

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Draginja B. Radošević

***In silico* odabir lekova iz baze DrugBank kao
potencijalnih inhibitora M2 proteina virusa gripa i
provera njihove aktivnosti *in vitro***

doktorska disertacija

Beograd, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Draginja B. Radošević

***In silico* selection of drugs from the DrugBank
database as potential inhibitors of M2 proteins of
Influenza virus and verification of their activity *in
vitro***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

Mentori:

Dr Sanja Glišić

naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu

Dr Goran Brajušković

redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Komisija:

Dr Goran Brajušković

redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Sanja Glišić

naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu

Dr Milan Senčanski

viši naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

Zahvalnica

Ovaj rad je osmišljen i urađen u Laboratoriji za bioinformatiku i računarsku hemiju Instituta za nuklearne nauke Vinča, Instituta od Nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja ON173001 (sada istraživačke teme 1802002): „Primena EIIP/ISM bioinformatičke platforme u otkrivanju novih terapijskih targeta i potencijalnih terapijskih molekula“.

Mojoj mentorki, dr Sanji Glišić želim da izrazim neizmernu zahvalnost na pažnji i vremenu koje je posvetila svim etapama izrade ovog rada, na bezgraničnom strpljenju i na osloncu koji sam u njoj uvek imala.

Dr Veljku Veljkoviću, veliko hvala što me je sve ove godine podržavao i mnogo doprineo ovoj disertaciji.

Hvala dr Milanu Senčanskom na upoznavanju sa novom metodologijom i pomoći oko tumačenja rezultata.

Zahvaljujem dr Goranu Brajuškoviću, redovnom profesoru Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na saradnji.

Dr Vladimiru Peroviću, hvala na pomoći prilikom izrade ove doktorske disertacije.

Hvala mojoj najvećoj podršci - mojoj mami i mojoj najvećoj motivaciji - Jovanu i Mirjani!

In silico* odabir lekova iz baze DrugBank kao potencijalnih inhibitora M2 proteina virusa gripa i provera njihove aktivnosti *in vitro

Rezime

Virus influence tipa A zbog svog značajnog epidemijskog i pandemijskog potencijala predstavlja trajnu globalnu pretnju za zdravlje ljudi. Pored vakcinacije koja predstavlja prvu liniju odbrane protiv gripa, antivirusni lekovi imaju važnu ulogu u prevenciji i terapiji tokom epidemija i pandemija. Zbog nedovoljne efikasnosti vakcina protiv sezonskog gripa, kao i neodgovarajuće antivirusne terapije, koji su uslovljeni pojavom rezistencije na postojeće lekove i pojavom novih sojeva virusa, hitno su potrebni novi efikasni lekovi protiv gripa. Protein M2 virusa influence A (M2) je jonski kanal koji je neophodan za virusnu infekciju, i zbog toga je važna terapeutska meta gripa. Adamantani, inhibitori M2 jonskog kanala influence su bili prvi lekovi koje je FDA odobrio protiv gripa, mada je njihova upotreba obustavljena zbog rezistencije virusa na ovu klasu lekova.

Osnovni cilj ove teze je identifikacija i predlaganje jednostavnog teorijskog kriterijuma za virtuelno pretraživanje molekulske biblioteke za potencijalne dualne inhibitore M2 jonskog kanala kod virusa influence tipa A, divljih vrsta (WT) i virusa rezistentnih na amantadin. Rezultati ove studije zasnivaju se na primeni bioinformatičkog EIIP/AQVN kriterijuma za virtuelno pretraživanje molekulske biblioteke zasnovanog na analizi dugodosežnih međumolekulske interakcije.

Podaci o poznatim M2 inhibitorima su prikupljeni i analizirani kako za inhibitore M2 proteina influence tipa A, divljeg tipa, tako i za inhibitore M2 mutanta S31N. Na osnovu ove analize određen je bioinformatički kriterijum zasnovan na EIIP/AQVN parametrima za virtuelno pretraživanje molekulske biblioteke u cilju identifikacije kandidata za dvostruke inhibitore M2 jonskog kanala WT influence A virusa i virusa sa mutacijom S31N u proteinu M2. Na osnovu primene ovog kriterijuma za virtuelni skrining odabrano je 39 lekova od 2627 lekova iz baze DrugBank.

Posle primene hemoinformatičkog kriterijuma za virtuelni skrining (VS) koji se zasniva na međusobnoj strukturnoj sličnosti (ligand zasnovani VS) poznatih inhibitora M2 proteina sa kandidatima za lekove - dvostruke inhibitore M2 jonskog kanala WT influence A virusa i virusa sa mutacijom S31N u proteinu M2 od 39 lekova je predoženo pet najboljih kandidata, a kao najbolji među njima je gvanetidina. Molekuskim dokingom pet kandidata na divlji tip M2 i mutirani M1 S31N kao kandidat sa najmanjom energijom vezivanja i jednakim afinitetom za oba kanala je identifikovan lek cikrimin.

Rezultati eksperimenta *in vitro* su potvrdili predloženu aktivnost cikrimina protiv dva različita podtipa virusa influence A pandemijskog H1N1 2009 i H3N2, a takođe je utvrđena *in vitro* aktivnost gvanetidina protiv pandemijskog virusa influence H1N1 2009.

Predloženi bioinformatički kriterijum predstavlja osnov za selekciju dvostrukih inhibitora M2 jonskih kanala WT influence A virusa i virusa sa mutacijom S31N u proteinu M2 iz bilo koje molekulske biblioteke malih molekula.

Ključne reči: virus influence tipa A, M2 protein, virtuelni skrining, EIIP/AQVN, prenamena lekova

Naučna oblast: Molekularna biologija

Uža naučna oblast: Bioinformatika

In silico* selection of drugs from the DrugBank database as potential inhibitors of M2 proteins of Influenza virus and verification of their activity *in vitro

Abstract

The influenza virus is permanent global health threat with epidemic and pandemic potential. In addition to vaccination, which is the first line of defense against influenza, antivirals play an essential role in prevention and therapy during epidemics and pandemics. Due to the suboptimal effectiveness of vaccination and limitations of current antiviral therapies because of drug resistance and the emergence of new circulating viral strains, novel effective anti-influenza drugs are urgently needed. Influenza A virus (IAV) matrix protein 2 (M2), an ion channel, is crucial for virus infection, and therefore, an important anti-influenza drug target. Adamantanes, also known as M2 channel blockers, were the first approved Food and Drug Administration class- anti-influenza drugs, although their use was discontinued due to prevalent drug resistance.

This study identified and proposed a simple bioinformatics criterion for virtual screening of molecular libraries for potential dual inhibitors of influenza A M2 ion channel for both wild type (WT) and amantadine resistant viruses.

Results of this study are founded on a simple theoretical criterion for virtual screening of molecular libraries based on the long-range interactions characterized by the molecular descriptors — the average quasi valence number (AQVN) and the electron-ion interaction potential (EIIP). The data on known M2 inhibitors were collected and analyzed for influenza A M2 protein inhibitors both for WT influenza A viruses and their amantadine-resistant mutants. Based on the results of this analysis, the EIIP/AQVN criterion for the selection of drugs candidates from the databases that could represent dual inhibitors of both influenza virus M2 WT protein and M2 S31N mutant was established.

By applying the EIIP/AQVN-based virtual screening criterion, 39 drugs were selected out of 2,627 approved drugs from the DrugBank as potential dual influenza M2 ion channel inhibitors.

Further, the data collected on known M2 protein inhibitors were used to establish a chemoinformatic criterion for M2 protein (VS) based on the mutual structural similarity of molecules (ligand-based VS) and structural compatibility of inter-reactive molecules and corresponding binding energies (molecular docking).

After *in silico* screening of drug space using the EIIP/AQVN filter and further filtering of drugs by ligand-based virtual screening, the best five candidates from DrugBank were proposed. Further, molecular docking of five selected candidates to both the wild-type M2 channel and S31N mutant channel, was performed. The candidate with the lowest binding energy and equal affinity to both the WT channel and S31N mutant channel was the anticholinergic drug cycrimine. The experimental results showed the anti-influenza activity of cycrimine against two different influenzas A subtypes 2009 H1N1 pandemic influenza and H3N2. As the best-ranked drug selected from ligand-based virtual screening, guanethidine showed measurable anti-influenza activity against the 2009 H1N1 pandemic influenza virus in cell culture.

Our work has shown that the proposed *in silico* criterion represents an useful tool for selection of candidate M2 inhibitors of influenza viruses type A by screening of the approved drugs and other molecular libraries.

Key words: Influenza A virus, M2 protein, virtual screening, EIP/AQVN, drug repurposing

Scientific field: Molecular biology

Scientific discipline: Bioinformatics

Lista skraćenica

AQVN - Srednji kvazivalentni broj (eng. average quasivalence number)

ADMET - Apsorpcija, Distribucija, Metabolizam, Izlučivanje i Toksičnost leka

BCS - Osnovni EIIP/AQVN hemijski prostor (eng. basic chemical space)

CPE - Citopatogeni efekat

cRNK - Komplementarna ribonukleinska kiselina

DNK - Dezoksiribonukleinska kiselina

DMSO - Dimetilsulfoksid

EBI - Evropski bioinformatički institut (eng. European Bioinformatics Institute)

EIIP – Potencijal electron-jon interakcija (engl. Electron-Ion Interaction Potential)

EMBL - Evropska biblioteka nukleotidnih sekvenci (eng. European Molecular Biology Laboratory)

FDA - Uprave za hranu i lekove (eng. Food and Drug Administration)

HA - Hemaglutinin

IMPDH - Inosine monofosfat dehidrogenaza

ICTV - Internacionalni komitet za taksonomiju virusa

LR - Lipidni splavovi (eng. lipid rafts)

MDCK - Čelijska linija epitela psećih bubrežnih tubula (eng. Madin-Darby canine kidney)

M1 - Matriks protein

mRNK - Informaciona ribonukleinska kiselina

NA - Neuraminidaza

NAI - Inhibitori neuraminidaze

NEP - Nuklearni eksport protein

NP - Nukleoprotein

NS1 - Nestrukturni protein 1

PA - Polimeraza acidni protein

PB1 - Polimeraza bazni protein 1

PB2 - Polimeraza bazni protein 2

RNK - Ribonukleinska kiselina

RNP - Ribonukleoprotein

SZO - Svetska zdravstvena organizacija

TM - Transmembranski domen

UniProt - Univerzalni proteinski resursi (eng. universal protein resource)

vRNK - Genomska, virusna ribonukleinska kiselina

VS - Virtuelni skrining (eng. virtual screening)

WT – Divlji tip virusa (eng. wild-type)

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Klasifikacija virusa influence	1
1.2. Struktura virusa influence	2
1.3. Životni ciklus virusa influence	5
1.4. Epidemijski i pandemijski potencijal virusa influence	6
1.5. Prevencija i lečenje influenza virusnih infekcija.....	7
1.5.1. Sezonska vakcinacija protiv influence	7
1.5.2. Antivirusni lekovi	8
1.5.3. Lekovi u kliničkim fazama ispitivanja	10
1.6. Razvoj leka	11
1.7. Baze podataka i prenamena lekova	13
1.7.1. Baze podataka	13
1.7.2. Prenamena lekova	14
2. Cilj rada	16
3. Materijal i metode	17
3.1. Virtuelni skrining molekularnih biblioteka zasnovan na deskriptorima AQVN i EIIP	17
3.2. Koncept dugodosežnih međumolekulskih interakcija u biološkim sistemima	17
3.3. Strukturno zasnovan VS	20
3.4. Molekulsko dokovanje	20
3.4.1. Priprema receptora	20
3.4.2. Priprema liganda	20
3.4.3. Molekulsko dokovanje	20
3.5. Testiranje antivirusne aktivnosti lekova	21
3.5.1. <i>In vitro</i> ispitivanje efikasnosti gvanetidina protiv H1N1 virusa gripa	21
3.5.2. <i>In vitro</i> ispitivanje efikasnosti cikrimina protiv H1N1 virusa gripa	21
3.5.2.1. Određivanje citotoksičnosti cikrimina	22

4. Rezultati	23
4.1. Određivanje EIIP/AQVN bioinformatičkog kriterijuma	23
4.2. Odabir lekova iz baze DrugBank	25
4.3. Heminformatička analiza	27
4.4. Ispitivanje <i>in vitro</i> antivirusna aktivnosti cikrimina.....	29
4.5. Ispitivanje <i>in vitro</i> antivirusne aktivnosti gvanetidina	31
5. Diskusija	32
6. Zaključak	36
7. Lireratura	37
Biografija	53

1.Uvod

Virus influence je najčešći uzročnik respiratornih oboljenja sa epidemijskim i pandemijskim potencijalom. Dok su mnoge zarazne bolesti danas eliminisane ili je njihovo javljanje znatno smanjeno, manje ili veće epidemije virusa influence pojavljuju se svake godine tokom zimskih meseci. Virusi gripa su veoma infektivni i transmisija se vrši aerosolom ili direktnim kontaktom. Iako su danas na raspolaganju različiti antivirusni lekovi i vakcina, prema procenama Svetske zdravstvene organizacije (SZO), od teških oblika gripa oboli 3 do 5 miliona ljudi sa oko pola miliona smrtnih ishoda godišnje u sezonskim epidemijama širom sveta (WHO Influenza, 2018).

Zadnjih 100 godina zabeleženo je nekoliko pandemija virusa gripa koje su se desile 1918. godine poznate kao „Španski grip” (H1N1), 1957. godine „Azijski grip” (H2N2), 1968. godine „Hong-Kongški grip” (H3N2), 1977. godine „Ruski grip” (H1N1) i 2009.godine „Svinjski grip” (H1N1). Sve ove pandemije su rezultirale visokom stopom mortaliteta kod ljudi (Johnson i Mueller, 2002).

