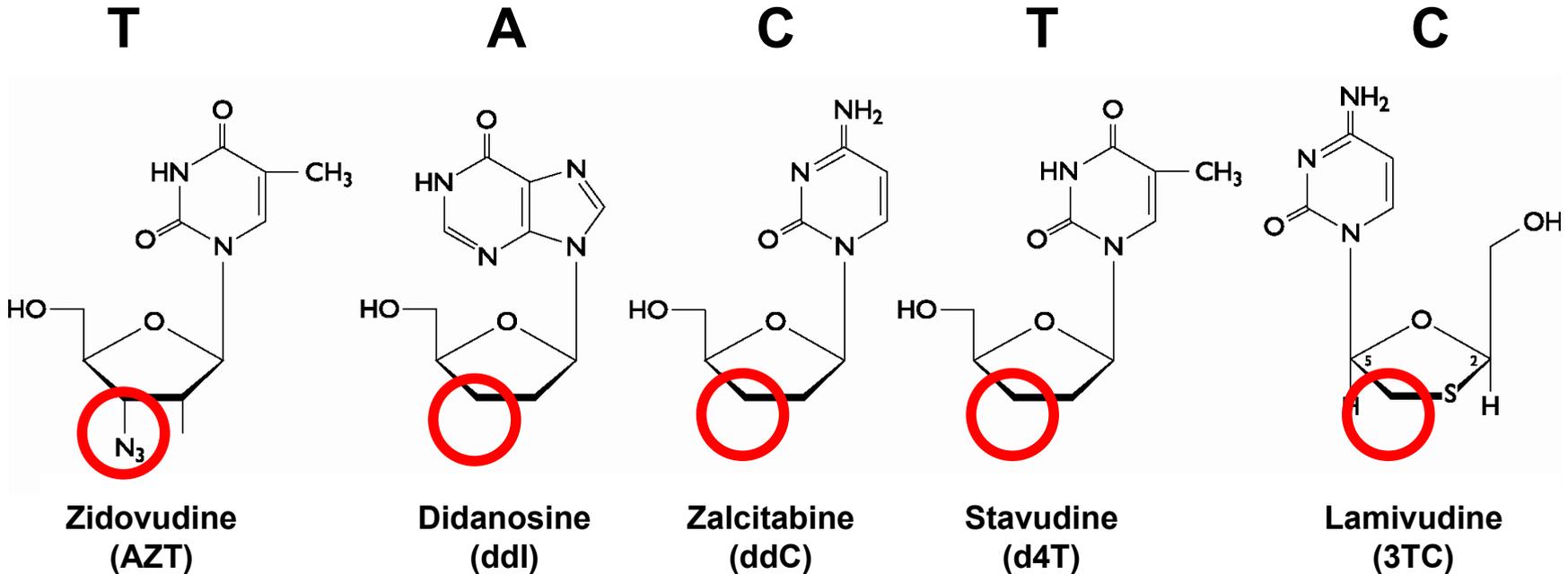
Zanamivir, Oseltamivir

Influenza

# Antivirale Klassiker: Kettenterminatoren



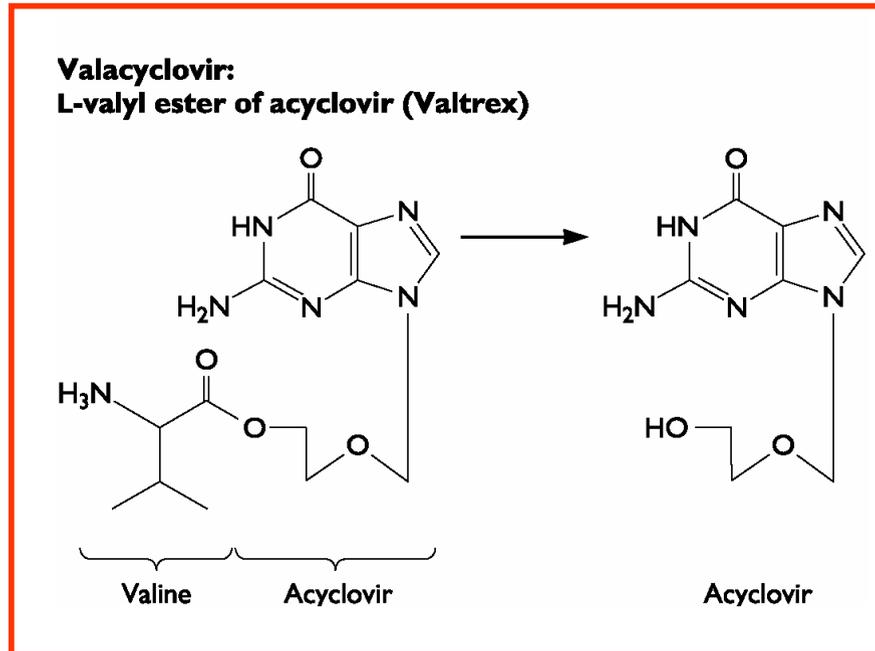
# Nukleosidanaloga als Inhibitoren der Reversen Transkriptase



- 3' Azido-NTP oder Didesoxy-NTP
- Bevorzugte Erkennung durch virale Polymerasen bzw. reverse Transkriptase
- Aktivierung: Herstellung des Triphosphats durch zelluläre Enzyme (Prodrug)

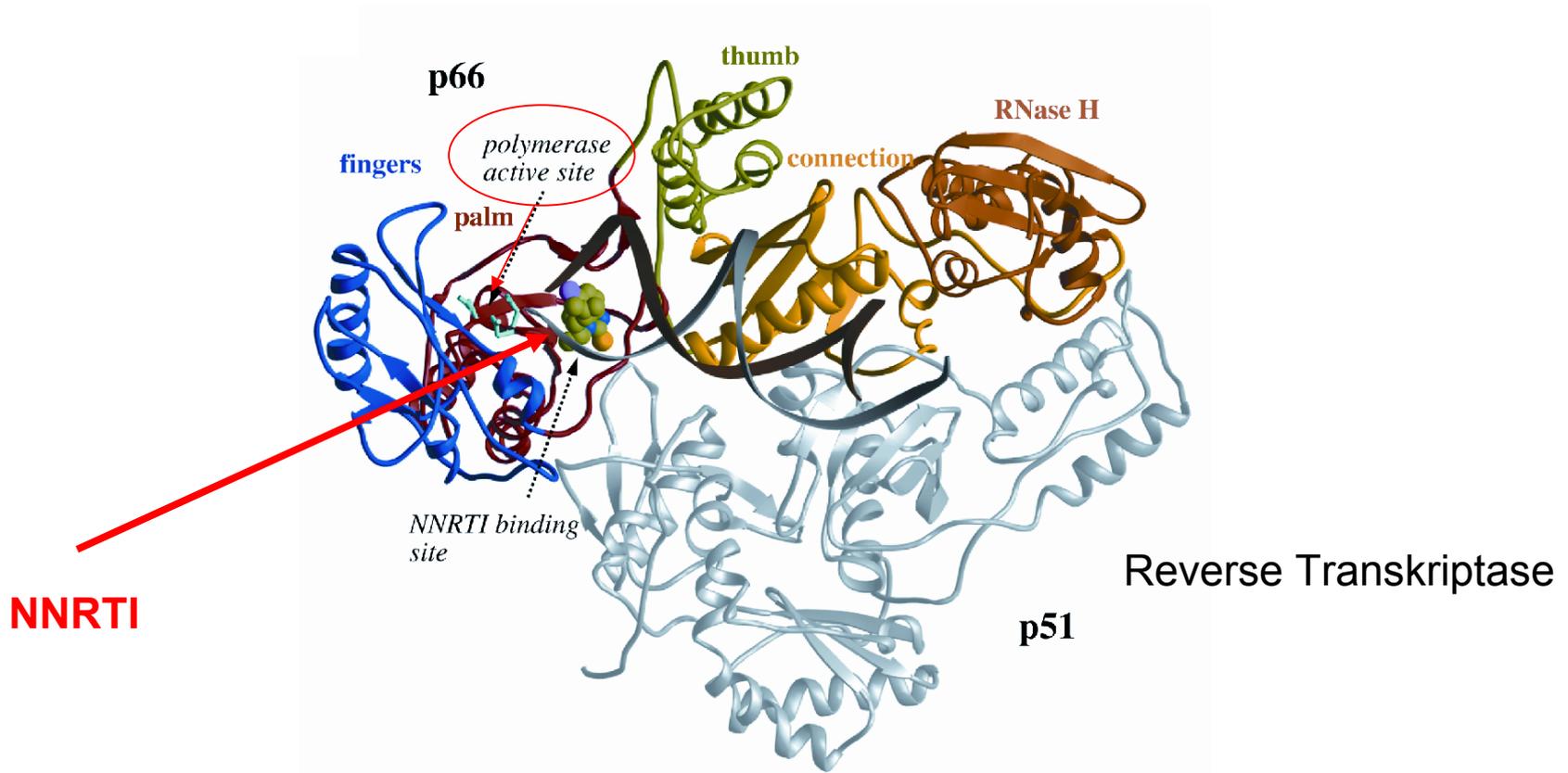


# Acyclovir-Derivate mit besserer Bioverfügbarkeit



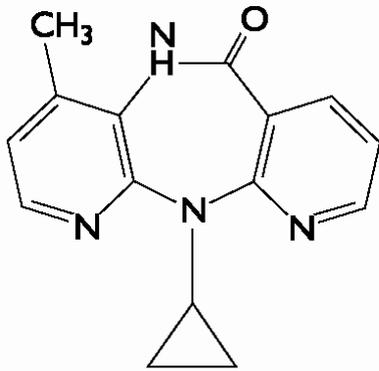
**Prodrug**

# Nicht-nukleosidische Inhibitoren (NNRTI) der HIV RT

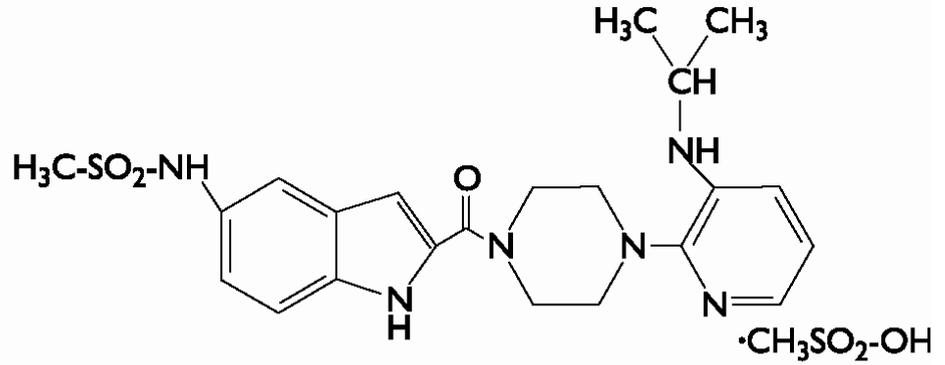


- Bindung an die Reverse Transkriptase (RT) außerhalb des aktiven Zentrums
- Kein Einbau bei der Nukleinsäure-Synthese
- **Allosterische Hemmung** durch Blockierung der RT-Struktur

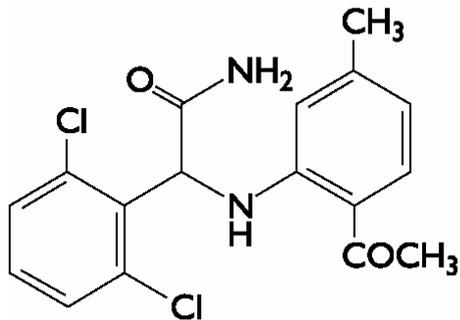
# Nicht-nukleosidische Inhibitoren der HIV RT