Ono što je posebno karakteristično za virus influence su česte mutacije gena i povremeni rearanžmani segmenata genoma, koji se neprekidno dešavaju i uslovljavaju izrazitu genetičku varijabilnost virusa, što predstavlja osnovu njihove brze evolucije. Godišnja vakcinacija protiv sezonskog gripa ima glavnu ulogu u sprečavanju infekcije virusom influence A i B i povećanju imuniteta stanovništva, iako efikasnost vakcina protiv sezonskog gripa varira iz godine u godinu i kreće se između 10 % i 60 % (CDC; 2020). Niska efikasnost vakcine ima za posledicu da je značajan deo populacije podložan infekciji virusom gripa čak iako se vakciniše svake godine. Pored vakcinacije koja predstavlja prvu liniju odbrane protiv gripa, antivirusni lekovi imaju važnu ulogu u prevenciji i terapiji tokom epidemija i pandemija (Ison,2017).

Međutim, sve učestalija pojava virusa rezistentnih na postojeće lekove kao i pretnje od mogućnosti pojave pandemijskih virusa, uslovljavaju potrebu za ubrzanim razvojem novih lekova. Glavnu prepreku u ovom nastojanju predstavlja veoma visoka cena razvoja novog leka (1.5 do 2 milijarde dolara) i vrlo dug proces razvoja (12 do 15 godina) i zato je potrebno okrenuti se pristupima koji omogućavaju brže pronalaženje lekova. Prenamena lekova je jedan od pristupa koji obećava u domenu ubrzanog razvoja novih lekova (eng. drug repositioning (DR)) (Mercorelli i sar., 2018).

1.1. Klasifikacija virusa influence

Influenca virusi pripadaju porodici Orthomyxoviridae (grčki orthos – pravi, myxa – mukus). U okviru ove porodice nalaze se rodovi: Influenza A, B, C, D, Isavirus, Quarantavirus i Thogotovirus ([http://www.ictvonline.org/virus Taxonomy](http://www.ictvonline.org/virus%20Taxonomy)).

Iako slične morfologije i građe viriona, pripadnici različitih rodova porodice Orthomyxoviridae se međusobno razlikuju na više načina. Pre svega u antigenskoj varijabilnosti, broju segmenata genoma RNK, organizmima koje inficiraju, epidemiologiji, patogenosti i kliničkim manifestacijama oboljenja koja izazivaju (Lamb i Krug, 2001). Influenza A virus inficira brojne sisare uključujući ljude, svinje, konje, mačke, pse i divlje životinje (Landolt i Olsen, 2007) za razliku od influence B i C koji predstavljaju tipične humane viruse (Wright i Webster, 2001). Svake godine virusi influence A i B uzrokuju epidemije u ljudskoj populaciji, međutim samo virusi iz roda influence A su bili odgovorni za dosadašnje pandemije.

Influenca A virusi su klasifikovani na podtipove na osnovu antigenskih proteina membrane, hemaglutinina (HA) i neuraminidaze (NA). Ovi proteini su veoma bitni za indukovanje imunog odgovora domaćina i visoko su varijabilni. Danas je poznato 16 podtipova HA (H1-H16) i 9 podtipova NA (N1-N9). Podtipovi virusa H1, H2 i H3 izolovani su kod ljudi, a podtipovi H5, H7 i H9 kod ptica (Medina i Garcia-Sastre, 2011). Svaki izolat virusa influence u svom nazivu sadrži tip (A, B ili C), domaćina iz kojeg je izolovan (izuzetak je humani), mesto prve izolacije, soj (ukoliko postoji), godina izolacije i podtip (samo u slučaju influence tip A). Na primer: A/Duck/Ukraine/1/63(H3N8).

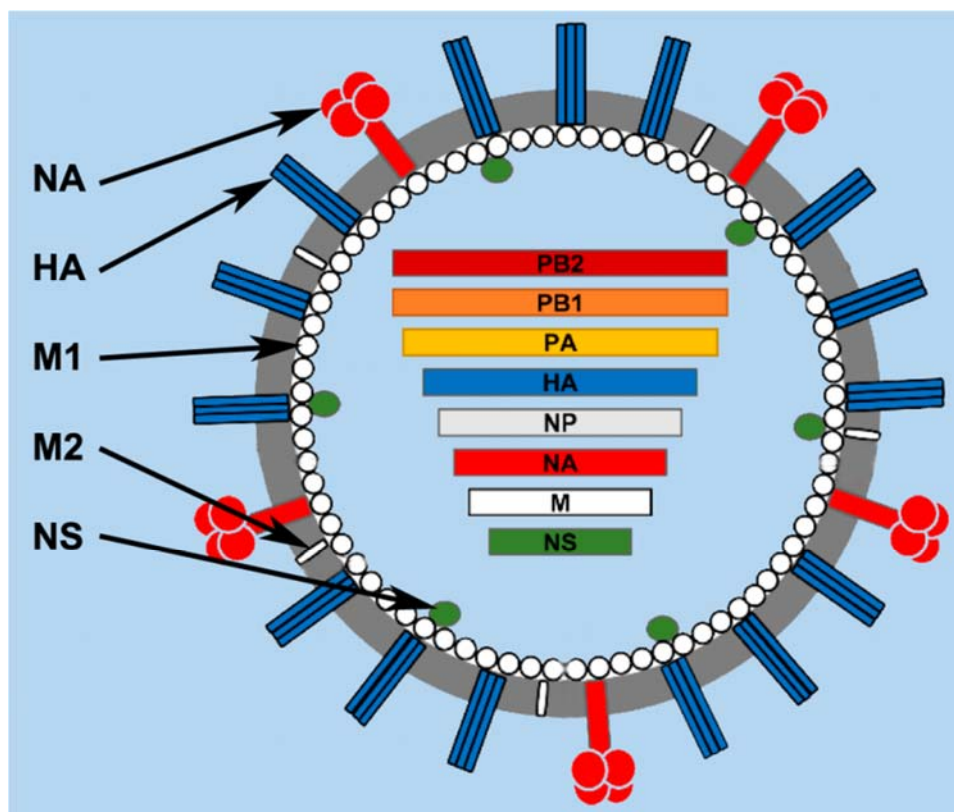
Influenca B i C virusi se ne dele na različite podtipove, imaju manju genetičku varijabilnost i ograničeni su na humanu populaciju, sa samo nekoliko prijavljenih slučajeva kod foka i svinja (Osterhaus i sar., 2000; Guo i sar., 1983). U humanoj populaciji cirkulišu dva soja influenza B virusa: soj Victoria i soj Yamagata (B/Victoria/2/1987 i B/Yamagata/16/1988) koji su pored A H1N1 i H3N2 sastavni deo sezonske vakcine protiv gripa (Domachowske i sar., 2013; Rudenko i sar, 2018). Influenca C virusi su obično povezani sa vrlo blagim ili asimptomatskim infekcijama kod odraslih ljudi. Međutim, infekcija influenza virusom C može izazvati bolesti slične gripu i hospitalizacije u nekim slučajevima, posebno kod dece (Matsuzaki i sar., 2006).

Internacionalni komitet za taksonomiju virusa (ICTV) nedavno je usvojio predlog za formiranje novog genusa u okviru familije Orthomixoviridae, influenza D virus. Ovaj novoidentifikovani patogen D/swine/Oklahoma/1334/2011 (D/OK) prvi put je identifikovan kod svinja i vrlo je sličan prethodno okarakterisanom influenza C virusu sa zoonotskim potencijalom prenosa (Asha i Kumar, 2019).

1.2. Struktura virusa influence

Virioni influenza virusa su pleomorfni, tako da njihov oblik i veličina variraju od sferične do izdužene filamentozne forme, zavisno od soja virusa. Dijametar viriona je od 80-160 nm dok filamentozne forme mogu dostići dužinu od 20 nm. Nezavisno od oblika virusne čestice, karakteriše ih ista građa (Lamb i Krug, 2001). Građa virusne čestice sastoji se od lipidnog dvosloja koji sadrži tri transmembranska glikoproteina: hemaglutinin (HA), neuraminidazu (NA) i M2 protein. Ispod omotača nalazi se nukleokapsid, sačinjen od proteinskog matriksa (M1) koji okružuje ribonukleoproteinske (RNP) komplekse.

Genom virusa influence A i B se sastoji od osam segmenata jednolančanog RNK molekula negativnog polariteta koji kodira 11 proteina, uključujući 4 polimerazna proteina, protein nukleokapsida (NP), hemaglutinin (HA), neuraminidazu (NA), dva proteina matriksa (M1 i M2) i dva nestrukturna proteina (NS1 i NS2) dok influenza C ima samo sedam segmenata RNK-a (Brooks i sar., 2013). Svaki segment RNK povezan je sa više kopija molekula nukleoproteina (NP) i sa tri polimerazne subjedinice, polimeraza baznog proteina 1 (PB1), polimeraza baznog proteina 2 (PB2) i polimeraza acidnog proteina (PA) i tako sačinjava ribonukleoproteinski (RNP) kompleks. Ovaj veliki kompleks okružen je slojem M1 i stabilizovan nuklearnim eksportm proteinom (NEP). Ostali proteini, PB1-F2, PB1-N40, PA-Ks, PA-N155, PA-N182 i NS1, su nestrukturani proteini koji se sintetišu tokom replikacije virusa (Moeller i sar., 2012).



Slika 1. Šematski prikaz influenza A virusa sa osam segmenata genoma i proteinima koje kodiraju. Preuzeto i modifikovano: Mostafa i sar. 2018.

Prva tri RNK segmenta kodiraju tri subjedinice RNK polimeraza kompleksa (PB2, PB1 i PA) koji su odgovorni za sintezu i replikaciju RNK u inficiranim ćelijama.

Prvi segment kodira polimerazu baznog proteina 2 (PB2) koji učestvuje u inicijaciji procesa transkripcije virusne informacione RNK (mRNK), kao protein koji prepoznaje i vezuje se za 5' cap strukture ćelijske mRNK (Wise i sar., 2009).

Polimeraza PB1 je kodirana drugim segmentom RNK i predstavlja osnovu polimeraza kompleksa koji je odgovoran za elongaciju polinukleotidnog lanca i na N-kraju poseduje rezidue preko kojih ostvaruje vezu sa PA, a na C-kraju je povezan sa PB2 (Resa-Infante i sar., 2011). Kod nekih influenza virusa postoje i dodatni proteini čiju sintezu takođe reguliše 2. segment a to su PB1-F2 i PB1-40. PB1-F2 ima ulogu u indukciji apoptoze ćelija imunog sistema domaćina (Rossman i Lamb, 2011), te predstavlja važan faktor virulencije (Le Goffic, 2010). PB1-F2 je pronađen u mitohondrijama inficiranih ćelija a deo je lokalizovan i u jedru gde interaguje sa PB1 i stimuliše aktivnost polimeraza kompleksa (Wise i sar., 2011). PB1-N40 je najvećim delom detektovan u citoplazmi, ali njegova funkcija, za sada, nije razjašnjena (Paterson i Fodor, 2012).

Sintezu PA polimeraze (eng. polymerase acidic protein) kodira treći segment RNK. Ima bitnu ulogu u transkripciji i replikaciji virusne RNK formirajući heterotrimerni polimerazni kompleks zajedno sa PB1 i PB2 subjedinicama. Njen N domen poseduje RNK endonukleaznu aktivnost koja je neophodna za mehanizam „cap-snatching”, koji omogućava inicijaciju transkripcije (Jagger i sar., 2012; Zheng i Tao, 2013; Dias i sar., 2009). PA ima i proteaznu aktivnost, koja je neophodna za oslobađanje RNP kompleksa od jedarnog matriksa, što je preduslov njihovog transporta u citoplazmu (Perales i sar., 2000).

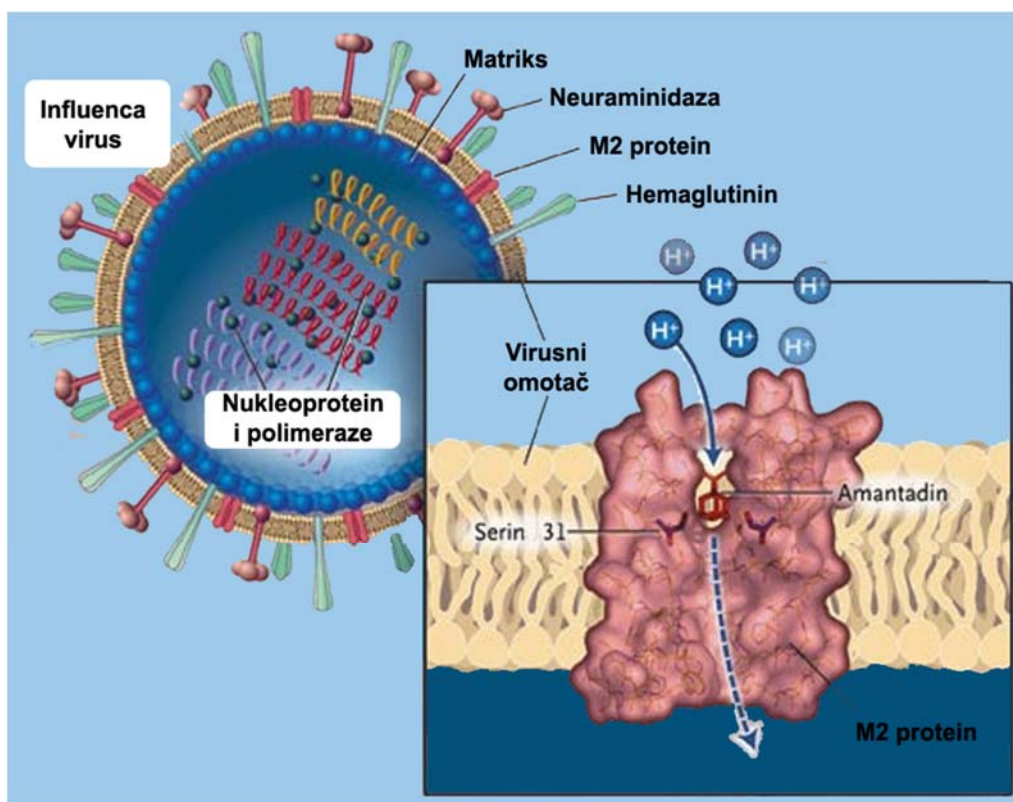
Hemaglutinin (HA) je integralni membranski protein kodiran četvrtim segmentom, koji ima važnu ulogu u vezivanju virusne čestice za ćelijske receptore i fuziju virusnog omotača sa ćelijskom membranom i na taj način omogućiti ulazak virusnog nukleokapsida u citoplazmu. HA je homotrimer, izgrađen od tri HA1-HA2 polipeptida. Oni su raspoređeni po površini virusnog omotača tako što su svojim štapičastim delom uronjeni u membranu a prema spolja se pružaju globularne „glave“ (Skehel i Wiley, 2000). Na osnovu antigenskih razlika HA, influenza A virusi su klasifikovani u 16 HA podtipova. Hemaglutinin predstavlja glavnu metu neutrališućih antitela a njegova varijabilnost predstavlja osnov stalne evolucije influenza virusa (Clementi i sar., 2009; Wu i Wilson, 2020).