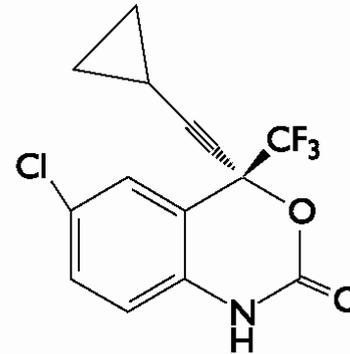
Nevirapine



Delavirdine



Loviride



Efavirenz

# Antivirale Therapiestrategien

---

Polymerase-  
Inhibitoren

RT-Inhibitoren

HIV, HBV

Polymerase-Inhibitoren

Herpesviren

**Ribavirin**

RNA-Viren

HCV, RSV, Lassa, Hanta

Protease-  
Inhibitoren

HIV

*(HCV, SarsCoV, Picorna)*

Inhibitoren des  
Viruseintritts

Fusionsinhibitoren

HIV

*(WIN-compounds*

*Picornaviren)*

Amantadin, Rimantadin

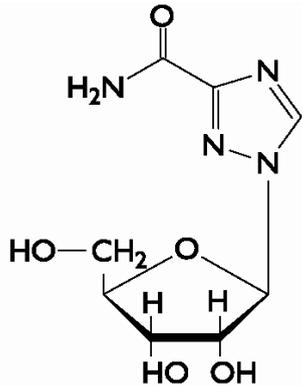
Influenza

Inhibitoren der  
Virusfreisetzung

Zanamivir, Oseltamivir

Influenza

# Ribavirin



Ribavirin

Relativ **unspezifische** Wirkung, Einsatz gegen RNA-Viren

**HCV**: Kombinationstherapie mit **Interferon  $\alpha$**

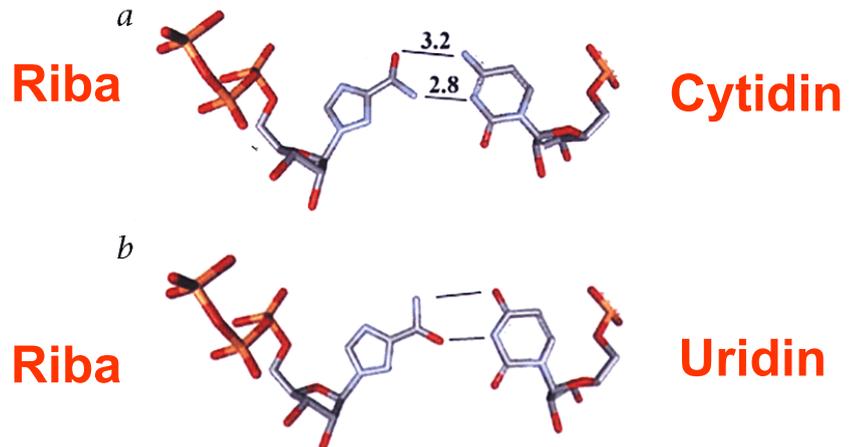
**RSV**: Inhalationstherapie bei schweren RSV-Infektionen im Kindesalter

**Lassavirus, Hantavirus**

Wirkmechanismen: Hemmung des Capping  
IMPDH-Hemmung (GTP-Depletion)  
RNA-Mutagen

Guanosin Analogon

Anstieg Mutationsrate bei Poliovirus von 1,5 auf 6,9 Mutationen/Genom (in Zell-Kulturen!)



# Antivirale Therapiestrategien

---

Polymerase-  
Inhibitoren

RT-Inhibitoren

HIV, HBV

Polymerase-Inhibitoren

Herpesviren

Ribavirin

RNA-Viren

HCV, RSV, Lassa, Hanta

**Protease-  
Inhibitoren**

**HIV**

***(HCV, SarsCoV, Picorna)***

Inhibitoren des  
Viruseintritts

Fusionsinhibitoren

HIV

*(WIN-compounds*

*Picornaviren)*

Amantadin, Rimantadin

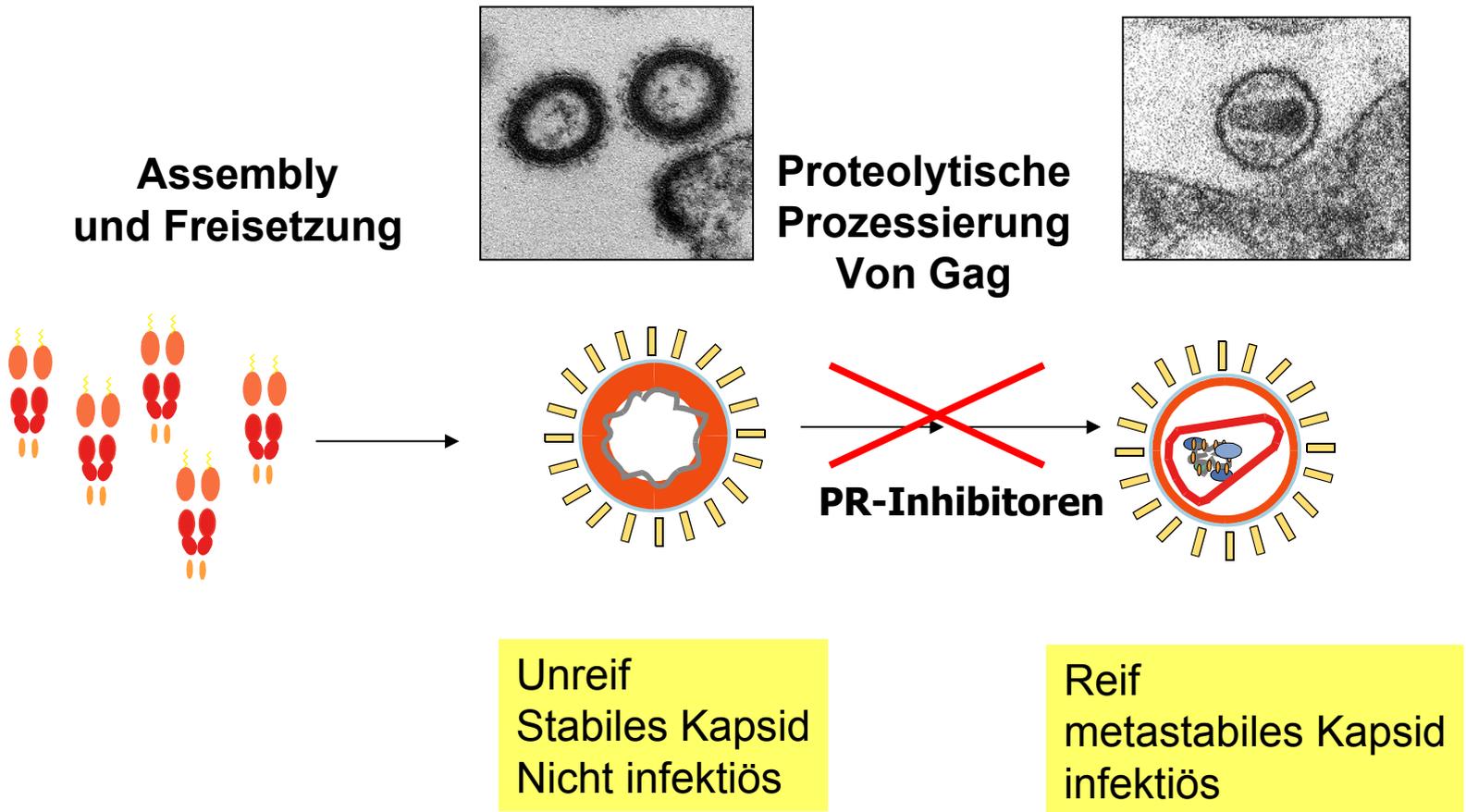
Influenza

Inhibitoren der  
Virusfreisetzung

Zanamivir, Oseltamivir

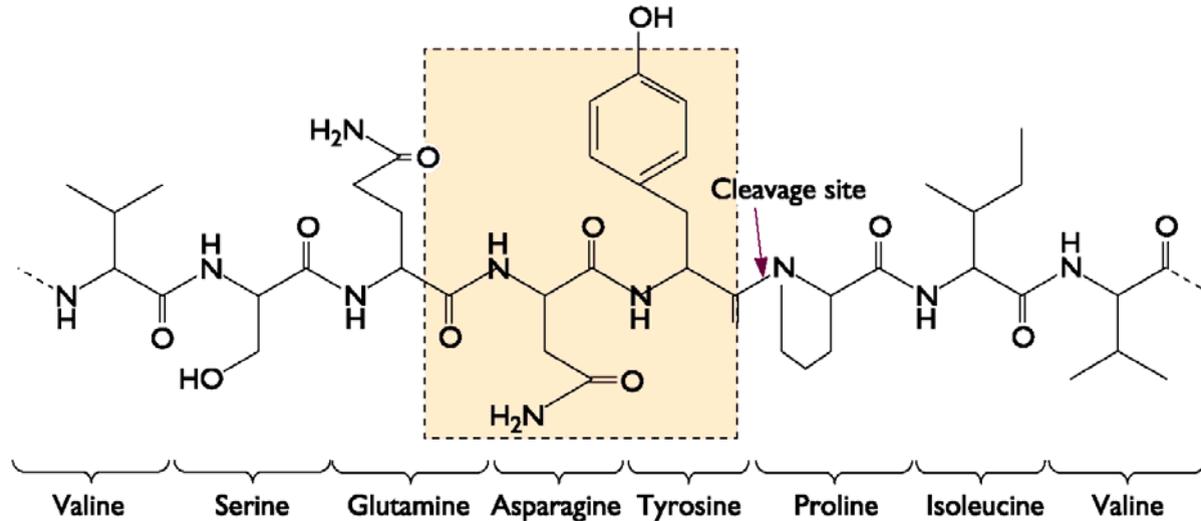
Influenza

# Inhibitoren der HIV Protease verhindern die Virusreifung

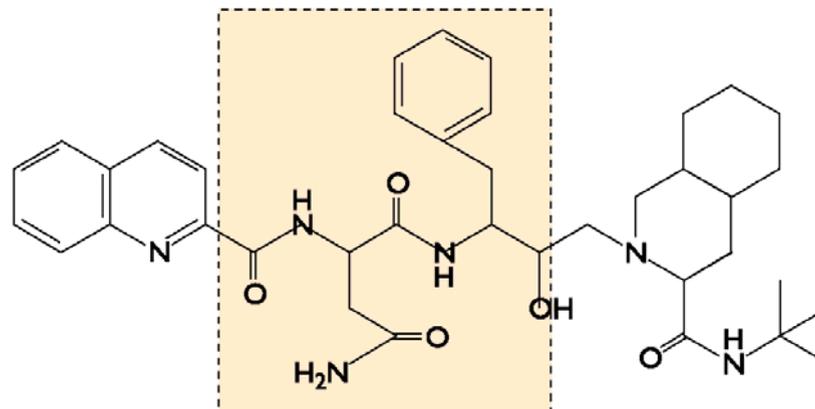


# Inhibitoren der HIV Protease

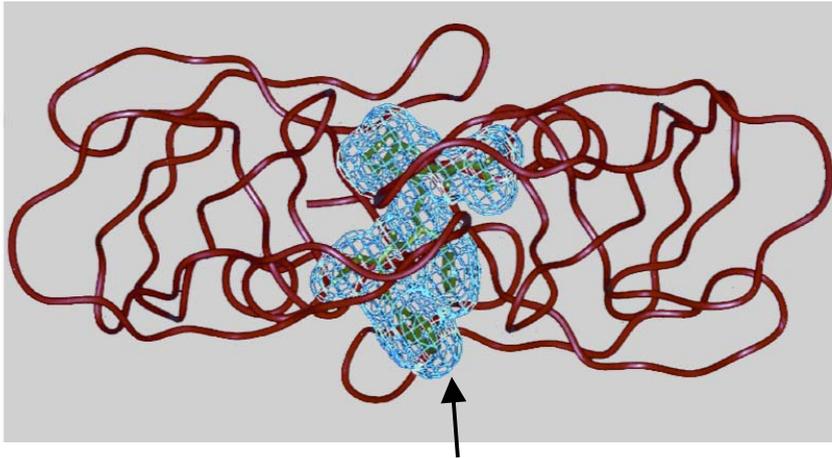
## A Natural substrate of the HIV-1 protease



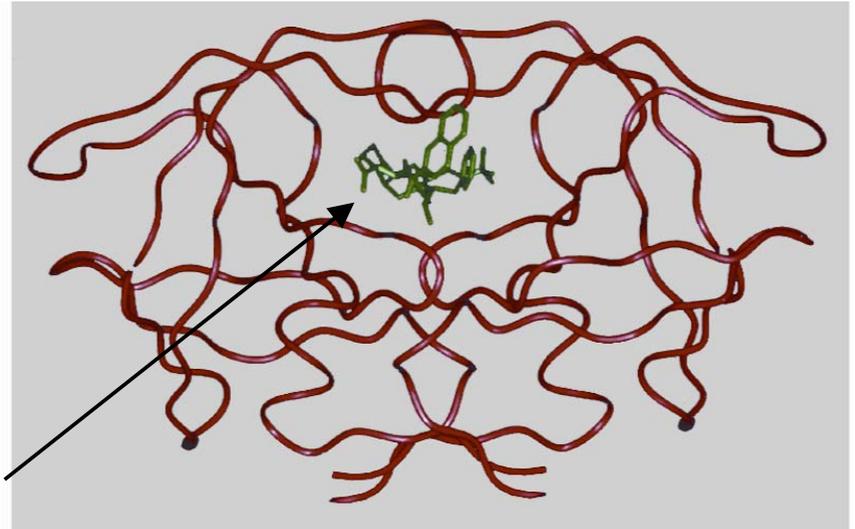
## B Protease inhibitor Ro 31-8959



## HIV-1 Protease-Inhibitoren verhindern die Virusreifung



**Aktives Zentrum mit gebundenem Inhibitor**

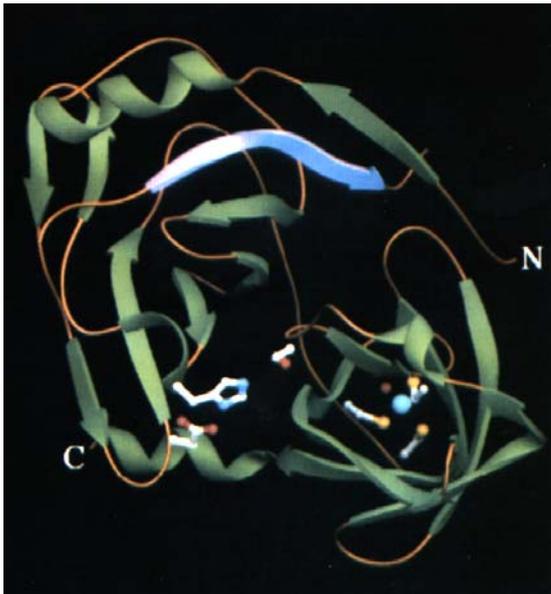
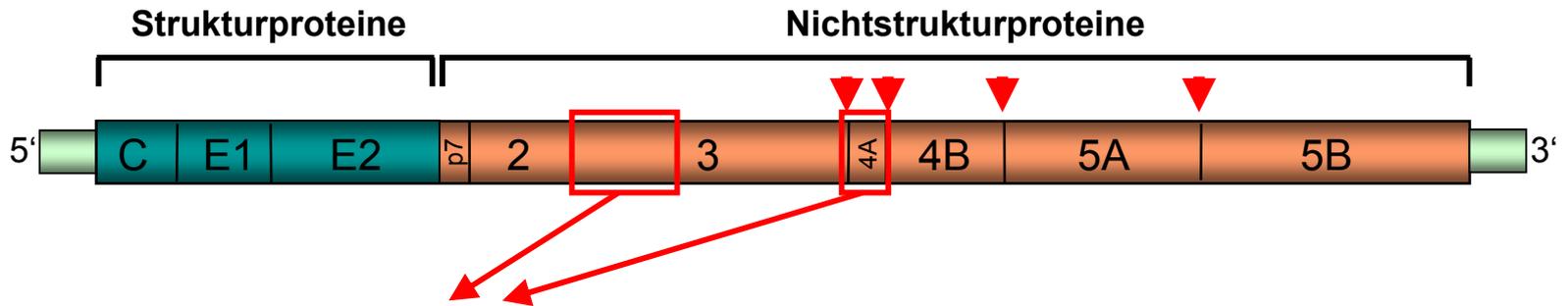


**Proteaseinhibitoren** binden an das aktive Zentrum und blockieren die Enzymaktivität

- ⇒ **Keine Prozessierung der Strukturproteine**
  - ⇒ **Keine Virusreifung**
  - ⇒ **Partikel sind nicht infektiös**

# Andere Protease-Inhibitoren in der Entwicklung: HCV

**Hepatitis C Virus** Therapie heute: Ribavirin + pegyliertes Interferon



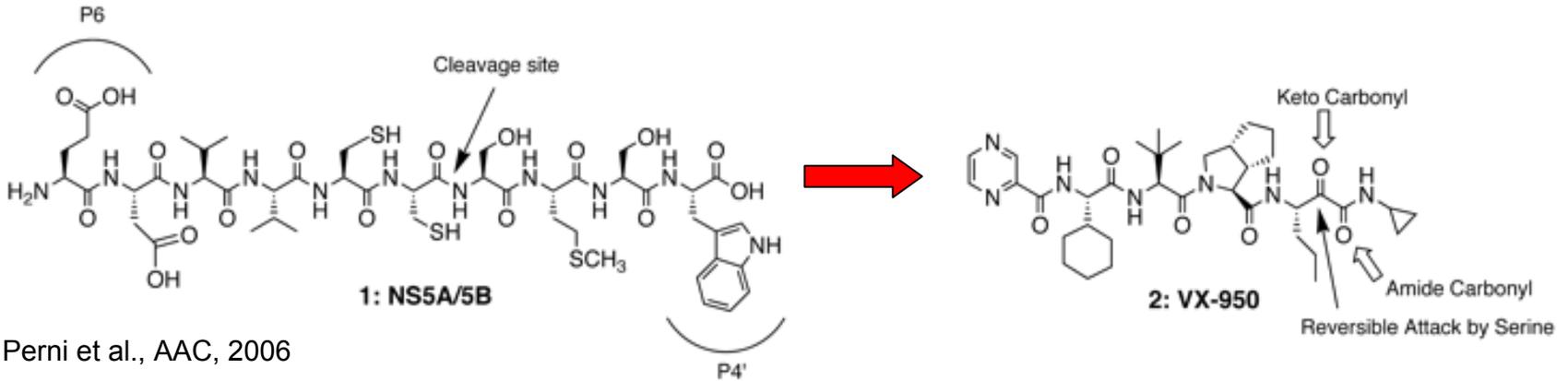
Spaltung des Polyproteins u.a. durch NS3/4A Protease

Serinprotease mit viralem Kofaktor

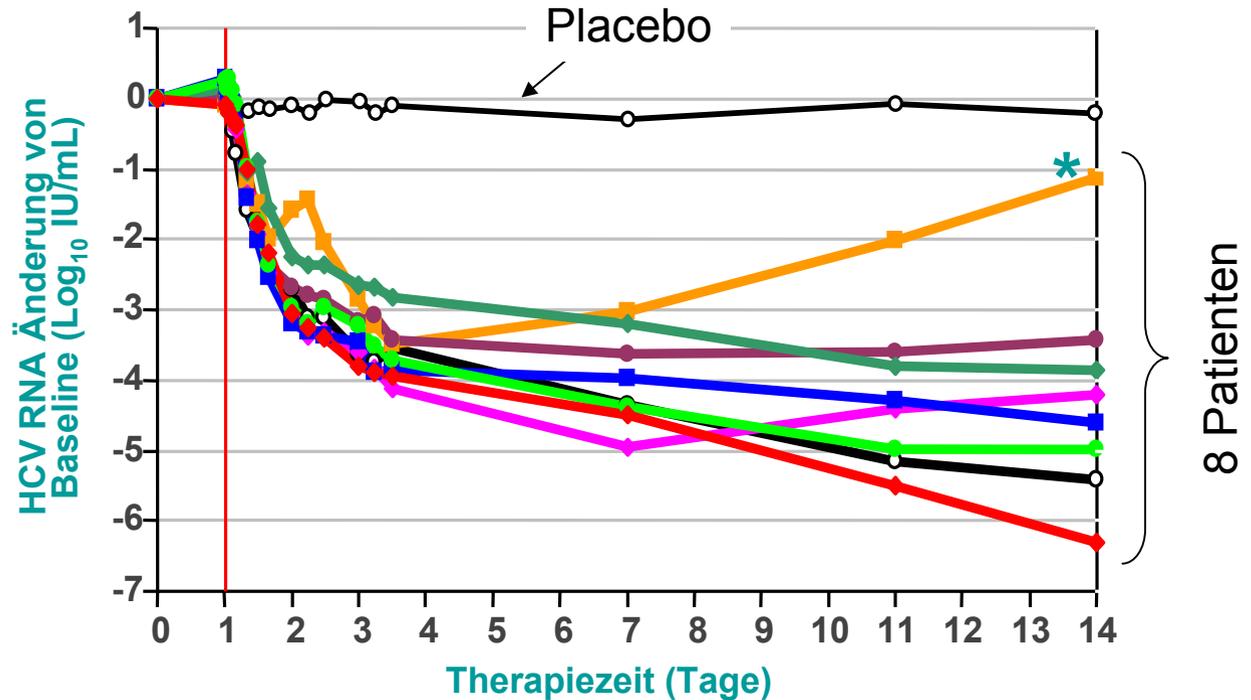
Essentiell für Virusvermehrung

Hemmbar durch Peptide (Endproduktthemmung)