Peti segment nosi informaciju za sintezu nukleoproteina (NP), koji se u inficiranoj ćeliji stvara u najvećoj količini. NP se u toku infekcije nagomilava u jedru inficirane ćelije i ima važnu ulogu u procesu replikacije i transkripcije virusnog genoma kao i u njegovom intracelularnom transportu i pakovanju. NP je tipski specifičan antigen i na osnovu njega, vrši se determinacija influenza virusa u tipove A, B ili C (Chenavas, 2013).

Neuraminidaza (NA) je još jedan integralni membranski glikoprotein, kodiran 6. segmentom RNK i drugi glavni površinski antigen viriona na osnovu čega se vrši podela influenza A virusa na podtipove N1-N9. Glavna funkcija ovog proteina je cepanje terminalnih ostataka sijalinske kiseline sa ćelijskih glikoproteina, pri čemu se oslobađaju novonastale virusne čestice iz ćelije domaćina koji su dalje spremni da inficiraju nove ćelije (Veit i Thaa, 2011; Murray i sar., 2016).

Sedmi segment genoma kodira sintezu proteina matriksa M1 i M2. Protein matriksa M1 formira mrežu ispod omotača viriona okružujući nukleokapsid i najzastupljeniji je virusni protein u virionu influenza virusa. Eksperimentalno je potvrđeno da je protein virusa influence M1 ključan za kasniji događaj u životnom ciklusu virusa tako što učestvuje u transportu novoformiranih RNP kompleksa iz ćelijskog jedra u citosol i učestvuje u njihovoj inkorporaciji u nove virione (Bui i sar., 2000).

M2 je treći integralni membranski protein koji formira proton-selektivni jonski kanal, gde svaku poru kanala grade četiri heliksa sastavljena od po 97 aminokiselinskih rezidua. Sačinjen je od kratkog N-terminalnog perioplazmatskog domena kojeg čine 24 aminokiseline, transmembranskog (TM) domena koji se sastoji od 19 rezidualnih ostataka i citoplazmatski domen čine 54 rezidue C-terminalnog kraja (Musharrafieh i sar., 2020). Delecije ili mutacije M2 citoplazmatske regije dovode do nepotpune inkorporacije genomske RNK u virion i onemogućava formiranje i pupljenje virusnih čestica. Nakon što virus uđe u inficiranu ćeliju endocitozom, protonski kanal M2 se otvara kao odgovor na nizak pH endosoma, omogućavajući protok virusu, što pokreće disocijaciju virusne RNK iz RNP kompleksa u citoplazmi radi replikacije u ćeliji domaćina (Lamb i sar., 1994). Pokazano je da histidin na 37. (His37) i triptofan na 41. (Trp41) poziciji molekula M2, imaju ulogu pH senzora i protonske kapije. Ovi ostaci određuju protonsku selektivnost i jednosmernu provodljivost kanala (Wang i sar., 1995; Tang i sar., 2002). U kasnijoj fazi replikacije virusa, M2 protein održava visoku vrednost pH trans-Goldžijeve mreže i tako sprečava prevremene konformacione promene HA (Pinto i sar., 1992; Pielak i Chou, 2011). Razumevanje uloge M2 citoplazmatskih domena u formiranju virusnih čestica moglo bi ponuditi nove mogućnosti za razvoj antivirusne terapije (Musharrafieh i sar., 2020).



Slika 2. U odsustvu amantadina, otvara se M2 protonski kanal virusnog omotača pri čemu dolazi do priliva protona u unutrašnjost viriona, što dovodi do depolimerizacije M1 i njegovu disocijaciju od RNP kompleksa. U prisustvu amantadina, kanal je blokiran i replikacija je inhibirana. Serin na položaju 31 nalazi se delimično u domenu protein-protein interakcije, a delimično u kanalu. Zamena serina većim asparaginom onemogućava vezivanje amantadina i omogućava funkcionisanje kanala. Preuzeto i modifikovano: Hayden, 2006

Osmi segment RNK kodira dva proteina: nestrukturani protein NS1 i NS2. Protein NS2 se još naziva i jedarni izvozni protein (eng. nuclear export protein - NEP) jer ima ulogu u transportu novosintetisanih RNP kompleksa iz jedra. Neke studije su pokazale da je NEP uključen i u regulisanje akumulacije virusne genomske vRNK i antigenomske cRNK, kao i virusne mRNK sintetisane virusnom RNK-zavisnom RNK polimerazom. NEP učestvuje i u regrutovanje ćelijske ATP-aze u ćelijsku membranu kako bi se pomoglo efikasno oslobađanje virusa iz inficirane ćelije (Paterson i Fodor, 2012). Nasuprot NEP koji se u virionu nalazi tek u kasnijim fazama virusnog ciklusa NS1 se stvara u ranim fazama infekcije.

NS1 protein se smatra multifunkcionalnim faktorom virulencije i sintetise se u velikim količinama u inficiranoj ćeliji ali nije inkorporiran u virione. NS1 protein pretežno je lokalizovan u jedru ćelije, ali značajan procenat može da se nađe i u citoplazmi. To je regulatorni protein koji ima nekoliko uloga koje doprinose efikasnoj replikaciji virusa (Hale, 2008). Ovaj protein ima važnu ulogu u borbi protiv ćelijskog imunog odgovora domaćina i odgovoran je za patogenost virusa influence a i smatra se target proteinom za atenuaciju prilikom formiranja vakcina (Lee i Saif, 2009).

1.3. Životni ciklus virusa influence

Reproduktivni ciklus virusa započinje njegovim ulaskom u respiratorni trakt gde se virus vezuje za proteine ili lipide na površini ciljane ćelije, a koji sadrže sijalinsku kiselinu (Brooks i sar., 2013). Glavnu ulogu u povezivanju virusa za receptore ćelija domaćina imaju molekuli HA koji poseduju receptor-vezujuće sekvence. Humani sojevi virusa stvaraju α 2,6 sijalinsko-galaktozne veze koje su

dominantne na ćelijama humanog respiratornog epitela (Bouvier i Palese, 2008). Nasuprot tome, na ćelijama crevnog epitela ptica i kopitara dominira $\alpha_2,3$ tip receptora, koje prepoznaju ptičiji influenza A virusi (Skehel i Wiley, 2000; Suzuki i sar., 2000). Za razliku od njih, svinjski soj virusa prepoznaje oba receptora i ovo ukazuje na veliku važnost svinja kao inkubatora za mešanje ptičije i humane influence, čime se stvaraju opasni patogeni virusi (Everett i sar., 2020). Nakon vezivanja viriona za ćeliju domaćina, virus ulazi u ćeliju procesom endocitoze. U intracitoplazmatskoj vezikuli u kojoj se nalazi virus dolazi do smanjivanja pH što uslovljava spajanje virusne membrane sa membranom vezikule (Whittaker i Digard, 2006) a kisela sredina u unutrašnjosti endozoma izaziva i otvaranje M2 protonskog kanala virusnog omotača (Boulo i sar., 2007). Proton-selektivni M2 jonski kanal posreduje u provodljivosti protona u unutrašnjost viriona, dovodeći do odvajanja (disocijacije) RNP jezgra od proteina M1 što je osnova za početak procesa transkripcije i replikacije (Bui i sar., 1996; Lamb i Pinto, 2006). Pokazano je da položaj histidina na 37. i triptofana na 41. poziciji molekula M2, deluju kao pH senzor i protonska kapija (Krug i Aramini, 2009). Influenca virusi se replikuju u jedru inficirane ćelije (Herz i sar., 1981). Tokom replikacije nukleokapsid, koji nosi negativno orijentisan molekul RNK, migrira u jedro ćelije domaćina zajedno sa još tri virusna proteina: M1, NEP i NS1 (Boulo i sar., 2007). Deo M1 proteina i NEP koji ulaze u jedro imaju važnu ulogu u naknadnom iznošenju formiranih RNP kompleksa. U jedro ulazi i NS1 protein koji ima više važnih funkcija, a jedna od njih je i stimulacija sinteze virusnih mRNK i inhibicija ćelijske transkripcije (Hale, 2008). U jedru, pod uticajem RNK-zavisne RNK polimeraze počinje transkripcija i stvaranje informacione virusne RNK (mRNK). U tom procesu koriste se prajmeri koji su ćelijskog porekla. Primarni transkripti se koriste za translaciju virusnih proteina, komponenti RNP kompleksa: PB1, PB2, PA, NP i NS1 protein, gde su u ranim fazama infekcije najzastupljeniji NP i NS1. Pretpostavlja se da je povećana koncentracija slobodnog NP okidač za preokret od sinteze mRNK do obrazovanja komplementarne kopije cele RNK (cRNK) koju će isti enzimski kompleks, naknadno transkribovati u više kopija negativnih RNK lanaca genoma novih virusa (Radovanov, 2016). U jedru sintetisana virusna mRNK, prelazi u citoplazmu, gde se odvija translacija i sinteza virusnih proteina (HA, NA i M2) na ribozomima koji se nalaze na endoplazmatičnom retikulumu ćelije. Posttranslaciono se HA i NA obrađuju i transportuju na ćelijsku površinu, gde se integrišu u ćelijsku membranu. Finalni korak u maturaciji virusa influence odigrava se ekstracelularno. Virusni nukleokapsidi, zajedno sa M1 i NEP proteinima, se transportuju do plazma membrane na kojoj se nalaze inkorporisani HA i NA proteini. Sklapanje i oslobađanje novoformiranih viriona influenza virusa procesom pupljenja odigrava se u delu plazma membrane poznate kao lipidni splavovi „lipid rafts” (LR) (Rossmann i Lamb, 2011). To su segmenti membrane bogati holestrolom i sfingolipidima. Nakon završenog pupljenja, virioni ostaju pričvršćeni za ćelijsku membranu preko HA koji ostaju u vezi sa molekulima sijalinske kiseline, sve dok ne budu oslobođeni sijalidaznom aktivnošću NA. Uklanjanje ostataka sijalinske kiseline iz glikoproteina i glikolipida, omogućava novim česticama virusa da se odvoje sa površine ćelije domaćina i ponove ciklus infekcije (Nayak i sar., 2009; Samji, 2009; Haaheim i Oxford, 2013).

1.4. Epidemijski i pandemijski potencijal virusa influence

Veoma važna karakteristika influenza A virusa je izrazita genetička varijabilnost koja je osnov njihove brze evolucije što dovodi do nastanka novih mutiranih sojeva virusa. To se može dogoditi na dva načina: mutacijom gena (antigenski drift) i genskim rearanžmanom (antigenski šift).

Kao i većina RNK virusa, virus gripa nema genetski mehanizam za proveru i korekciju grešaka tokom replikacije RNK katalizovane RNK-zavisnom RNK polimerazom a kao posledica toga javlja se visoka stopa mutacije. Svih osam segmenata genoma podložno je mutacijama (substitucije, delecije i insercije), a posebno delovi genoma koji kodiraju površinske glikoproteine HA i NA, koji predstavljaju glavne mete imunskog sistema domaćina, te su izloženi najjačem selektivnom pritisku i u njima dolazi do akumulacije mutacija (Tsimring i Levine, 1996). Ovaj proces je poznat kao „antigenski drift” i dovodi do pojave novih varijanti već postojećeg virusa. Antitela koja su već

prisutna u populaciji kao rezultat kontakta sa virusima koji su cirkulisali ranije, ne prepoznaju promene i ne mogu efikasno da neutrališu aktuelni virus sa izmenjenim HA i NA što dovodi do sezonskih epidemija (Haaheim i Oxford, 2013).