# Hemmung der HCV-Protease durch ‚Peptidomimetic‘



Perni et al., AAC, 2006



Reesink et al., DDW 2005

# Antivirale Therapiestrategien

---

Polymerase-  
Inhibitoren

RT-Inhibitoren

HIV, HBV

Polymerase-Inhibitoren

Herpesviren

Ribavirin

RNA-Viren

HCV, RSV, Lassa, Hanta

Protease-  
Inhibitoren

HIV

*(HCV, SarsCoV, Picorna)*

**Inhibitoren des  
Viruseintritts**

Fusionsinhibitoren

HIV

*(WIN-compounds*

*Picornaviren)*

Amantadin, Rimantadin

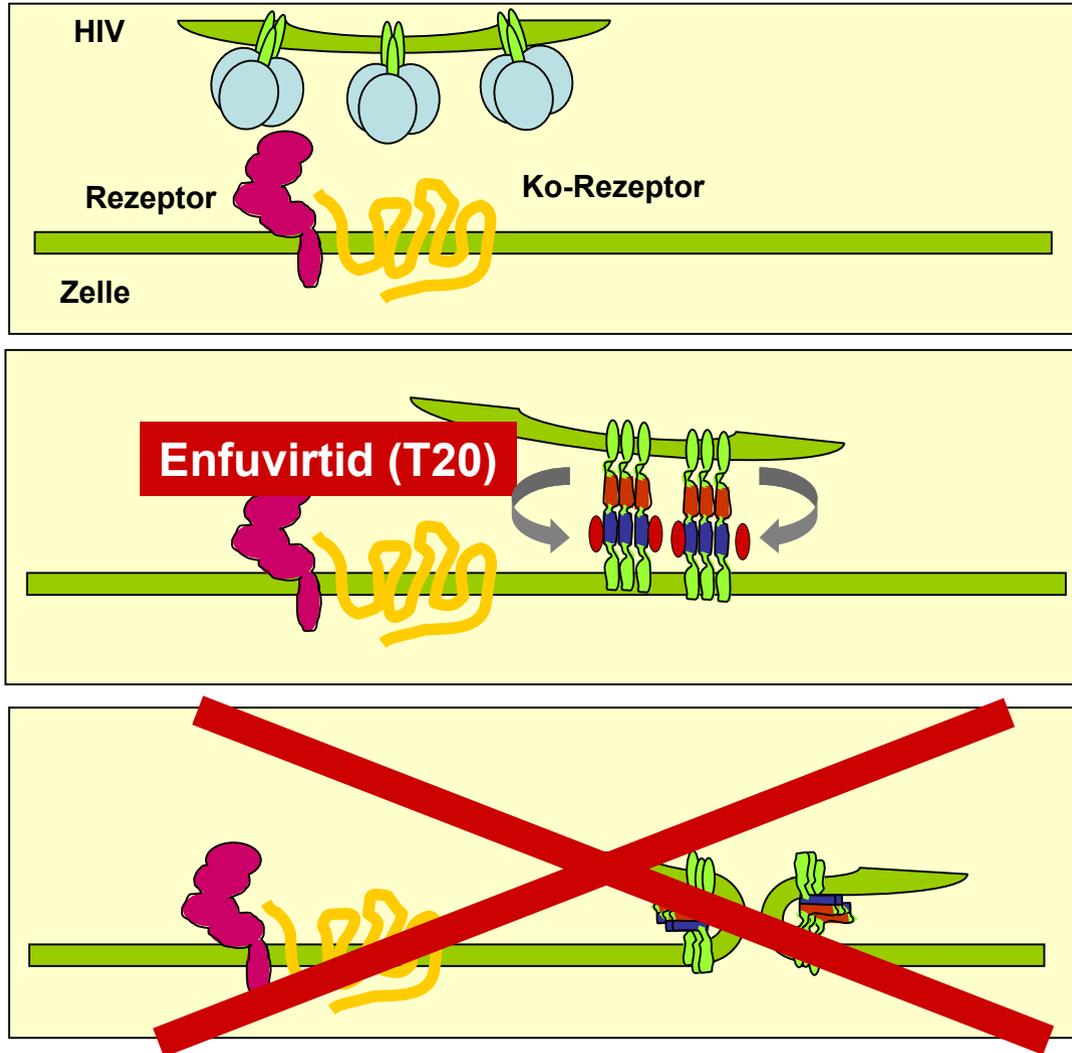
Influenza

Inhibitoren der  
Virusfreisetzung

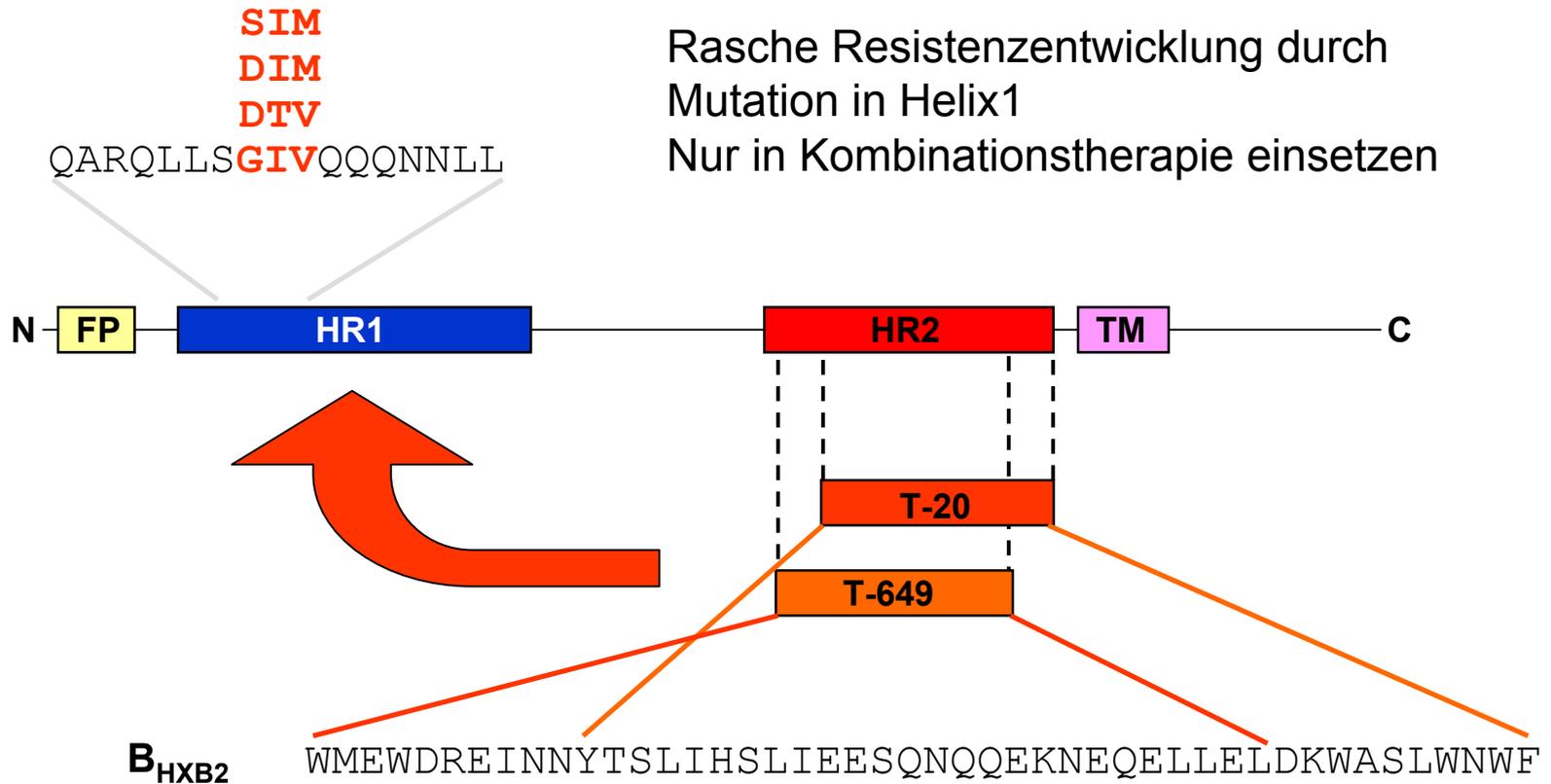
Zanamivir, Oseltamivir

Influenza

# Inhibierung des Viruseintritts: HIV Fusions-Inhibitor *Enfuvirtid* (T20, Fuzeon™)



# T20 (Enfuvirtide; Fuzeon)



Rasche Resistenzentwicklung durch  
Mutation in Helix1  
Nur in Kombinationstherapie einsetzen

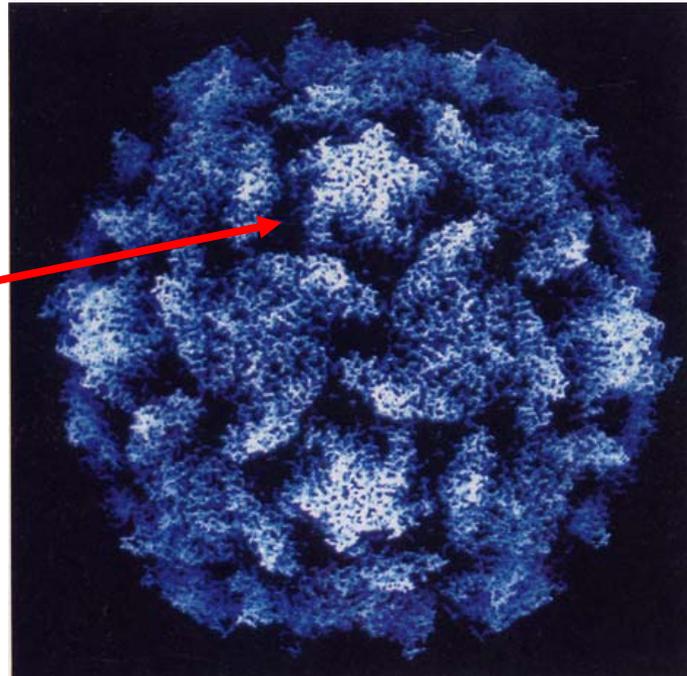
Peptid muss einmal täglich injiziert werden

Teuer (ca. 20.000 €/Jahr)

Entwicklung des verbesserten Inhibitors T-1249 wurde eingestellt

# Hemmung des uncoating bei Picornaviren

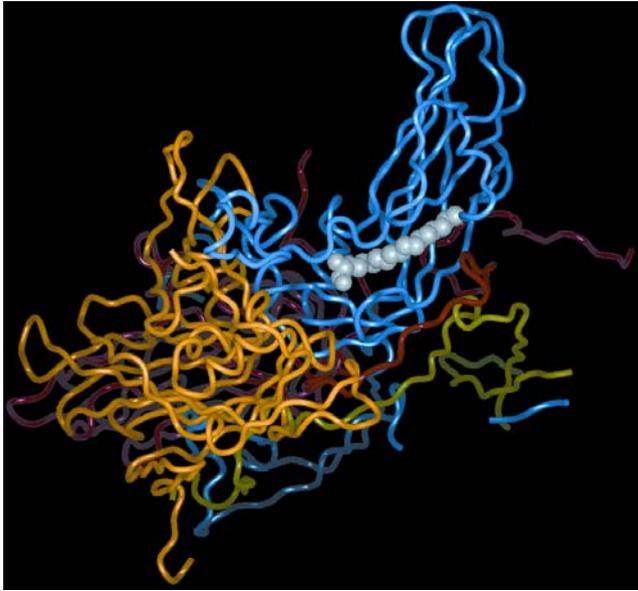
## WIN-compounds - Pleconaril



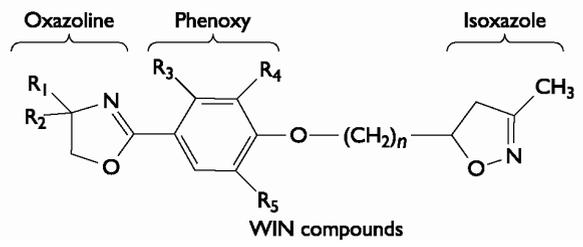
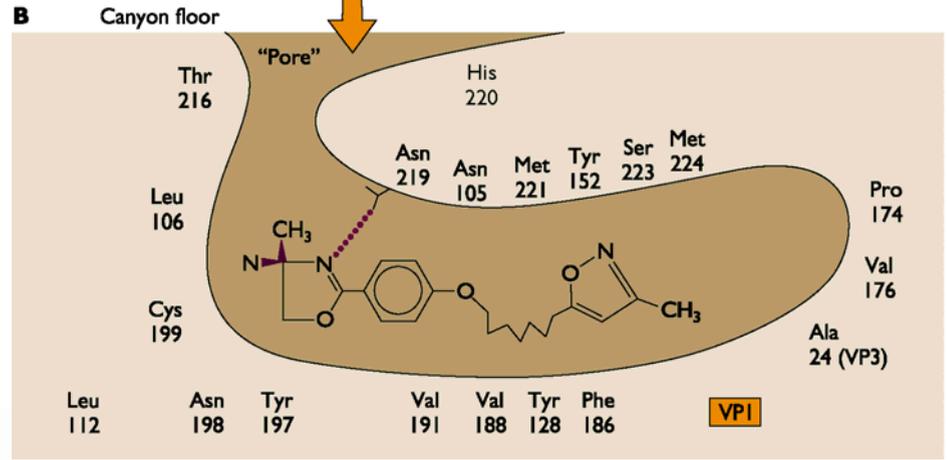
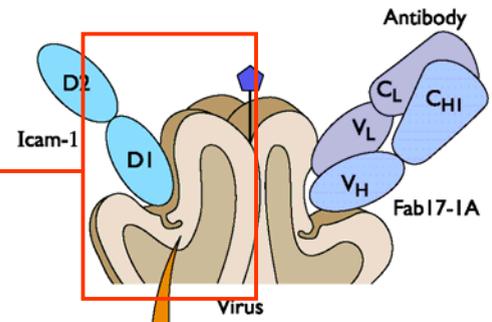
Canyon  
= Rezeptor-Bindestelle

Kristallstruktur eines Picornavirus

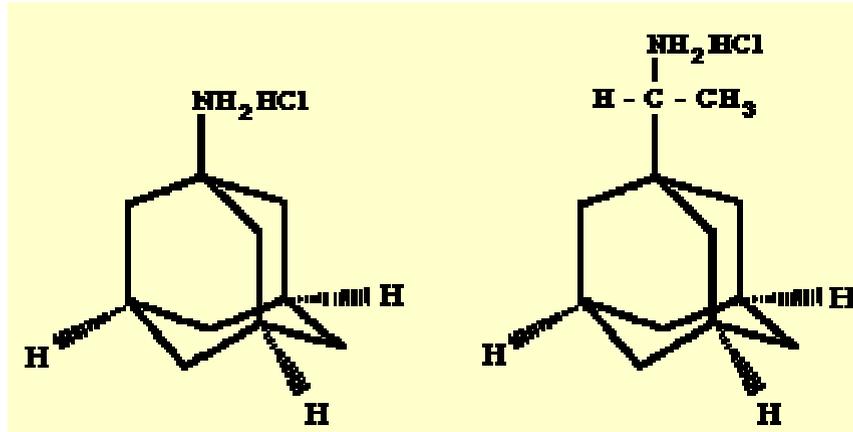
# WIN-compounds: Blockierung des Uncoating



VP1  
VP2  
VP3  
VP4

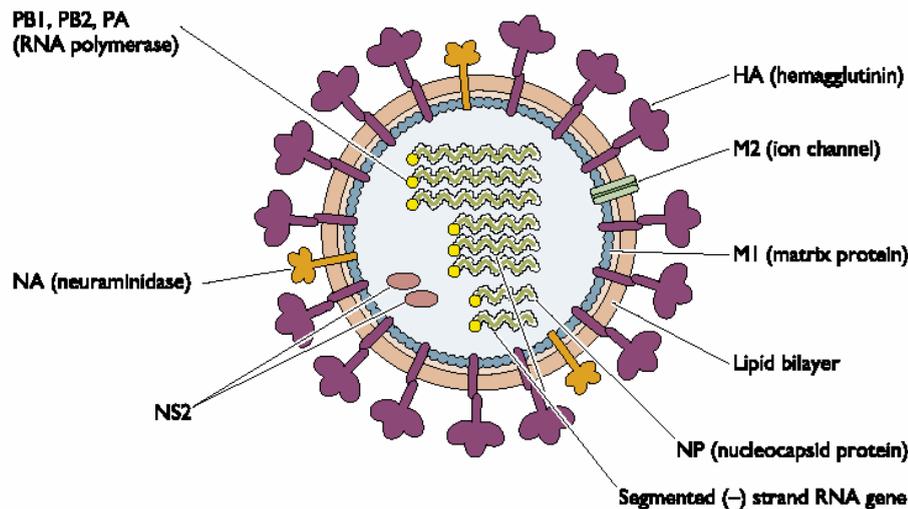


# Amantadin und Rimantadin: Hemmung des Influenza Virus uncoating



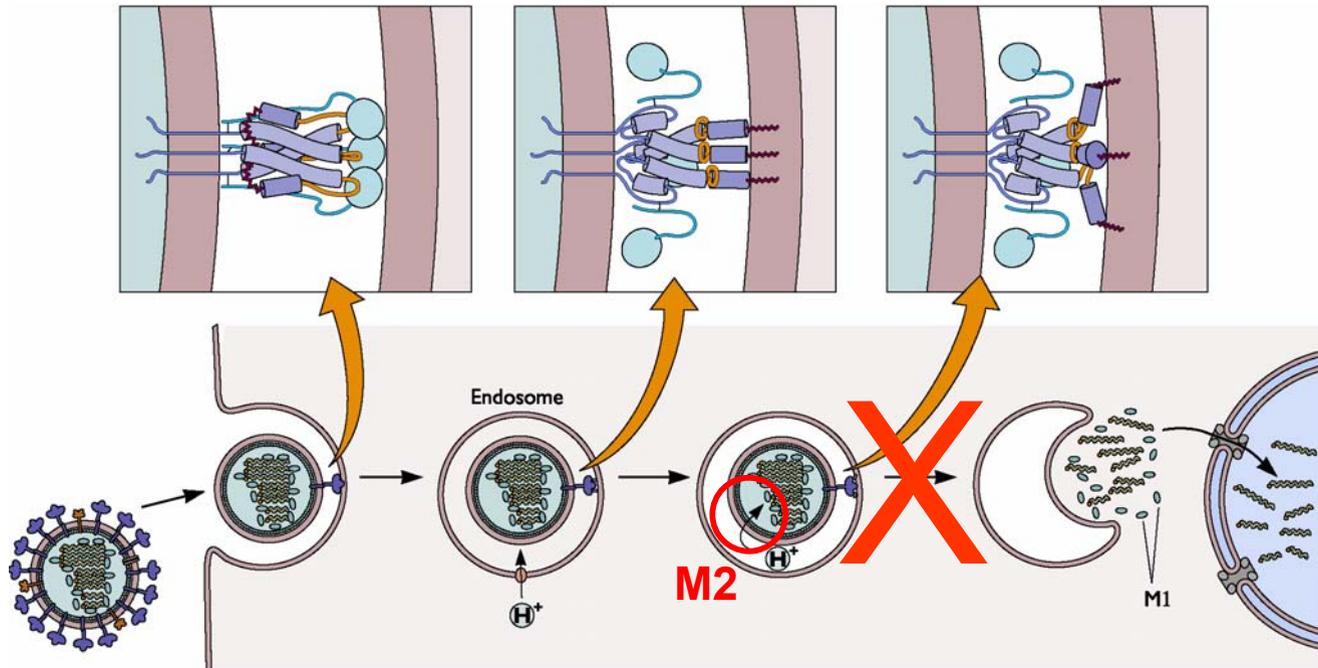
I-Adamantanamine  
hydrochlorid (Amantadine)

Rimantadin



Influenza A Virus  
Erreger der Virusgrippe

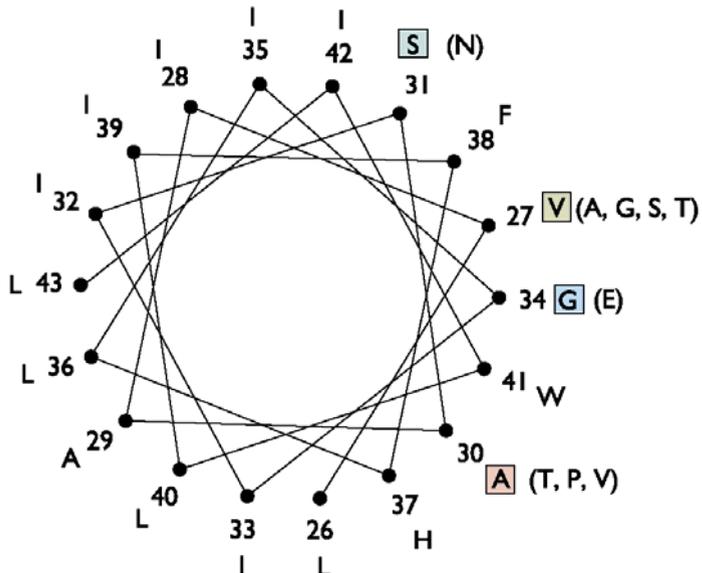
# Wirkungsweise von Amantadin und Rimantadin



Blockade des M2-Ionenkanals in der Membran von Influenza-A-Viren

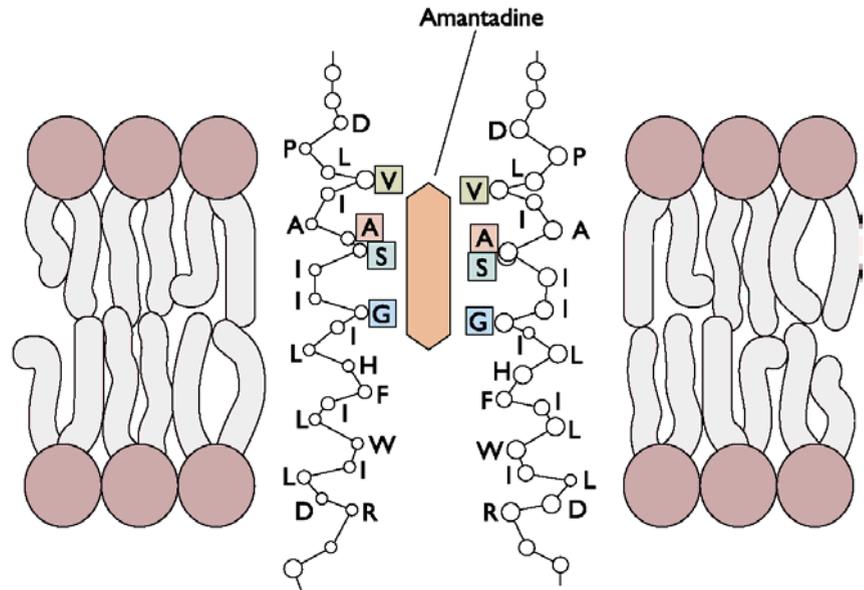
→ Hemmung der Freisetzung des Virusgenoms

# Interaktion von Amantadin und M2



M2 TMD

A/chicken/Germany/27(H7N7)



Modell Interaktion Amantadin:M2 Ionenkanal

# Antivirale Therapiestrategien

---

Polymerase-  
Inhibitoren

RT-Inhibitoren  
Polymerase-Inhibitoren

HIV, HBV  
Herpesviren

Protease-  
Inhibitoren

HIV  
(HCV, SARS-CoV)

Ribavirin

RNA-Viren  
HCV, RSV, Lassa, Hanta

Inhibitoren des  
Viruseintritts

(WIN-compounds  
Amantadin, Rimantadin

Picornaviren)  
Influenza

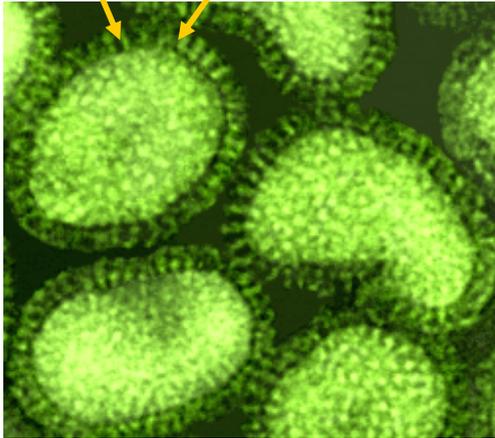
**Inhibitoren der  
Virusfreisetzung**

**Zanamivir, Oseltamivir**

**Influenza**

# Neuraminidase-Hemmer blockieren die Freisetzung von Influenzaviren

Oberflächenproteine  
Hämagglutinin  
Neuraminidase

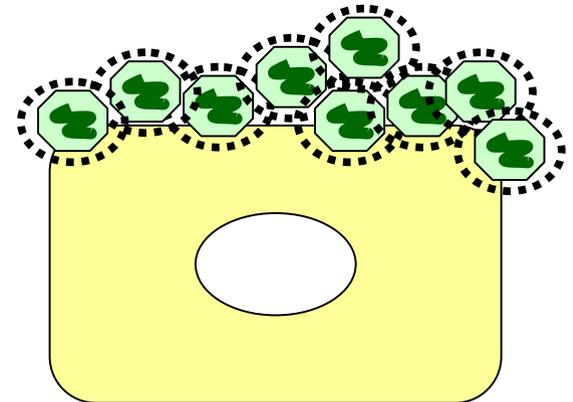
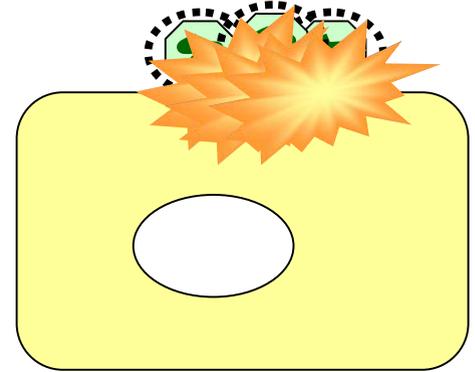


**Hämagglutinin** bindet an Sialinsäure auf der Wirtszelle  
**Neuraminidase** spaltet Sialinsäure

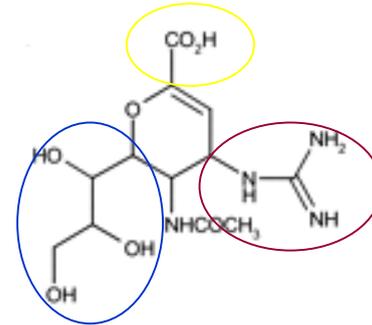
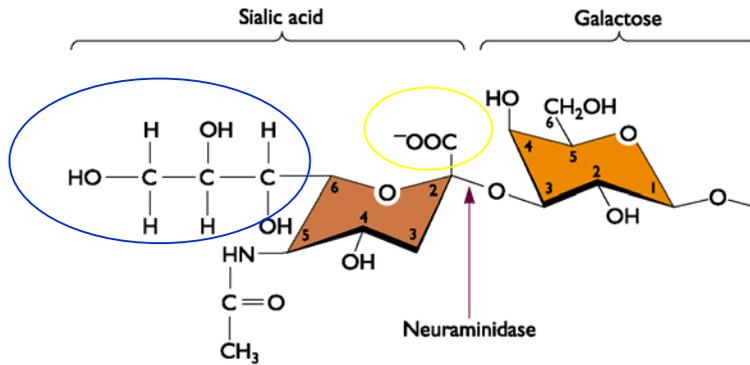
Neuraminidase  
löst Viren von der  
Wirtszelle

■  
*Oseltamivir*  
*Zanamivir*

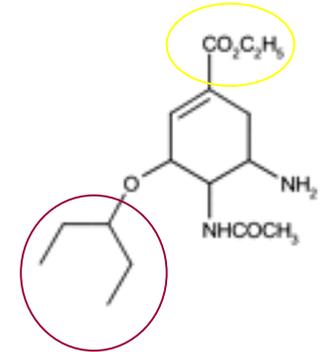
Viren verkleben mit  
der Zelle und  
miteinander