Ukoliko dva virusa koji pripadaju istim ili različitim podtipovima inficiraju jednu ćeliju, što se u prirodi vrlo često dešava, može doći do razmene genskih segmenata virusa koji inficiraju ćeliju. Rearanžman se može desiti ili u humanom organizmu ili u prelaznom domaćinu, kao što je na primer svinja, gde se istovremeno može javiti infekcija humanim i avijarnim virusom. Kao rezultat ovog procesa, nastaju nove generacije virusa sa novim genskim kombinacijama, a samim tim i novim antigenskim karakteristikama. Ovaj proces je poznat kao „antigenski šift”. Važno je napomenuti da su genski rearanžmani znatno ređi ali mnogo značajniji procesi i predstavljaju preduslov nastanka pandemija virusa gripe, odnosno epidemija globalnih razmera. Veruje se da je upravo ovaj proces i doveo do nastanka novog ptičijeg gripa A (H7N9) identifikovanog u Kini 2013.godine (Li i sar., 2013; Medina i Garcia-Sastre, 2011). Takođe treba istaći da je antigenski šift isključivo karakteristika influenza A virusa i jedino oni imaju pandemijski potencijal, najverovatnije jer influence A cirkuliše kako između humane tako i između animalne populacije dok su tipovi influence B i C ograničeni na humanu populaciju (Brooks i sar., 2016).

1.5. Prevencija i lečenje influenza virusnih infekcija

Virus gripa je jedna od retkih virusnih infekcija za koju postoje specifični lekovi (De Clercq, 2006). Uprkos širokoj dostupnosti antivirusnih lekova i vakcina, grip i dalje ostaje ozbiljna svetska opasnost za javno zdravlje ljudi. Zato su blagovremena prevencija i lečenje influenza virusnih infekcija od velikog značaja.

1.5.1. Sezonska vakcinacija protiv influence

Sezonska vakcinacija predstavlja jednu od važnih mera kojom se smanjuju morbiditet i mortalitet izazvani virusom gripa. Godišnja vakcinacija protiv gripa preporučuje se posebno kod rizičnih grupa, kao što su osobe starije od 50 godina, osobe sa hroničnim bolestima, zdravstveni radnici kao i deca u uzrastu od 6 meseci do 2 godine (Baguelin i sar., 2012).

Usled česte antigenetske varijabilnosti koja karakteriše viruse influence, proizvodnja vakcine predstavlja pravi izazov i potrebu da se sastav vakcine stalno prilagođava (Van-Tam i Sellwood, 2009). Vakcine protiv gripa proizvode se svake godine i to po preporuci koju izdaje SZO za svaku predstojeću sezonu, pre početka sledeće sezone epidemije (u februaru za Severnu hemisferu, a u septembru za Južnu hemisferu). Uglavnom sezonska vakcina protiv gripa sadrži trovalentne doze, tj sadrži derivate od tri različita soja virusa gripe. Međutim, u zadnje vreme ide se na to da u sastav vakcine ulaze četiri soja virusa koji bi štitili od dva najčešća soja A virusa i dva soja B virusa influence (Shasha i sar., 2020). Jedna vakcinalna doza sadrži po 15 µg svakog virusa (Tosh i Jacobson 2010; CDC, 2018).

Postoje dve vrste licenciranih vakcina protiv gripa: jedna koja sadrži mrtav, inaktivisan virus i druga u kojoj se nalazi živ, atenuiran virus influence. Obe ove vakcine su multivalentne, tj sastavljene su od više sojeva influenza virusa koji aktivno cirkulišu u humanoj populaciji.

Već dugi niz godina kod ljudi se koriste inaktivisane vakcine i one mogu sadržati cele virione inaktivisanog virusa, prečišćene površinske glikoproteine ili pojedine segmente virusa (split vakcina) (Hampson ,2008). Vakcinalni soj virusa se proizvodi u alantoisnoj šupljini embrioniranih kokošijih jaja. Virus se u vakcinama u kojima se nalaze cele virusne čestice, inaktivise formalinom, čime se onemogućava njegova dalja replikacija. Nakon toga se tečnost iz alantoisne duplje prečišćava, a virus koncentriše zonalnim centrifugiranjem. U proizvodnji takozvane split vakcine, virus se takođe

inaktivnije formalinom, a onda se hemijskim putem razara čestica virusa. U toku tog procesa, razlaže se lipidna komponenta omotača virusa. Kao nuspojava vakcine koja sadrži ceo virion kod 20-30% vakcinisanih, na mestu aplikacije vakcine mogu da se jave otok, povišena temperatura, glavobolja i bol u mišićima (Zambon i Potter, 2009). Primenom vakcina u kojima se nalaze samo delovi viriona procenat neželjenog dejstva je znatno niži. Vakcine koje sadrže inaktivisan virus uglavnom daju relativno kratkotrajni imuni odgovori (Madigan i sar., 2009) te SZO preporučuje sprovođenje godišnjih imunizacija, naročito u okviru rizičnih grupa.

Drugi tip vakcine koji je odobren 2002. godine u SAD, a 2011. godine u Evropi sadrži živ, atenuiran virus influence (ECDC ,2018). Ova vakcina sadrži kompletan, vijabilan virus, atenuiran adaptacijom na replikaciju na nižim temperaturama. Atenuirani laboratorijski virus, nastao je serijskim pasażama na 25° C, čime je stvoren mutirani soj koji se ne umnožava na višoj temperaturi, kao što je telesna temperatura čoveka, izolovan je u nazofarinksu i ne može se širiti do pluća (EMA, 2014). Ovaj virus je zadržao sposobnost replikacije i mogućnost da izazove imunski odgovor, uglavnom bez izazivanja bolesti (CDC, 2015). U slučaju pojave bolesti izazvane vakcinom, simptomi su slabiji i generalno se nazivaju neželjene reakcije.

Ono što je bitno naglasiti je svrha vakcinacije stimulisanje stvaranje neutrališućih antitela, koja će u slučaju infekcije prepoznati epitope na površini visoko varijabilnog globularnog dela HA, a u manjoj meri i antitela na NA (Li i sar., 2012). Za postizanje najvišeg nivoa titra antitela uglavnom je potrebno oko dve nedelje, a protektivni efekat traje narednih 6 meseci.

Vakcinalni virus, prisutan u živoj vakcini aplikuje se kao intranazalno sprej (FluMist) (Lee i sar., 2014) i njena primena je dozvoljena samo kod zdravih osoba uzrasta 2-49 godina u SAD, 3-15 godina u Rusiji (WHO ,2011) i 2-17 godina u zemljama Evropske unije (ECDC ,2018) dok se inaktivisana vakcina daje intramuskularno, a mogu je primiti sve osobe starije od 6 meseci (WHO ,2011; Committee on Infectious Diseases, 2017). Kao kontraindikacija za vakcinaciju uzima se postojanje akutno febrilnog stanja, postojanje alergije na jaja (vakcina može sadržati albumine iz jaja) (Nayak i sar., 2005) kao i istorija Guillain-Barre sindroma 6 nedelja nakon prethodne vakcinacije (Harper i sar., 2009).

Efikasnost vakcinacije se može razlikovati od sezone do sezone i to zavisno od cirkulišućih sojeva gripa. Pored toga, sezonske vakcine protiv gripa su u potpunosti neefikasne u sprečavanju povremenih pandemija gripa izazvanih novim sojevima virusa koji se pojavljuju.

U nastojanju da se dobiju bolje vakcine, razvijene su brojne platforme i tehnologija za njihovu proizvodnju, pri čemu najveći izazov predstavlja velika varijabilnost i brza evolucija virusa. Razvoj nove generacije vakcina ide u pravcu proizvodnje „univerzalne“ vakcine koja bi delovala protiv više subtipova virusa influence tipa A što bi omogućilo brži odgovor na sezonsku epidemiju ili moguću pandemiju izazvanu novim virusom gripa (prepandemijske vakcine). Ove vakcine sadrže HA, NA, NP i M2.

U praksi se kao merilo imunogenosti i zaštite postignute vakcinacijom koristi HI test koji predstavlja titar antitela određen reakcijom inhibicije hemaglutinacije, pri čemu se vrednosti ≥ 40 kod zdravih odraslih osoba smatraju protektivnim (Kreijtz i sar., 2011).

1.5.2. Antivirusni lekovi

Pored vakcinacije koja predstavlja prvu liniju odbrane protiv gripa, antivirusni lekovi imaju važnu ulogu u prevenciji i terapiji tokom epidemija i pandemija (Ison, 2017). Trenutno na tržištu postoje dve klase antivirusnih lekova koje je odobrila Uprave za hranu i lekove (eng. Food and Drug Administration – FDA) a koji se koriste u profilaksi i lečenju infekcije izazvane influenza virusom (Loregian i sar., 2014). Ovi antivirusni lekovi dovode do inhibicije dva glavna površinska glikoproteina: neuraminidaze (NA) i M2 protonskog kanala.

Inhibitori neuraminidaze (NAI), oseltamivir (GS4104, Tamiflu®) i zanamivir (GG167, Relenza®) su odobreni 1999. godine za lečenje i sprečavanje akutnih infekcija izazvanih virusom influenza tipa A i B (Pizzorno i sar., 2011; De Clercq, 2006). Ovi lekovi deluju tako što inhibiraju funkciju NA, što za posledicu ima agregaciju virusa na površini inficirane ćelije i nemogućnost oslobađanja novonastalih viriona iz ćelije domaćina (Haaheim i Oxford, 2013).

Zanamivir se razlikuje od prirodnog inhibitora NA (2,3-didehidro-2-deoksi-N-acetilneuraminske kiseline (DANA)), Neu5Ac2en u supstitucija O4-hidroksilne grupe sa guanidino grupom (Burmeister i sar., 1993) i njegovo otkriće jedan je od prvih primera uspešne primene dizajna lekova zasnovanog na strukturi (Varghese, 1999; von Itzstein, 2007). Vezivanje zanamivira za NA ne zahteva konformacione promene, te on zadržava inhibitornu aktivnost i na oseltamivir rezistentne sojeve sa mutacijom na 275 poziciji (Pizzorno i sar., 2011).

Lek oseltamivir je odobren za odrasle osobe, dok je upotreba zanamivira dozvoljena svim osobama starijim od 7 godina. Učestalost rezistencije na NAI u trenutno cirkulišućim sojevima virusa gripa je niska, <1% (Hurt i sar., 2017). Veća rezistentnost na oseltamivir, najčešće korišćeni NAI, zabeležena je kod sezonskog virusa H1N1 2008 koji je sadržao H275Y mutaciju (spontana mutacija koja je dovela do zamene histidina tirozinom na poziciji 275 NA) i kod pandemijskog virusa H1N1 pdm09. Veliki problem u primeni NAI je vrlo uzak terapijski prozor za njihovu primenu sa intervalom od 24–48 sati nakon pojave prvih simptoma bolesti (Ison, 2017; Sur i sar., 2020). Zanamivir se daje intra-nazalno, umesto oralno kao što je slučaj sa oseltamivirom, tako da je njegova upotreba ograničen, posebno kod novorođenčadi i kritično bolesnih pacijenata. Iz ove klase lekova oseltamivir i zanamivir su odobreni širom sveta, dok se peramivir (BCX-1812, RWJ-270201) i laninamivir (CS-8958, Inavir®) primenjuju samo u Japanu, Kini i Južnoj Koreji (Meijer, 2014) a peramivir je dozvoljen i u SAD (CDC, 2015). Peramivir se aplikuje intravenozno i pogodan je za teže obolele i pacijente na respiratoru koji ne mogu da uzmu lek oralno ili inhalatorno. Lek laninamivir se uzima inhalacijom a njegova efikasnost je primetna već posle jedne doze kod pacijenata inficiranih H1N1 i H3N2 virusima. Takođe se primenjuje i u inhibiciji oseltamivir-rezistentnih virusa (Vavricka i sar., 2011).

Drugoj grupi antivirusnih lekova koja se koriste u lečenju infekcije izazvane influenza virusom, a koji deluju kao blokatori M2 jonskih kanala pripadaju derivati adamantana: amantadin (Symmetrel®) i rimantadin (Flumadine®). Ovi lekovi se vezuju za M2 protonsko-selektivni jonski kanal i na taj način inhibiraju procese zavisne od funkcionisanja M2 (Du i sar., 2012). Blokatori M2 jonskog kanala sprečavaju fuziju virusnog omotača i membrane endozoma, kao i disocijaciju ribonukleoproteina, čime je sprečen transport RNP kompleksa u jedro, a samim tim i procesi replikacije i transkripcije (Leonov i sar., 2011). Derivati adamantana, amantadin i rimantadin nisu efikasni u inhibiciji M2 jonskog kanala kod influenza B i C virusa (Mould i sar., 2003) ali zbog pristupačnosti i niske cene više od 30 godina uspešno su se koristili protiv infekcije izazvane influenza A virusom (Dolin i sar., 1982). Međutim, vremenom se razvila rezistencija prema ovoj grupi lekova i u periodu od 2002. do 2007. godine njihova efikasnost je značajno opala te je doneta odluka o njihovom povlačenju (CDC, 2006). Iz tog razloga, inhibitori neuraminidaze su jedina klasa antivirusnih lekova preporučenih od strane SZO za lečenje i profilaksu infekcije izazvane influenza virusom (Pizzorno i sar., 2011). U terapijske svrhe se koriste i lekovi odobreni na regionalnom nivou a jedan od njih je i ribavirin, nukleozidni analog koji ima širok spektar antivirusnih aktivnosti protiv RNK i DNK virusa (Crotty i sar., 2000). Upotreba oralnog ili inhalatornog oblika ribavirina i podaci o intravenskom aplikovanju nisu pokazali neki veliki klinički potencijal u korist primene ovog leka (Chan-Tack i sar., 2009). Iako se uglavnom koristi za lečenje infekcija izazvanih hepatitisom C, u Meksiku je ribavirin odobren u terapiji protiv gripa (Steinmetzer i sar., 2015).