# Neuraminidase Inhibitoren

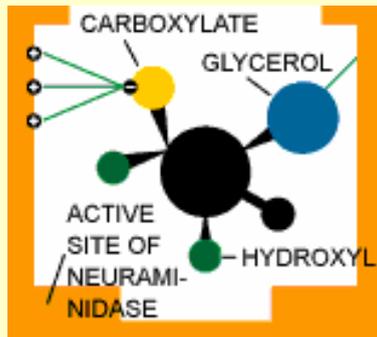


Zanamivir



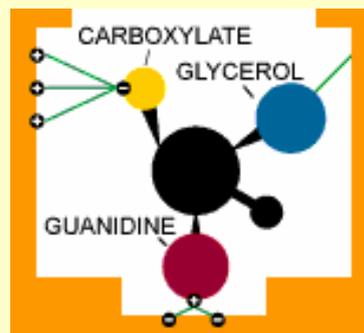
Oseltamivir

natürliches Substrat  
Sialinsäure



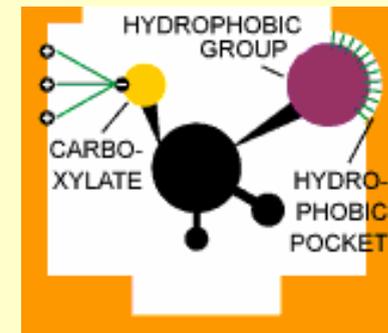
Aktives Zentrum  
der Neuraminidase

Inhibitor  
Zanamivir



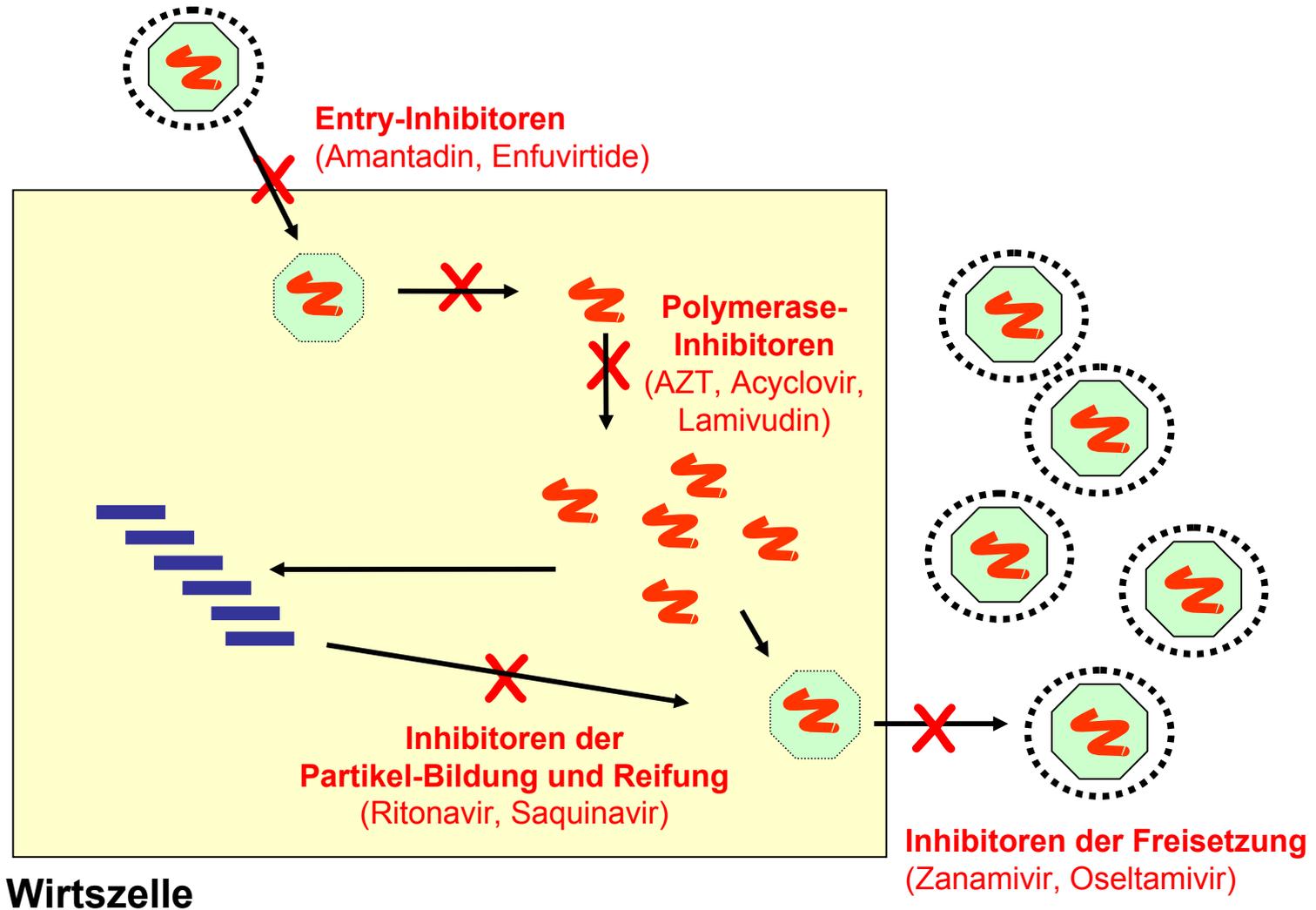
muss inhaliert werden

Inhibitor  
Oseltamivir



oral verfügbar

# Angriffspunkte antiviraler Medikamente



# Neue Strategien der antiviralen Therapie

**Table 19.7** Some mechanisms targeted in antiviral drug discovery<sup>a</sup>

Replication target	Selected compounds	Virus
<b>Attachment</b>	Peptide analogs of attachment protein	HIV
<b>Penetration and uncoating</b>	Dextran sulfate, heparin Amantadine, rimantadine Tromantadine Arildone, disoxaril, pleconaril	HIV, herpes simplex virus Influenza A virus Herpes simplex virus Picornaviruses
<b>mRNA synthesis</b>	Interferon Antisense oligonucleotides	Hepatitis A, B, and C viruses; papillomavirus Papillomavirus, human cytomegalovirus
<b>Protein synthesis</b>		
Initiation	Interferon	Hepatitis A, B, and C viruses; papillomavirus
IRES elements	Ribozymes; antisense oligonucleotides	Flavi- and picornaviruses
<b>DNA replication</b>		
Polymerase	Nucleoside and nonnucleoside analogs Phosphonoformate	Herpesviruses, HIV, hepatitis B virus Herpesviruses
Helicase/primase	Thiozole ureas	Herpes simplex virus
Processing/packaging	Benzimidazoles	Herpesviruses
<b>Nucleoside biosynthesis</b>		
Inosine monophosphate dehydrogenase	Ribavirin Levovirin, viramidine	Respiratory syncytial virus, Lassa fever virus Hepatitis C virus
<b>Nucleoside scavenging</b>		
Thymidine kinase	Nucleoside analog	Herpes simplex virus, varicella-zoster virus
Ribonucleotide reductase	Inhibitors of protein-protein interaction of large and small subunits	Herpes simplex virus
<b>Glycoprotein processing</b>		
Assembly	No lead compounds	Enveloped viruses
Protease	Peptidomimetics	HIV
<b>Virion integrity</b>		
Lipid raft disruption	Nonoxynol-9 $\beta$ -Cyclodextrins	HIV, herpes simplex virus HIV, herpes simplex virus

<sup>a</sup>Data from E. De Clercq, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1:13–25, 2002, and S.-L. Tan, A. Pause, Y. Shi, and N. Sonenberg, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1:867–881, 2002.

# Problem Antivirale Resistenz

---

## Jede wirksame antivirale Therapie bewirkt Resistenzentwicklung

zB Nevirapin: **Einmalige** Gabe während der Wehen zur Prävention der Mutter-Kind-Übertragung von HIV

In 20% der Fälle treten resistente Varianten auf

### Warum?

Hohe Replikationsrate (HIV: ca. 10 Milliarden Virusnachkommen/Tag)

Ungenauere viruseigene Replikationsenzyme

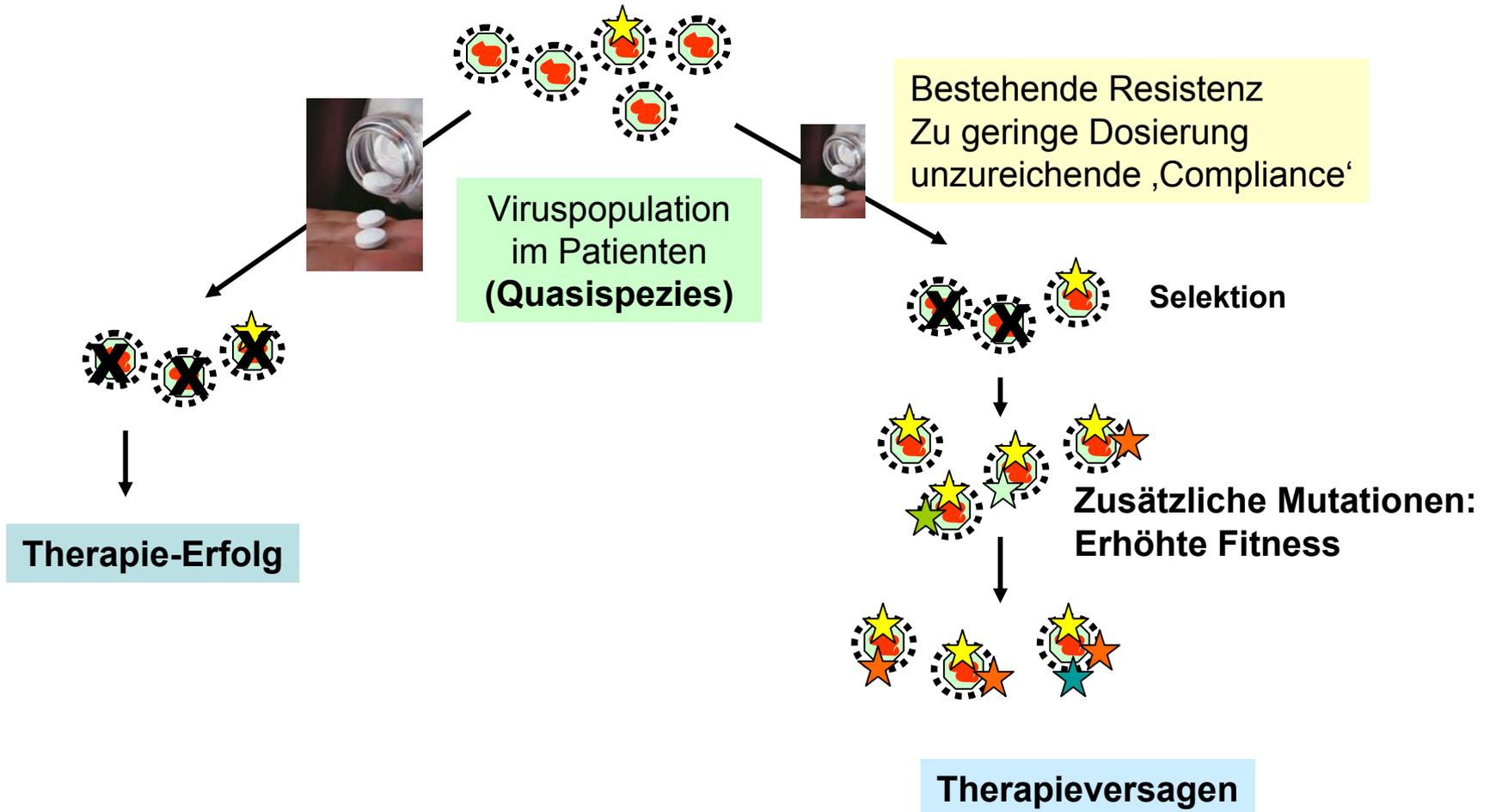
➤ **Virusreplikation ist ‚Evolution im Zeitraffer‘**