Nagli rast rezistencije na postojeće antivirotoke se beleži širom sveta. Molekularna osnova rezistencije na adamantane povezana je sa aminokiselinским supstitucijama na položajima L26, V27, A30, S31 i G34 unutar transmembranskog domena proteina M2 (Lee i Yen, 2012). M2-S31N

varijanta, koja označava zamenu serina asparaginom na poziciji 31 M2 molekula (WHO, 2013) je pronađena u više od 95% trenutno cirkulišućih virusa influence tip A (Hurt i sar., 2017). Ekspanzija virusa sa M2-S31N mutacijom u ranim 2000-im nije posledica pritiska leka, već je povezana sa povoljnim supstitucijama na drugim mestima u virusu, u procesu koji je označen kao genetički „hitch-hiking“. S druge strane, najnoviji izveštaji iz Australije sugerišu da uloga ostatka M2 N31 u virusnom fitnessu više nije toliko bitna kao nekada (Hurt i sar., 2017). Uprkos činjenici da je primena inhibitora M2 proteina obustavljena zbog njihove slabe aktivnosti protiv influence virusa tipa B, neželjenih dejstava i brzog stvaranja rezistencije tokom lečenja, interes za ovaj terapijski target je i dalje veliki obzirom na njegovu značajnu ulogu koju igra u životnom ciklusu virusa. Sadašnja nastojanja u istraživanjima koja se bave dizajnom novih lekova protiv gripa su usmerena ne samo na efikasnu inhibiciju nemutiranog proteina M2 već i na inhibiciju proteina sa mutacijom S31N (Hurt i sar., 2017).

Influenca virus sa smanjenom osetljivošću na inhibitore neuroaminidaze imaju mutacije koje direktno ili indirektno menjaju konformaciju aktivnog mesta NA što se odražava na način vezivanja leka i to može da varira među različitim podtipovima. Tako da virusi koji pripadaju prvoj grupi NA (N1, N4, N5, N8) imaju veću tendenciju ka razvoju rezistencije na oseltamivir u odnosu na viruse druge NA grupe (N2, N3, N6, N7, N9). Na ovaj način mutacija H275Y, koja predstavlja zamenu histidina tirozinom na poziciji 275 NA dovodi do pomeranja karboksi grupe na položaju 276 u unutrašnjost vezujućeg mesta čime se narušava konformacija udubljenja za koje se vezuje oseltamivir i time onemogućava njegovo vezivanje. Potvrđene su i druge dve mutacije R292K i N294S koje dovode do smanjene osetljivosti na oseltamivir. Ove mutacije inhibiraju rotaciju bočnog lanca rezidue glutaminske kiseline na poziciji E276 sprečavajući stvaranje udubljenja (Wang i sar., 2002). Izolati sa mutacijom N294S pokazali su smanjenu osetljivost na oseltamivir kod sezonskih virusa H3N2 (Kiso i sar., 2004). Dok su druga istraživanja pokazala da neki od izolata H7N9 sadrže mutaciju R292K što rezultira širokom otpornošću na inhibitore neuraminidaze (Liu i sar., 2014). Za razliku od oseltamivira, rezistencija na zanamivir među sezonskim i pandemijskim izolatima gripa je zanemarljiva. Prema tome, zanamivir je prvi izbora antivirusika u slučaju gripe ili izbijanja pandemije ukoliko se javi rezistentnost na oseltamivir.

Ako se uzme u obzir sve učestalija pojava virusa rezistentnih na postojeće lekove kao i ograničen broj lekova koji se koristi u borbi protiv influence, potreba za razvojem novih lekova je sve veća. Danas su u toku istraživanja novih potencijalnih lekova koji ciljaju oba virusna proteina kao i ćelijske faktore domaćina. Mnogi od njih su u naprednim kliničkim fazama razvoja i namenjeni su za upotrebu u lečenju infekcije virusom gripa u vidu kombinovane terapije sa licenciranim M2 i NA inhibitorima (Haasbach i sar., 2013a; Tarbet i sar., 2012). Nedavno je u SAD i Japanu odobren lek Baloxavir marbokil Baloxavir marboxil (BXM), endonukleazni inhibitor PA subjedinice virusne polimeraze. Ovaj lek je počeo da se primenjuje 2018. godine za lečenje influence tipa A i B ali je već u sezoni 2018-2019 utvrđena pojava rezistencije na njega (O'Hanlon i Shaw, 2019; Abed i sar., 2021).

1.5.3. Lekovi u kliničkim fazama ispitivanja

Jedan od lekova koji se pokazao kao dobar kandidat u profilaksi influence je Favipiravir (T-705; 6-fluoro-3-hidroksi-2-pirazinkarboksamid), antivirusni lek koji selektivno inhibira RNK zavisnu RNK polimerazu influenza virusa. Ovaj antivirusni lek je aktivan protiv više podtipova virusa gripa, uključujući 2009 H1N1, H5N1 i ptičiji virus H7N9. Pored virusa gripe, favipiravir inhibira i druge RNK viruse, kao što su arenavirus, virus Zapadnog Nila, poliovirus, rinovirus i RSV (eng. Respiratory Syncytial Virus). Takođe inhibira sojeve gripa rezistentne na postojeće antivirusne lekove i pokazuje sinergistički efekat u kombinaciji sa oseltamivirom, proširujući tako mogućnosti lečenja gripa. Treća faza kliničkog ispitivanja ovog leka u terapiji gripe je završena u Japanu, gde je

odobren dok je druga faza završena u Sjedinjenim Državama. Dosadašnji dokazi iz kliničkih studija pokazuju da se favipiravir dobro pokazao u terapiji kod ljudi (Furuta i sar., 2017). Favipiravir je u oktobru 2020.godine indikovao i za lečenje pacijenata sa blagom do umerenom kliničkom slikom Covid-19 infekcije (Hassanipour i sar., 2021).

DAS181 (Fludase®) je inhalaciona bakterijska sialidaza koja deluje uklanjanjem sialinske kiseline (Sia) sa površine epitela ćelija, sprečavajući vezanje virusa koji koriste Sia kao receptor i naknadnu infekciju respiratornih puteva. S obzirom da DAS181 cilja ćelije domaćina, potencijal za generisanje virusne rezistencije može biti manji nego kod tradicionalnih inhibitora gripa, koji ciljaju sam virus (M2 inhibitori, inhibitori neuraminidaze). DAS181 je aktivan kako *in vitro* tako i *in vivo* protiv raznih sezonskih sojeva gripa uključujući i visoko patogeni ptičiji H5N1, kao i protiv pandemijskog tipa virusa gripe A (H1N1) i H3N2 (Triana-Baltzer i sar., 2009). Ovaj lek se nalazi u II/ III fazi kliničkog ispitivanja, a primećena je i aktivnost u pojedinačnim slučajevima parainfluenze kod imunosupresivnih pacijenata (Nicholls i sar., 2013; Chemaly i sar., 2021).

Na spisku lekova koji se nalaze u kliničkim fazama ispitivanja je i VX-787, prvi u klasi oralnih terapeutika koji inhibiraju polimerazu PB2 influenza virusa kod sezonskog i pandemijskog gripa, uključujući pandemiju 2009 H1N1 i H5N1 i trenutno se nalazi u IIa fazi kliničkog ispitivanja (Boyd i sar., 2015) (www.clinicaltrials.gov).

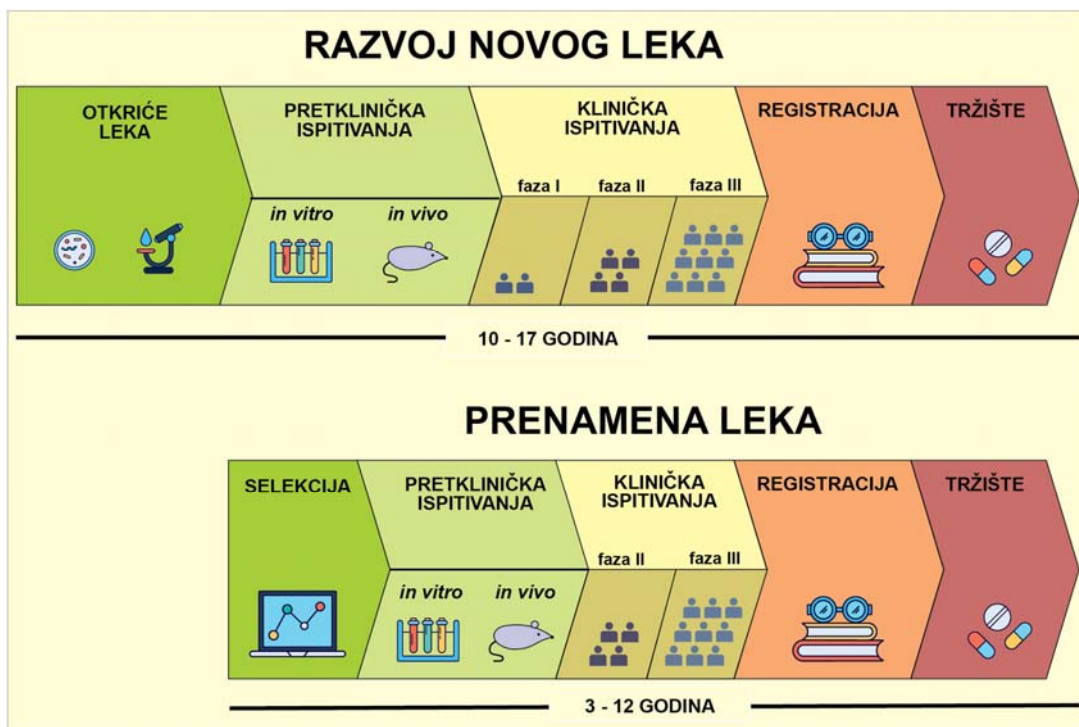
Pojava rezistencije na postojeće antivirusne lekove predstavlja glavni izazov u lečenju inficiranih visoko virulentnim sojevima influenza virusa. Kombinovanje lekova sa različitim mehanizmima antivirusnog delovanja predstavlja dobru strategiju kojom se smanjuje rizik od pojave rezistencije. Istraživanja su pokazala da trostruke kombinacija oseltamivira, amantadina i nukleozidnog analog ribavirina imaju snažnu sinergističku aktivnost *in vitro* i *in vivo* protiv sezonskog i pandemijskog virusa (H1N1) (Nguyen i sar., 2012).

1.6. Razvoj lekova

Razvoj jednog leka predstavlja rezultat zajedničkog rada naučnih laboratorija i farmaceutske industrije, koji se odvija u pet koraka i nekoliko faza (Tonkens, 2005).

Kada se pojavi bolest za koju još nije nađen lek najpre se vrši identifikacija potencijalnog targeta, odnosno ciljnog proteina nad kojim će se vršiti testiranje a zatim i selekcija određenih hemijskih jedinjenja koje pretenduju da budu kandidati za lek. Najuspešniji način za pronalazanje adekvatnog kandidata za lek je ispitivanje interakcije ciljnih proteina sa nasumično odabranim jedinjenjima koje se mogu naći u bazama tzv. bibliotekama jedinjenja. Ove baze obuhvataju do nekoliko miliona jedinjenja sa kojima se ciljni protein testira i kombinuje. Metode koje se koriste za pronalazak leka-kandidata mogu biti virtualni skrining (Virtual screening) ili realni skrining (Real screening) (Yang i sar., 2009; Chandrasekaran i sar., 2021). Nakon sinteze jedinjenja se vrše eksperimenti kojima se utvrđuju toksični i farmakološki efekti jedinjenja, određuje dozvoljena doza primene i proučavaju mogućnosti njegovog potencijalno štetnog dejstva. Ta etapa razvoja leka naziva se pretklinička, traje oko četiri godine i obuhvata farmakodinamičke (za cilj imaju potvrdu o efikasnosti leka), farmakokinetičke (spoznavanje profila leka, pre svega metabolizma i stepen vezivanja leka za protein plazme) i toksikološke studije (potvrda bezbednosti leka). Toksikološka ispitivanja leka su najduža i zahtevaju testiranja nad najvećim brojem živih organizama. Njima se određuje: akutna toksičnost (smrtonosna doza leka), hronična toksičnost, reproduktivna toksičnost, mutagenost, kancerogenost i teratogenost. Pretklinička ispitivanja se obavljaju *in vivo* (eksperimenti na živim organizmima, najčešće životinjama) i *in vitro* (u kontrolisanom okruženju, najčešće na ćelijskim kulturama) (Hughes i sar., 2011).

Ukoliko se prethodne analize pokažu uspešnim, slede klinička istraživanja koja se sastoje iz četiri faze kako bi se testirala bezbednost i efikasnost primene leka nad ljudima. Prve tri faze obuhvataju period koji prethodi uvođenju leka u redovnu medicinsku praksu dok četvrta faza prati lek na tržištu.



Slika 3. Prikaz poređenja klasičnog puta razvoja novog leka i prenamena leka

U prvoj fazi koja uključuje od 25 do 75 zdravih volontera definiše se bezbedna doza i prate se moguća neželjena dejstva budućeg leka na ljude. Faza 1 traje do godinu dana.

Tokom druge faze koja obuhvata par stotina obolelih pacijenata vrši se provera efikasnosti leka na datu bolest. Ispituje se interakcija leka sa hranom, alkoholom, drugim lekovima i njegov uticaj na psihičke, fiziološke i psihomotorne procese. Druga faza je podeljena na 2a u kojoj se definiše opseg doze dok se u 2b ispituje efikasnost doze leka, bezbednost, farmakokinetika i farmakodinamika leka. Ispitivanja traju oko 2 godine. Može obuhvatiti više odvojenih kliničkih ispitivanja gde posle bilo kog može doći do obustave daljih ispitivanja. Do toga dolazi ako se otkrije da lek ne daje željeni efekat (Deore i sar., 2019).