Schnelle Anpassung an selektive ‚Umweltbedingungen‘

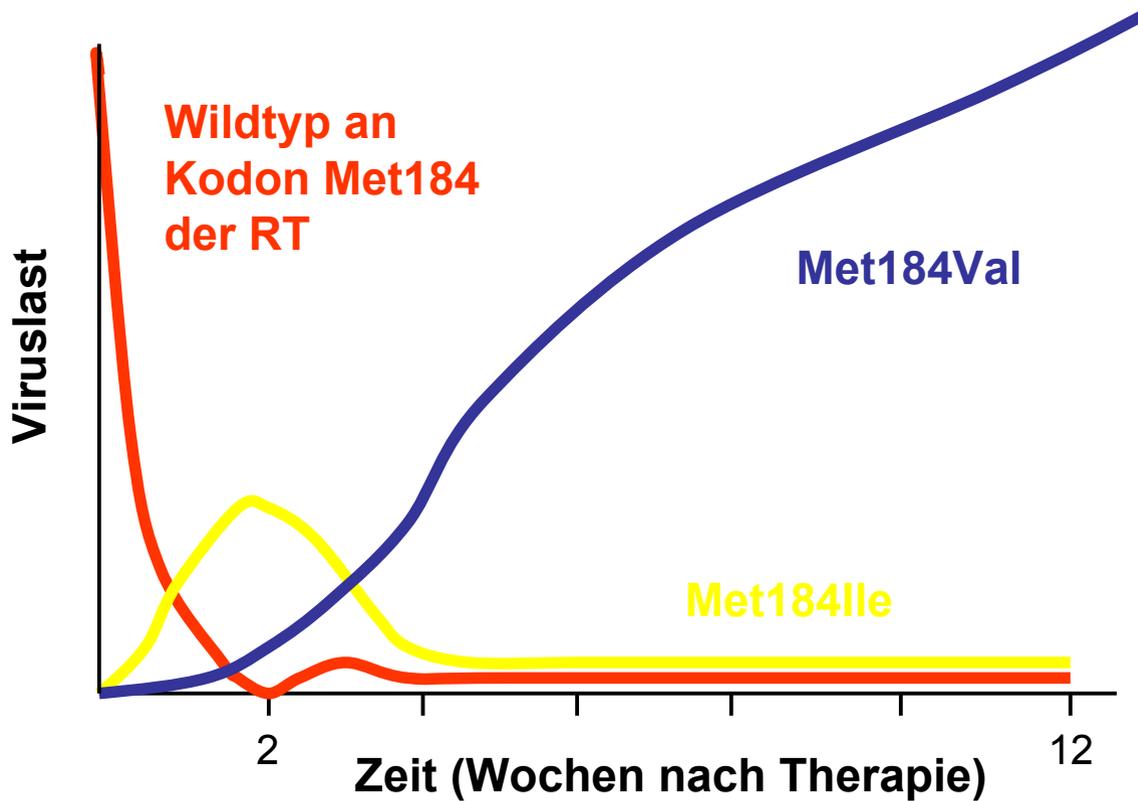
# Antivirale Resistenzentwicklung

## Klinische Resistenz

Anstieg der Viruslast unter Therapie, klinische Verschlechterung

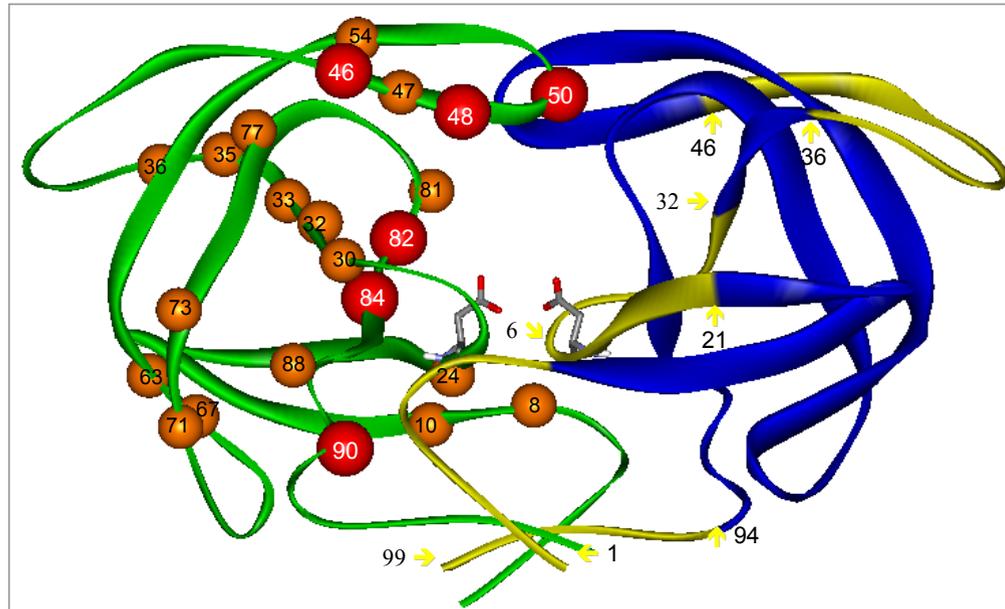


## HIV Resistenz-Entwicklung gegen 3TC (Epivir)



# Primäre und sekundäre PI Resistenzmutationen

HIV-Protease



**Primäre Resistenzmutationen:** in der Substrat-Bindetasche; verringern die Affinität zum Inhibitor

**Sekundäre Resistenzmutationen:** ausserhalb der Substratbindestelle; kompensieren Verluste in katalytischer Aktivität

**Tertiäre Resistenzmutationen:** Veränderung der PR-Schnittstellen; Anpassung des Substrates

# Antivirale Resistenz

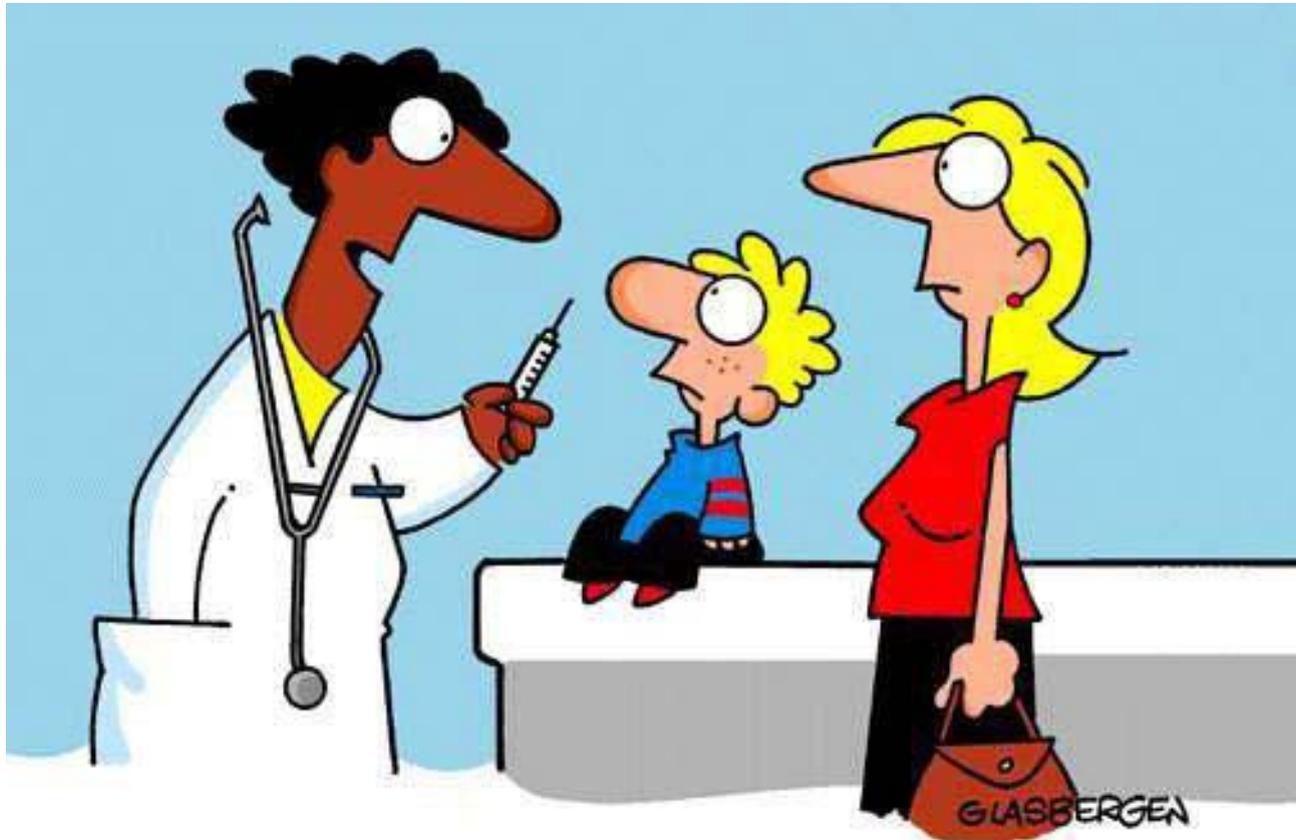
---

- Resistenzentwicklung korreliert mit viraler **Replikation**
- verläuft in der Regel in mehreren Schritten
- Resistenzvarianten **gegen jeden Inhibitor** möglich
- **Kreuzresistenz und multiple Resistenz** ist möglich
- Resistenzvarianten sind **übertragbar**  
**10%** aller HIV-Neuinfektionen in Europa werden von resistenten Virusvarianten verursacht (SPREAD, 2003)

**Resistenzbeobachtung ist essentieller Bestandteil einer längerfristigen antiviralen Therapie**

# Kontrolle und Prävention von Virusinfektionen

---



**“Don’t think of it as getting a flu shot.  
Think of it as installing virus protection software.”**

# Kontrolle und Prävention von Virusinfektionen

---

- 1798 Kuhpocken zur Immunisierung gegen **Pocken** (Edward Jenner)
- 1885 **Inaktivierter** Impfstoff gegen **Tollwut** (Louis Pasteur)
- 1937 **Attenuierter** Impfstoff gegen **Gelbfieber**
- 1953/56 Inaktivierte **Polio**-Vakzine (IPV; Jonas Salk)  
Attenuierte **Polioviren** als Lebend-Vakzine (OPV; Albert Sabin)
- 1963-69 Attenuierte Impfviren gegen **Masern, Mumps, Röteln**
- 1977 Weltweite **Eliminierung** der **Pocken**
- 1984 **Rekombinante Hepatitis B** Vakzine aus Hefe
- 2010 Angestrebte weltweite Ausrottung der **Poliomyelitis**

# Impfstoffe zur aktiven Immunisierung

---

## Lebendvakzine Replikationskompetent

Attenuierte Viren

### Rekombinante Vektoren:

- **chimäre Viren** (z.B. Vaccinia-Virus als Expressionsvektor für andere Proteine)
- **Rekombinante Bakterien**

## Totvakzine Nicht replikationskompetent

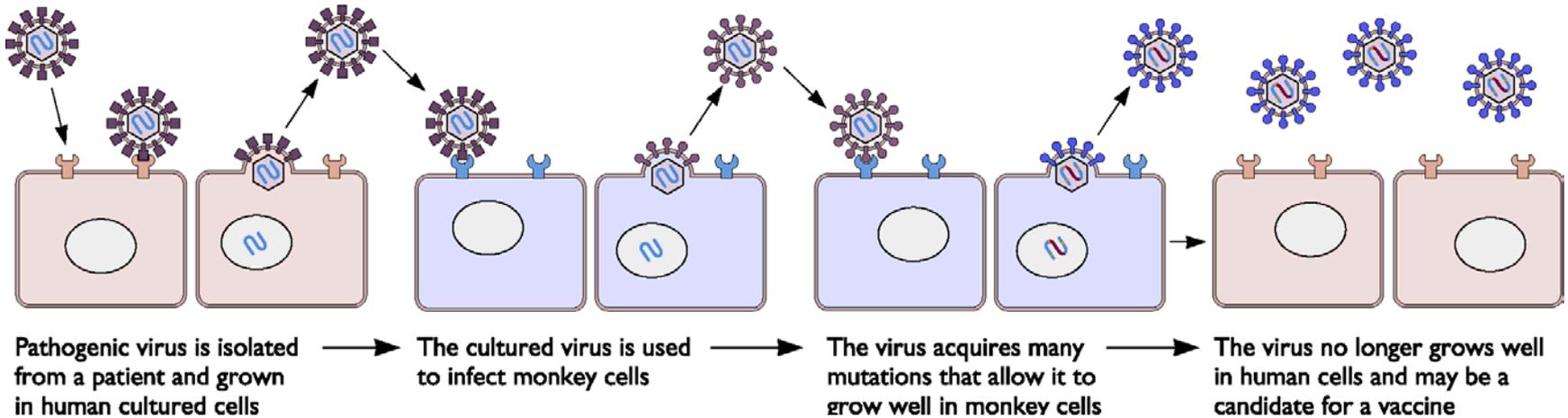
Rekombinante  
Proteine;  
synthetische  
Peptide