Ako budući lek nije toksičan za ljude i pozitivno deluje na određenu bolest kod ljudi, pristupa se trećoj, poslednjoj i najmasovnijoj fazi kliničke studije, gde se pribavljaju dodatni podaci o sigurnosti i efikasnosti leka. Ovo kliničko istraživanje je veoma skupo, traje od 2 do 4 godine i ne može mu se prognozirati ishod, posebno ako su u pitanju hronične bolesti (Akhondzadeh, 2016).

Neophodno je da novi lek uspešno prođe sve faze ispitivanja pre nego što se stručnjaci uvere u njegov kvalitet i prihvate ga da bude deo novog standardnog lečenja. Zatim sledi registracija i dobijanje dozvole za stavljanje leka u promet (<https://www.fda.gov>).

Četvrta faza je poznata kao postmarketinška faza i ima varijabilno trajanje. U ovoj fazi se kontrolišu razni parametri koji se nisu mogli uzeti u obzir za vreme testiranja (npr. uzimanje leka u trudnoći). Ako se u međuvremenu pronađu opasna neželjena dejstva, lek se može povući sa tržišta.

Poznato je da razvoj novog leka zahteva velika finansijska ulaganja (1.5 do 2 milijarde dolara) i da predstavlja vrlo dug proces (12 do 15 godina). S obzirom na to da samo 1 od 10.000 jedinjenja uspešno prođe sva testiranja i od toga, samo svako treće povratu svoje troškove razvoja (Paul i sar., 2010), primena kraćeg ali ekonomski isplativijeg procesa je prenamena leka.

1.7. Baze podataka i prenamena lekova

1.7.1 Baze podataka

U domenu razvoja novih lekova, baze podataka su od najvećeg značaja s obzirom na to da su osnova za metode prenamene lekova (Masoudi-Sobhazadeh i sar., 2020).

Veliki broj baza je trenutno na raspolaganju sa javno dostupnim podacima, sa svakodnevnom tendencijom rasta njihovog broja. Aktuelne baze se razvijaju autonomno ili su delovi velikih repozitorijuma. Svaka baza je formirana za specifične potrebe, različite je veličine i namene i kao takva od velike je važnosti za istraživačku zajednicu (Abdulganiju i sar., 2016). Mnogi istraživači podatke dobijene iz svojih istraživanja stavljaju u bazu podataka gde ih integrišu sa drugim dostupnim ontološkim podacima i na taj način se baze podataka konstantno ažuriraju (Kern i sar., 2020; Ison, i sar., 2016).

EMBL-EBI je repozitorijum koji pruža pristup sveobuhvatnim i javno dostupnim molekularnim bazama podataka pokrivajući pri tome čitav spektar bioinformatičkog znanja (biološke podatke, supstance, različite hemijske strukture itd.). Najznačajnije baze podataka ovog repozitorijuma su Reactome, UniProt i ChEMBL (Cook i sar., 2019).

Baza podataka ChEMBL ([//www.ebi.ac.uk/chembl](http://www.ebi.ac.uk/chembl)) prvi put objavljena 2011. godine predstavlja široko korišćen resurs koji sadrži informacije o bioaktivnim molekulima sa osobinama sličnim lekovima. Ova baza podataka je razvijena u okviru Evropskog Bioinformatičkog Instituta (EBI) u Velikoj Britaniji koji je deo evropske laboratorije za prirodne nauke (EMBL). ChEMBL je dobro utemeljen resurs u polju otkrivanja lekova i biohemijskih istraživanja. Baza podataka ChEMBL sadrži standardizovane podatke o bioaktivnosti molekulima, targetima i lekovima dobijenih iz više izvora, uključujući literaturu o primarnoj medicinskoj hemiji (Davies i sar., 2015).

Svaki lek u ChEMBL bazi podataka opisan je preko odgovarajućih atributa, koji se odnose na IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) nomenklaturu (hemijske identifikatore jedinjenja kao što su SMILES, InChi i InChiKey), mehanizme delovanja, fizičko-hemijske osobine jedinjenja, itd. Trenutno ChEMBL sadrži oko 12 000 targeta, 1.9 miliona supstanci, 11000 lekova, 4 700 mehanizama, 1.1 milion bioloških testova, 655 tkiva. Analize i jedinjenja u ChEMBL obuhvataju više od 8200 proteina, uključujući 3569 humanih proteina (Masoudi-Sobhazadeh i sar., 2020).

Pored podataka unešenih iz literature, ChEMBL takođe sadrži strukture lekova odobrene od strane Uprave za hranu i lekove (eng. Food and Drug Administration (FDA)). Za svaki unet lek, u bazi podataka nalaze se i informacije o odobrenim proizvodima uključujući njihova komercijalna imena, načine administracije, informacije o doziranju i datumi odobrenja.

Najvažniji tipovi entiteta u ChEMBL-u su dokumenti (iz kojih se izdvajaju podaci), jedinjenja (supstance koje su testirane na njihovu bioaktivnost), eseji (pojedinačni eksperimenti koji su sprovedeni za procenu bioaktivnosti) i targeti (proteini ili sistemi koji se nadgledaju testom). Svaki izdvojen dokument ima listu povezanih složenih zapisa i eseja, koji su povezani aktivnostima (Gaulton i sar., 2011).

Pronalaženje potencijalnih jedinjenja vrši se unošenjem ključne reči, koristeći ime proteina, sinonim ili pristup UniProtu a budući da baza podataka uključuje samo proteinske targete za koje su dostupni

podaci o bioaktivnosti, korisnici takođe mogu da izvrše BLAST pretragu baze ChEMBL sa proteinskom sekvencom od interesa.

Baza podataka ChEMBL pruža i informacije o takozvanom mestu vezivanja (engl. binding site), odnosno lokacijama na biološkoj meti na kojoj se odvija hemijska interakcija sa određenom aktivnom supstancom. Ova informacija je dostupna kroz predikat chembl:BindingSite. Mesto vezivanja se može definisati na različitim nivoima granularnosti (na nivou podjedinice, na nivou proteina i nivou ostatka) i ova karakteristika se koristi da pokaže hemijsku specifičnost za tipove liganda koji se mogu vezati, kao i afinitet - meru jačine hemijske interakcije.

Linked Open Drug Data (LODD) je repozitorijum povezanih skupova podataka koji je kreiran da unapredi proces otkrivanja lekova. On obuhvata nekoliko skupova kao što su DrugBank, LinkedCT, SIDER, DailyMed (Samwald i sar., 2011) (www.w3.org/wiki/HCLSIG/LODD).

DrugBank je sveobuhvatan, slobodno dostupan veb resurs bioinformatičkih / heminformatičkih informacija o lekovima (npr. hemijske, farmakološke i farmaceutske) sa opširnim podacima o biološkim ciljevima (npr. sekvenca, struktura) koji se pojavio 2006.godine (Wishart i sar., 2006). Najnovije online izdanje DrugBank (verzija 5.1.8, dostupna od 3.01.2012) sadrži 14.543 unosa lekova, uključujući 2.687 malih molekula, 131 nutritienta, 1.468 odobrenih bioloških lekova (proteini, peptidi, vakcine i alergeni) i preko 6.654 eksperimentalnih lekova (u fazi otkrića). Pored toga, sadrži 5.253 proteinskih sekvenci (tj. targeta leka / enzima / transportera). Svaki unos sadrži više od 200 polja podataka, pri čemu se polovina podataka odnosi na lekove / hemikalije, a druga polovina namenjena je podacima o lekovima ili proteinima (<https://go.drugbank.com/about>). Ove informacije su ključne za razumevanje farmakokinetike lekova, bioraspoloživosti leka i ADMET karakteristika leka (apsorpcija, distribucija, metabolizam, izlučivanje i toksičnost). DrugBank 5.0 sadrži podataka o kliničkim i predkliničkim ispitivanjima lekova. Svake godine se velikom broju odobrenih lekova dodeljuju nove indikacije u bazi Drugbank koje su nastale kao rezultat prenamene lekova (Wishart i sar., 2018).

Ključna karakteristika koja razlikuje DrugBank od ostalih on-line baza lekova je njegova široka podrška pretraživanju podataka. DrugBank nudi lokalnu BLAST (Altschul i sar., 1997) pretragu koja podržava pojedinačne i višestruke unose sekvenci, logičko pretraživanje teksta koristeći GLIMPSE (Manber i Bigot, 1997), uslužni program za pretragu hemijske strukture i alat za relaciono izvlačenje podataka (Sundararaj i sar., 2004).

PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) je baza podataka hemijskih molekula pri Nacionalnoj Medicinskoj Biblioteci (NLM), koja je u okviru američkog Nacionalnog Instituta za Zdravlje (NIH). To je najveća baza slobodno dostupnih hemijskih informacija o fizičko-hemijskim svojstvima molekula, biološkoj aktivnosti, o njihovoj bezbednosti i toksičnosti, sadrži podatke o patentima, citate iz literature, itd (Kim i sar., 2021). PubChem predstavlja ključni izvor informacija za biomedicinska istraživanja u mnogim oblastima kao što su heminformatika, biohemija i otkrivanje lekova. Takođe, ova baza je važan izvor velike količina podataka (eng. big data) u mašinskom učenju, virtuelnom skriningu, prenameni lekova, predviđanju hemijske toksičnosti, predviđanju neželjenih efekata lek i identifikaciji metabolite (Kim i sar., 2021).

1.7.2. Prenamena lekova

Zadnjih par godina, vrlo popularan pristup u otkrivanju lekova koji omogućava brzo pronalaženje efikasne terapije je prenamena, pri čemu se za odobrene lekove predlaže nova indikacija (repozicioniranje lekova) (Mercorelli i sar., 2018). Ovaj pristup u razvoju novih lekova ima finansijsku prednost u odnosu na uobičajeni pristup pošto značajno skraćuje postupak za kliničko ispitivanje koje je neophodno izvršiti da bi lek bio odobren.

Uprava za hranu i lekove (eng. Food and Drug Administration – FDA) u Sjedinjenim Državama je u period od 2012. do 2017. godine odobrila samo 12 novih antivirusnih lekova od kojih je 8 namenjeno za lečenje infekcije izazvane virusom hepatitisa C (HCV) a 2 leka za lečenje HIV-a (www.fda.gov). Ono što zaostaje a na čemu se intenzivno radi je adekvatna terapija za viruse koje karakteriše pandemijski potencijal poput Zika virusa (ZIKV), virusa ebole (EBOV) i koronavirusa (Bliskoistočni respiratorni sindrom „Middle East Respiratory Syndrome“ (MERS-CoV)).

Zavisno od informacija koje su na raspolaganju, postoje tri načina da se za odobrene lekove predloži nova indikacija (Mercorelli i sar., 2018):

1. Isti target - novi virus. Jedna od opcija je kada antivirusni lek za koji se zna da cilja specifičnu virusnu ili ćelijsku funkcija / put poseduje aktivnost protiv drugih virusa.
2. Isti target - nova indikacija. Ovo se dešava kada se farmakološka meta (protein ili put koji se može modulirati odobrenim lekom) pokaže bitna u patogenom procesu povezanom sa virusnom infekcijom. U ovom slučaju, odobreni lek se može iskoristiti i kao antivirusno terapijsko sredstvo (nova indikacija).
3. Novi target - nova indikacija. To se dešava kada se odobrenom leku sa utvrđenom bioaktivnošću za određeni put/mehanizam nađe novi molekularni target koji je neophodan za replikaciju virusa.

Lekovi koji imaju potencijal prenamene protiv virusnih bolesti većinom su identifikovani pretraživanjem molekularnih biblioteka koje se sastoje od lekova, kako odobrenih, tako i onih koji su još u fazi ispitivanja kao i drugih jedinjenja poznate bioaktivnosti, uključujući i selekciju prirodnih proizvoda koji imaju terapijski potencijal (McKimm-Breschkin i sar., 2018).

Prenamena lekova predstavlja najefikasniju strategiju za iznalaženje novih lekova za mnoge virusne bolesti, uključujući i grip. U toku su dva klinička ispitivanja sa repozicioniranim lekovima za grip: (1) ispitivanje (faza 2b/3 kliničkog ispitivanja) u kome se kombinuje klaritromicin i naproksen zajedno sa oseltamivrom u kombinaciji trostrukog leka i (2) ispitivanje efikasnosti antiparazitskog leka nitazoksanida protiv virusa gripa (faza 3) (Krátký i Vinšová, 2011; Mercorelli i sar., 2018).

2. Cilj rada

1. Određivanje bioinformatičkog kriterijuma za *in silico* pretraživanje molekularnih biblioteka u cilju identifikacije kandidata za lekove dvostrukih inhibitora M2 jonskog kanala WT influence A virusa i virusa koji su rezistentni na amantadin sa mutacijom S31N u proteinu M2.
2. Određivanje potencijalnih kandidata za dvostruke inhibitore M2 jonskog kanala (WT i S31N mutanta) influence A pretraživanjem baze odobrenih lekova DrugBank primenom predloženog bioinformatičkog kriterijuma za odabir lekova u kombinaciji sa hemoinformatičkim metodama virtuelnog skrininga molekula.
3. Ispitivanje antivirusne aktivnosti u *in vitro* eksperimentima predloženih najboljih kandidata na osnovu *in silico* kriterijuma za selekciju za inhibitore M2 jonskog kanala (WT i S31N mutanta) influence A

3. Materijal i metode

3.1. Virtuelni skrining molekularnih biblioteka zasnovan na deskriptorima AQVN i EIIP

Razvoj lekova je složen, skup i dugotrajan proces. Ovaj proces je takodje rizičan jer se procene konačne stope uspešnog razvoja leka, zavisno od terapijske klase, kreću između 12% i 33% (DiMasi, 2001). Analiza 68 nasumično odabranih lekova pokazala je da troškovi istraživanja i razvoja po novom odobrenom leku iznose više od 2 milijarde \$ (DiMasi i sar., 2003).

U poslednjih 25 godina, otkrivanje i razvoj lekova praćeni su intenzivnim razvojem informacionih tehnologija koje su postale nezaobilazni deo ovih procesa koji počinju osnovnim istraživanjem a završavaju se proizvodnjom leka za određenu bolest. Rezultati studija su pokazali da uključivanje računarskih tehnika u razvoj lekova (docking studije, hemoinformatičke i bioinformatičke analize) smanjuje troškove ovog procesa do 50% (Augen, 2002). Informatički alati, koji analiziraju jačinu interakcije između liganda i terapijskog targeta, predstavljaju značajane tehnologije za skeniranje molekularnih baza radi selekcije molekula koji predstavljaju kandidate za lekove. Poslednjih godina virtuelni skrining (VS) postao je nezaobilazna faza u razvoju novih lekova.

Glavne prednosti VS su (i) niski troškovi (nije potrebna prethodna nabavka hemijskih jedinjenja za testiranje), (ii) mogućnost istraživanja jedinjenja koja još nisu sintetizovana, i (iii) smanjenje početnog broja jedinjenja pre njihovog eksperimentalnog testiranja, koje je po pravilu skupo i dugotrajno.

U savremenom procesu otkrivanja lekova koriste se sledeće metode virtuelnog skrininga: (i) strukturni VS koji se zasniva na strukturnoj kompatibilnosti između liganda i potencijalnog mesta vezivanja liganda na ciljnom molekulu, (ii) VS na bazi liganda koji omogućava identifikacija najefikasnijeg biološki aktivnog molekula koristeći strukturnu ili topološku sličnost sa terapijskim targetom, (iii) tehnike mašinskog učenja koja uključuje nekoliko tehnika neuronskih mreža, (iv) algoritmi za mašinsko učenje poput genetičkih algoritama i (v) virtuelne kombinatorne biblioteke koje omogućavaju primenu odgovarajućih selekcionih tehnika za svođenje velikih molekularnih biblioteka na manje podskupove jedinjenja za fizičku sintezu i biološka ispitivanja.

Nije uvek lako pratiti biološku aktivnost jedinjenja do određenog terapijskog cilja, jer je neophodno uzeti u obzir brojne faktore koji igraju važnu ulogu u aktiviranju leka. Ovo je razlog što računski tretman budućeg leka još uvek ne daje pouzdanu informaciju o njegovoj krajnjoj efikasnosti. Da bi se u analizu uključio veći broj faktora koji utiču na biološku aktivnost molekula, VS treba da sadrži različite molekularne deskriptore koji opisuju fizičko-hemijska i strukturna svojstva molekula. Nedavno su Todeschini i Consonni sakupili i opisali 3300 molekularnih deskriptora (Todeschini i Consonni, 2009). Svi ovi deskriptori se odnose na molekularna svojstva koja utiču na međumolekulske interakcije koje se dešavaju na rastojanjima $<5\text{\AA}$, sa izuzetkom srednjeg kvazi-valentnog broja (eng. average quasi-valence number, AQVN) i potencijala elektron-jon interakcije (eng. electron-ion interaction potential, EIIP). Ova dva molekularna deskriptora odgovaraju fizičkim osobinama koje karakterišu dugodosežne interakcije (interakcije na rastojanjima između 5 i 100 Å) između bioloških molekula.

3.2. Koncept dugodosežnih međumolekulskih interakcija u biološkim sistemima

Teorija „ključa i brave“ („key and lock“), koju je prvobitno predložio Emil Fischer 1894. godine, zajedno sa teorijom sudara, predstavlja osnovnu za sadašnje razumevanje međumolekularnih interakcija u biološkim sistemima. Ako se proteini posmatraju kao sfere poluprečnika 18 Å (tipično za mali protein), i ako se te sfere povezuju u jednoj dodirnoj tački, konstanta brzine hemijske reakcije koja je ograničena difuzijom, izračunata prema jednačini Smoluchovskog (Smoluchowski, 1917), iznosi $7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Pri tome se uzima u obzir da privlačne sile uključene u prepoznavanje i vezivanje molekula obuhvataju isključivo slabe nekovalentne sile. Iz tog razloga, pre nego što dođe do stvaranja hemijske veze, molekularni regioni koji međusobno reaguju moraju biti postavljeni dovoljno blizu (na rastojanju $< 5 \text{ Å}$) pri čemu atomi koji ostvaruju direktni kontakt moraju biti u odgovarajućoj orijentaciji koja je pogodna za reakciju koja sledi. Kao posledica ovih ograničenja, mesto vezivanja proteina predstavlja samo mali deo ($< 0,1\%$) od njegove ukupne površine. Uzimajući u obzir ovo ograničenje, konstanta brzine vezivanja koja je limitirana „slučajnom difuzijom“ i izračunata prema jednačini Smoluchovskog (X) je $\sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ za protein-ligand interakciju i $\sim 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ za protein-protein interakciju. Uzimajući u obzir protein-protein interakcije u različitim biološkim sistemima, procenjeno je da se međusobno vezivanje bioloških molekula uglavnom dešava brzinama koje su 103 do 104 puta brže nego što bi se očekivalo na bazi ovog teorijskog razmatranja (Chapeville i Haenni, 1980). Neke reakcije su čak značajno brže nego što predviđa 3D model „slučajne difuzije“. Klasičan primer je superoksid dismutaza koja ima katalitičku konstantu brzine od $\sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, iako aktivno mesto na proteinu predstavlja samo 0,1% njegove površine (Sharp i sar., 1987).

Da bi se objasnio nesklad između teoretski procenjenih vrednosti i stvarnih vrednosti konstante brzine za međumolekulske interakcije u biološkim sistemima, predloženo je nekoliko modela (npr. smanjenje dimenzionalnosti difuzije (Wiegel i DeLisi, 1982; McCloskey i sar., 1986; Peters, 2005) protein-protein interakcija zasnovana na hidrodinamičkom usmeravanju (Brune i Kim, 1994) protein-protein interakcija posredovana desolvacijom (Camacho i sar., 2000) itd.

Polazeći od vrlo opštih teorijskih razmatranja, fizičar Fröhlich je predložio mehanizam po kome se interakcije između bioloških molekula u polarnom medijumu, uključujući vodu i lipide, zasnivaju na dipolnim vibracijama koje dovode do selektivnih privlačnih sila dugog dometa koje deluju na rastojanjima veće od jedne linearne dimenzije makromolekula (102 – 103 Å) (Fröhlich, 1968; Fröhlich, 1970; Fröhlich, 1975). Ove privlačne sile povećavaju broj produktivnih sudara molekula u interakciji u poređenju sa njihovim slučajnim sudarima. Fröhlichov koncept dugodosežnih međumolekulskih interakcija dopunjuje Fišerov koncept „ključ i brava“ koji se odnosi na kratkodosežne međumolekulske interakcije. Uzimajući u obzir oba ova koncepta, može se zaključiti da međumolekulska interakcija u biološkom sistemu uključuje dva koraka: (i) selektivno prepoznavanje i privlačenje između dva molekula koje se ostvaruje na rastojanjima između 100 i 1000 Å i (ii) hemijsko vezivanje između molekula koji uključuje slabe polarne sile koje deluju na rastojanju $< 5 \text{ Å}$. Shodno tome, terapijski molekul leka treba da bude u stanju da prepozna specifični terapijski cilj na udaljenosti od 100 do 1000 Å i nakon toga ga efikasno veže. Svaki od ova dva koraka pojedinačno predstavlja potreban ali ne i dovoljan uslov da terapijski molekul bude efikasan. Potencijalni lek koji je odabran samo na osnovu strukturne komplementarnosti sa terapijskim ciljem, ali bez podataka o „adresi“ koji mu omogućavaju prepoznavanje ovog cilja na udaljenosti većoj od 5 Å, ne može biti efikasan.

Predloženo je da molekularni deskriptori AQVN i EIIP, koji predstavljaju osnovne karakteristike delokalizovanih elektrona u molekulu, određuju svojstva bioloških molekula koja su odgovorna za njihove dugodosežne interakcije (Veljkovic, 1980). Vrednost deskriptora EIIP za organske molekule definisana je sledećom jednostavnom jednačinom izvedenom iz „opšteg modelnog pseudopotencijala“ (Veljkovic i Slavic, 1972; Veljkovic, 1973; Veljkovic i Lalovic, 1973):

$$EIIP = 0.25Z^* \sin(1.04\pi Z^*) / 2\pi \quad (1)$$

gde je Z^* srednji kvazivalentni broj (AQVN) koji je definisan jednačinom

$$Z^* = \sum m_i n_i Z_i / N \quad (2)$$

gde je Z_i valentni broj i -te atomske komponente, n_i broj atoma i -te komponente, m broj atomskih komponenata u molekulu, a N ukupan broj atoma u molekulu. EIIP vrednosti izračunate prema jednačinama (1) i (2) su date u Ridberzima ($Ry = 13.6 \text{ eV}$). Veza između molekularnih deskriptora EIIP i AQVN organskih molekula i njihove biološke aktivnosti (mutagenost, kancerogenost, toksičnost, antibiotska, citostatska i anti-HIV aktivnost, itd.) ranije je ustanovljena (Veljkovic i Lalovic, 1976; Veljkovic i Lalovic, 1977; Veljkovic i Lalovic, 1978; Ajdacic i Veljkovic, 1978; Veljkovic i Ajdacic, 1978; Seifert i sar., 2003; Veljkovic i sar., 2007; Tintori i sar., 2007). Pokazano je da na ove aktivnosti, koje su uslovljene sposobnošću molekula ili njegovih metabolita da se kovalentno ili nekovalentno vežu za različite unutar-ćelijske i van-ćelijske proteine, takođe utiču elektronska svojstva molekula reprezentovana deskriptorima EIIP i AQVN, koji određuju njihove dugodosežne interakcija. Ova dva molekularna deskriptora ne zavise od strukture molekula (jednačine (1) i (2)) što sugerise da su procesi prepoznavanja i međusobnog navođenja interreagujućih bioloških molekula na velikoj udaljenosti takođe strukturno nezavisni.

Analiza 45,010.644 jedinjenja iz molekularne baze PubChem pokazala je da se vrednosti molekularni deskriptora za 92.5% ovih jedinjenja nalaze u intervalima (0.00-0.11 Ry) za EIIP i (2.4-3.3) za AQVN. Ovaj deo EIIP/AQVN prostora, u kome se nalazi najveći broj poznatih hemijskih jedinjenja, okarakterisan je kao „osnovni EIIP/AQVN hemijski prostor“ (Veljkovic i sar., 2011). Pokazano je da vrednosti ovih molekularnih deskriptora računata za različite klase lekova formiraju klastere u EIIP/AQVN prostoru koji su specifični za svaku pojedinačnu klasu terapijskih molekula. Ovi domeni su korišćeni kao filteri u VS-u molekularnih biblioteka pri određivanju potencijalnih lekova za različite bolesti SIDA (Veljkovic i sar., 2011; Maga i sar., 2013; Veljkovic i sar., 2012), bakterijske infekcije (Veljkovic i sar., 2016), Ebola (Veljkovic i sar., 2015), Lešmanija (Stevanovic i sar., 2019), malarija (Veljkovic i sar., 2015), rak (Veljkovic i sar., 2016)). U Tabeli 1 dat je primer EIIP/AQVN domena koji odgovaraju različitim klasama lekova za lečenje SIDE (Veljkovic i sar., 2011).

Tabela 1. EIIP/AQVN kriterijum za selekciju kandidata za anti-HIV lekove virtuelnim skriningom molekularnih biblioteka (Veljkovic i sar., 2011).

Target	AQVN	EIIP [Ry]
CXCR4	2.16 – 2.53	0.062 – 0.096
CCR5	2.42 – 2.63	0.079 – 0.099
PI	2.61 – 2.78	0.040 – 0.080
NRTI/NtRTI	2.92 – 3.20	0.040 – 0.100
INI	3.00 – 3.20	0.044 – 0.116
Anti-HIV flavonoidi	3.34 – 3.59	0.110 – 0.135

U ovom radu EIIP/AQVN filter je korišćen za VS baze GenBank u cilju selekcije odobrenih lekova koji bi se pored njihove osnovne terapijske namene mogli koristiti i za lečenje infekcije virusom gripa.

Za pretragu kandidata - inhibitora M2 kanala influence A je učitano 2627 odobrenih lekova, malih organskih molekula iz DrugBank baze (<http://www.drugbank.ca>). Da bi se definisao kriterijum za

izbor kandidata za inhibitore M2 kanal, skup za učenje je prvobitno ubrojao sva jedinjenja iz ChEMBL baze za koja je izmerena aktivnosti za dati M2 kanal (šifra targeta ChEMBL613740). Dalje, sužavanjem kriterijuma, skup je sveden na podatke o jedinjenjima za koje je određena aktivnost na divljem tipu (WT) i mutantu S31N, uz odgovarajuće IC₅₀ vrednosti. Ukupan broj prijavljenih inhibitora M2 kanala u skupu za učenje je tako iznosio 49. Nakon uklanjanja duplikata i jedinjenja koja nisu pokazivala aktivnost, konačni broj jedinjenja je bio sveden na 15 jedinjenja aktivnih na WT i 11 jedinjenja aktivnih na mutant S31N (Dodatne tabele 2, 3). Protokol virtuelnog skrininga (VS) je obuhvatio primenu naknadnih filtera za odabir dvostrukih inhibitora M2 jonskog kanala. U prvom koraku filtriranja su korišćeni EIIP/AQVN deskriptori, a zatim strukturno zasnovani virtuelni skrining.