DNA-Vakzine

Inaktivierte Viren

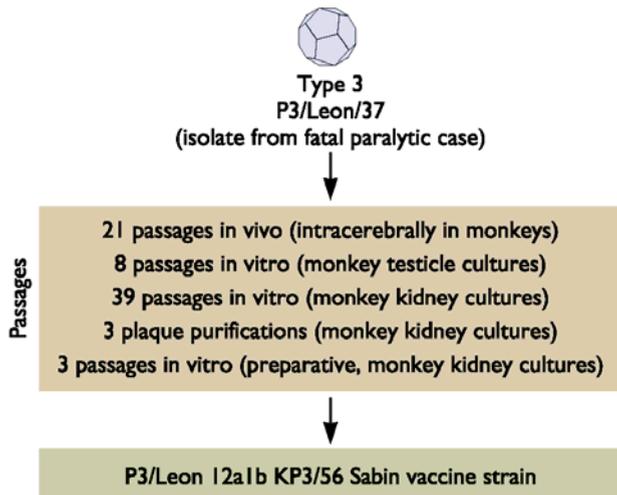
# Attenuierung von Viren

mehrfache Passage in nicht-homologen Zellen



# Attenuierte Poliovirus Vakzine

## A Derivation of Sabin type 3 attenuated poliovirus

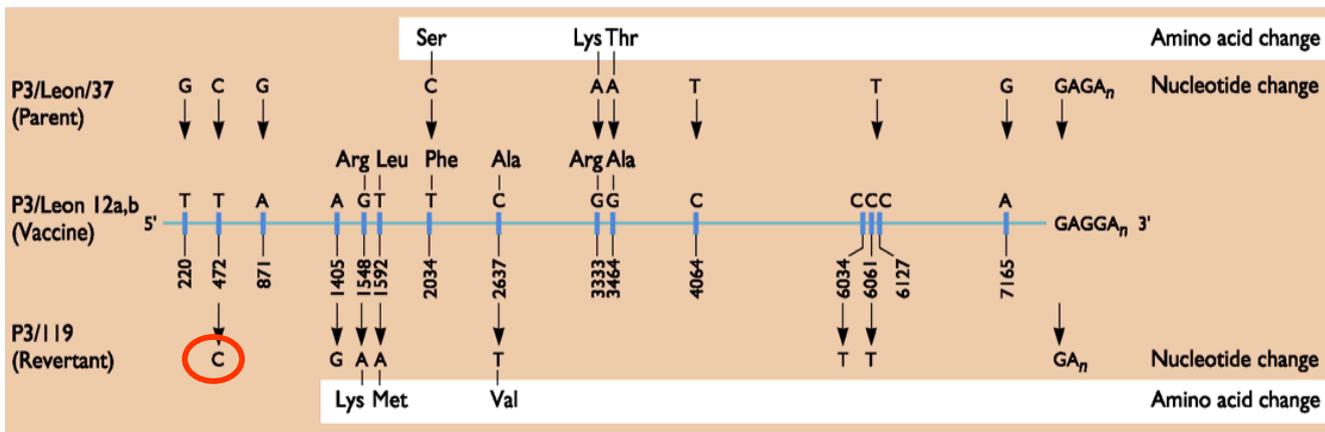


Orale Gabe (Schluckimpfung)

Bessere Immunantwort als gegen Polio-Totvakzine

Verbunden mit höherem Impfrisiko

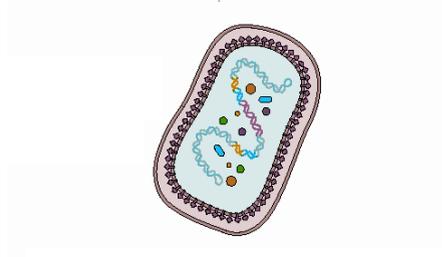
## Reversion zum Poliovirus Wildtyp



## Neue Technologien zur Vakzinierung

---

Genetische Immunisierung mit rekombinanten Virusvektoren



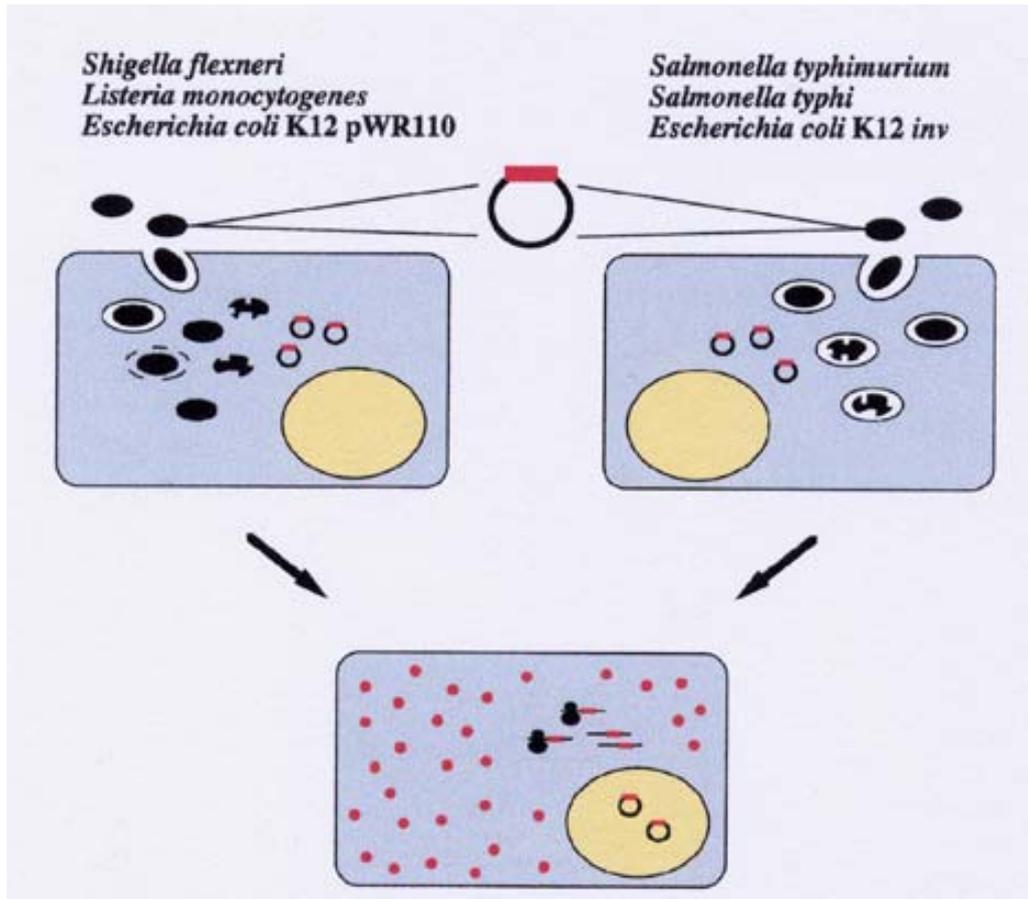
Rekombinantes Vaccinia Virus  
(MVA) mit Fremd-Gen



Infektion der Wirtszelle  
Expression des Fremdgens  
Induktion von **zellulärer und humoraler** Immunantwort

# Neue Technologien der Vakzinierung

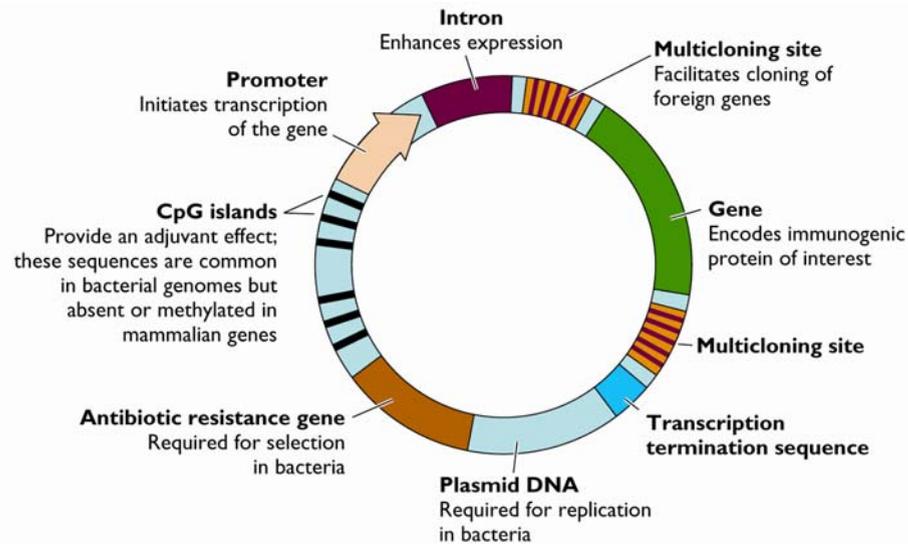
Genetische Immunisierung mit rekombinanten, attenuierten Bakterien



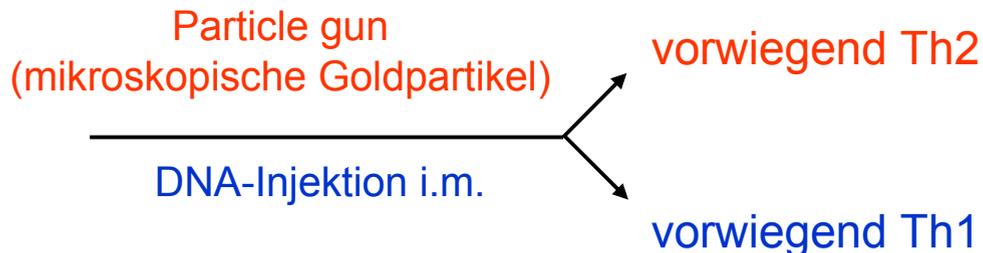
Makrophage  
Dendritische Zelle

# Neue Technologien der Vakzinierung

## Genetische Immunisierung mit freier DNA



Adapted from M. Oyaski and H. Ertl, *Sci. Med.* 7:30–39, 2000, with permission.



# Übersicht antivirale Impfstoffe

---

## Lebendimpfstoffe

### **Masern-Mumps-Röteln**

orale Polio-Vakzine (Sabin)

Varizella-Virus (Windpocken)

Pocken (Vaccinia)

Gelbfieber

## Totimpfstoffe

### Inaktivierte Viren

#### **Polio-Vakzine (Salk)**

Hepatitis A Virus

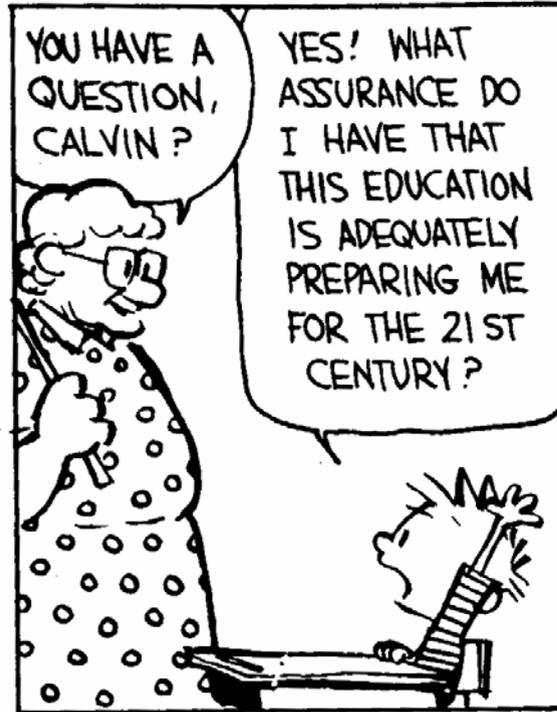
Tollwutvirus

FSME

Influenza (jährlich neue Formulierung)

### Subunit Vakzine

**Hepatitis B Virus** (erster gentechnisch hergestellter Impfstoff)



# Schöne Sommerferien