3.3. Strukturno zasnovan VS

Da bi se izabrala jedinjenja – kandidati iz Drugbank-a, jedinjenja iz skupa za učenje i kandidati su pretvoreni u trodimenzionalni (3D) sdf format iz SMILES formata. Izračunati su GRIND deskriptori molekula, koji su zasnovani na poljima molekulskih interakcija (MIF) (Durán i sar., 2009). Na osnovu njihovih vrednosti je izrađen statistički model na osnovu dobijenih varijabli, koje predstavljaju interakciju dve probe – tačke na površini molekula. Probe za mapiranje interakcionih regiona molekula su bile DRY (hidrofobne interakcije), O (akceptor vodonične veze), N1 (donor vodonične veze) i TIP (deskriptor molekulskog oblika). Na osnovu unesenih varijabli, izvršena je analiza glavnih komponenti (eng. Principal Component Analysis, PCA). Broj glavnih komponenti u PCA je bio podešen na vrednost 5. Objašnjena varijansa tako dobijenog statističkog modela za prve 2 glavne komponente je iznosila 58,84%. U tako dobijenoj dvodimenzionalnoj projekciji prve dve glavne komponente, PC1 i PC2, merenjem Euklidskog rastojanja kandidata od centroida skupa za učenje je izvršen odabir kandidata. Svi računi su izvedeni u softveru Pentacle 1.06 za Linux.

3.4. Molekulsko dokovanje

3.4.1. Priprema receptora

Kristalne strukture divljeg tipa M2 kanala i S31N mutanta su preuzete iz baze podataka RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) sa PDBID šiframa 2KQT (Cady i sar., 2010) i 2LY0 (Wang i sar., 2013). Svi ligandi, joni i molekuli vode su uklonjeni iz kristalnih struktura. Na atome proteina su dodati atomi vodonika, a zatim su isti svedeni na samo polarne atome vodonika. Receptor je pripremljen u programu ADT Tools 1.5.6 (Sanner, 1999; Morris i sar., 2009).

3.4.2. Priprema liganada

Ligandi su pretvoreni iz 3D sdf u mol2 format i uvezeni u softver Avogadro, kako bi bili protonovani na fiziološkoj pH vrednosti. Molekuli su pripremljeni za MOPAC 2016 (Stewart, 2016) i geometrijski optimizovani na nivou teorije PM7 (Stewart, 2013). Dalje su bili pripremljeni za molekulski doking u u softveru ADT Tools 1.5.6. (Sanner, 1999; Morris i sar., 2009).

3.4.3. Molekulsko dokovanje

Kutija dimenzija $24 \times 24 \times 24$ Å je postavljena u središte vezivnog mesta proteina receptora. Rezolucija računa je podešena na vrednost 50. Molekulski doking je izveden u programu Autodock Vina (Trott i Olson, 2010).

3.5. Testiranje antivirusne aktivnosti lekova

Testiranje antivirusne aktivnosti lekova je urađeno u saradnji sa Nacionalnom laboratorijom za predkliničke studije i Nacionalnom BSL3 laboratorijom Instituta za humane infekcije i imunitet u Galvestonu, Univerzitet u Teksasu, SAD.

Antivirusna aktivnost repozicioniranih lekova iz baze DrugBank koji su selektovani bioinformatičkim i hemoinformatičkim VS je testirana protiv pandemijskog pH1N1 virusa i H3N2 sezonskog virusa gripa *in vitro* u kulturi bubrežnih ćelija psa (eng. Madin-Darby canine kidney (MDCK)). MDCK je najčešće korišćena ćelijska linija za ispitivanje antivirunog delovanja lekova protiv gripa i podložna je infekciji različitim sojevima gripa (Gaush i Smith, 1968; Takeda i sar., 2002). MDCK ćelije korišćene u ovoj studiji uzgajane su u odgovarajućem preporučenom medijumu za rast i održavane na $+37^\circ\text{C}$ u 5% CO_2 . Analiza svih uzoraka rađena je u triplikatu.

Korišćena su sledeći sojevi virusa gripa: A/CA/07/2009 (H1N1), za proveru antivirusne aktivnosti gvanetidina i A/CA/07/2009 (H1N1) i A/New York/55/04 (H3N2) za proveru efikasnosti cikrimina.

3.5.1. *In vitro* ispitivanje efikasnosti gvanetidina protiv H1N1 virusa gripa

Virus gripa A / CA / 07/2009 (H1N1) je prethodno pretretiran sa 1, 10 i 100 μM gvanetidina i inkubiran na 37°C tokom 1 sata. Bunarići za pozitivnu kontrolu pripremljeni su pretretmanom virusa gripa A / CA / 07/2009 (H1N1) sa 10 μM merimepodibom. Zatim su MDCK ćelije zaražene u triplikatu smešom virusa A/CA/07/2009 (H1N1) i gvanetidina. Posle ~ 1 h inkubacije na 37°C i 5% CO_2 , ćelije su isprane sa medijumom bez seruma i zatim je dodato u ćelije 1, 10 ili 100 μM gvanetidina. Bunari sa virusnim kontrolama kao i netretirani kontrolni bunari su rađeni u triplikatu. Ćelije su inkubirane na 37°C i 5% CO_2 , a uzorci su sakupljeni 0, 1, 2 i 3 dana nakon infekcije. Uzorci su čuvani na -80°C do dana analize. Titar virusa gripa u ćelijama MDCK putem TCID50 kvantifikovan je za svaki uzorak prikupljen 0, 1 i 2 dana nakon infekcije.

Titar virusa izražen je infektivnom dozom kulture tkiva TCID50 (eng. Tissue Culture Infective Dose 50) koji odgovara najvećem razblaženju virusne suspenzije koje izaziva pojavu citopatogenog efekta CPE u 50% ćelija inokulisanih ćelijskih kultura.

3.5.2. *In vitro* ispitivanje efikasnosti cikrimina protiv H1N1 i H3N2 virusa gripa

Virus gripa A / CA / 07/2009 (H1N1) je najpre pretretirani sa 1, 10 i 100 μM cikrimina i inkubirani na 37°C tokom 1 sata. Bunarići za pozitivnu kontrolu pripremljeni su pretretmanom virusa gripa A / CA / 07/2009 (H1N1) sa 10 μM merimepodiba. Isti postupak je ponovljen i sa A/New York/55/04 (H3N2) virusom. MDCK ćelije su isprane dva puta sa medijumom bez seruma a zatim su u triplikatu zaražene sa smešom virusa A / CA / 07/2009 (H1N1) i cikrimina ili mixom A/New York/55/04 (H3N2) i cikrimina. Posle ~ 1 h inkubacije na 37°C i 5% CO_2 , ćelije su dva puta isprane sa medijumom bez seruma i u ćelije je i zatim je dododato 1, 10 ili 100 μM cikrimina. Tri bunara su

korišćena kao negativna kontrola i nisu bili tretirani a tri bunara su služila kao kontrola virusa i bila su zaražena. Kontrolni bunarčići nisu tretirani. Bunari sa virusnim kontrolama kao i netretirani kontrolni bunari su rađeni u triplikatu. Čelije su inkubirane na 37 ° C i 5% CO₂, a uzorci su sakupljeni 8, 12,16,24 i 48 sati nakon infekcije. Uzorci su čuvani na -80 ° C do dana analize. Svaki uzorak prikupljen u različitim vremenskim intervalima razblažen je u odnosu 1:10 i koristio se za inokulaciju ćelija čija je konfluentnost bila ~85-95% , na ploči sa 12 bunarića kako bi se kvantifikovao titar virusa pomoću TCID₅₀ eseja. Kriva rasta za svaki virus je nacrtana na osnovu pojedinačnog titra za svaki uzorak prikupljen 24 i 48 sati nakon infekcije.

3.5.2.1 Određivanje citotoksičnosti cikrimina

Analiza održivosti luminiscentnih ćelija (Promega, SAD) korišćena je za određivanje citotoksičnosti cikrimina. Ova metoda određuje broj održivih ćelija u kulturi zasnovanoj na kvantifikacije nivoa ATP, što signalizira prisustvo metabolički aktivnih ćelija. Količina ATP je direktno proporcionalna broju metabolički aktivnih ćelija prisutnih u kulturi.

Postupak se sastoji od zasejavanja MDCK ćelija na ploče sa 96 bunara, koje se uzgajaju 24 sata, a zatim inkubiraju sa serijski razblaženim jedinjenjem. Ploče se sakupljaju u naznačeno vreme i tretiraju u skladu sa uputstvima proizvođača.

Cikrimin, koji se isporučuje u obliku bele čvrste supstance, dobijen je od United States Biological.

Pripremljeno je 20 mM štok rastvora cikrimina u DMSO koji je skladišten na -20° C. Zatim je cikrimin razblažen u medijumu bez seruma da bi se postigle finalne koncentracije za esej a finalna koncentracija DMSO je bila jednaka ili niža od 0,5%.

Virus gripa A/CA/07/2009 (H1N1) je tretiran sa 10 µM ili 30 µM cikrimina i inkubiran na 37 ° C tokom 1 sata. Isto je urađeno i sa A/New York/55/04 (H3N2) virusom. Na ploči sa 12 bunara se nalaze konfluentne (~85-95%) MDCK ćelije koje su isprane dva puta sa medijumom bez seruma a zatim su zaražene smešom virusa A (H1N1) i cikrimina ili A (H3N2) i cikrimina. Rađeno je devet ponavljanja za svaku testiranu grupu. Posle ~ 1 h inkubacije na 37 ° C i 5% CO₂, ćelije su dva puta isprane sa medijumom bez seruma i u ćelije je 10 µM ili 30 µM cikrimina. Tri bunara su korišćena kao negativna kontrola i nisu bili tretirani a devet bunara su služila kao kontrola virusa i bila su zaražena. Kontrolni bunarčići nisu tretirani. Čelije su inkubirane na 37 ° C i 5% CO₂, a uzorci su sakupljeni 8, 12,16 i 24 sati nakon infekcije. Uzorci su čuvani na -80 ° C do dana analize. Svaki uzorak prikupljen u različitim vremenskim intervalima razblažen je u odnosu 1:10 i koristio se za inokulaciju ćelija čija je konfluentnost bila ~85-95% , na ploči sa 96 bunarića kako bi se kvantifikovao titar virusa pomoću TCID₅₀ eseja.

Kriva rasta za svaki virus je nacrtana na osnovu pojedinačnog titra za svaki uzorak prikupljen 8, 12, 16 i 24 sata nakon infekcije.

4. Rezultati

Primena eksperimentalnih pristupa *in vitro* i *in vivo* u prenameni lekova za skrining velikih biblioteka lekova je dugotrajan i skup proces. Ukoliko se primeni *in silico* pristup za skrining molekularnih biblioteka zasnovan na molekulskim deskriptorima AQVN i EIIP, parametrima koji određuju dugodosežne interakcije između bioloških molekula, značajno se smanjenje broj jedinjenja koja bi trebalo testirati *in vitro* i *in vivo* a takođe se ubrzava proces prenamene lekova. (Veljkovic i sar.,2013; Veljkovic i sar., 2007; Veljkovic i sar., 2007; Veljkovic i sar., 2011; Mage i sar.,2013). Rezultati ranijih *in silico* studija primenjenih na različite infektivne bolesti (HIV, Ebola, malarija, bakterijske infekcije) su pokazali da mali molekuli sa sličnim vrednostima AQVN i EIIP uspostavljaju interakcije sa zajedničkom terapijskom metom (Veljkovic i sar.,2007; Veljkovic i sar., 2011; Veljkovic i sar., 2015). Rezultati ovih studije su omogućili uspostavljenje kriterijuma za virtuelni skrining molekularnih biblioteka za jedinjenja sa sličnim terapijskim svojstvima (Veljkovic i sar.,2007; Veljkovic i sar., 2011; Mage i sar.,2013; Veljkovic i sar., 2012; Tintori i sar., 2010).U studijama koje su istraživale anti HIV jedinjenja i antibiotike pokazano je da svaka klasa ovih jedinjenja zauzima domen hemijskog prostora predstavljen sa dva navedena hemijska deskriptora (Veljkovic i sar., 2011).

4.1. Određivanje EIIP/AQVN bioinformatičkog kriterijuma

Prvi korak u uspostavljanju teorijskog kriterijuma baziranog na EIIP/AQVN molekulskim deskriptorima, za brzo virtuelno (*in silico*) pretraživanje molekularnih biblioteka u cilju identifikacije kandidata za lekove koji su dvostruki inhibitori M2 jonskog kanala virusa influence tipa A - virusa divljeg tipa (engl. wild type, WT) i virusa sa mutacijom u proteinu M2 koji su rezistentni na amantadin, je određivanje domena u EIIP/AQVN prostoru u kome se nalaze inhibitori za koje je eksperimentalno utvrđena antivirusna aktivnost. U ovu svrhu je formiran skup za učenje (eng. learning set) u koji su uključeni svi inhibitori M2 proteina za koje su deponovani eksperimentalni podaci u bazi ChEMBL Target Report Card (<https://vqv.ebi.ac.uk/chembl/target/inspect/CHEMBL613740>) (EMBL-EBI. ChEMBL). Formirani skup za učenje se sastoji iz dva dela: (i) inhibitora M2 jonskog kanala virusa influence tipa A - WT virusa koji uključuje 15 jedinjenja, i (ii) inhibitora S31N mutanta M2 jonskog kanala virusa influence A u kome se nalazi 11 jedinjenja (tabele 2 set za učenje M2WT i dodatna tabela 3 set za učenje M2 S31N).

Vrednosti EIIP/AQVN za inhibitore iz ova dva skupa su izračunate korišćenjem softvera Formula kalkulator iz EIIP/ISM softverske platforma (Perović, 2013), razvijene u Institutu Vinča.

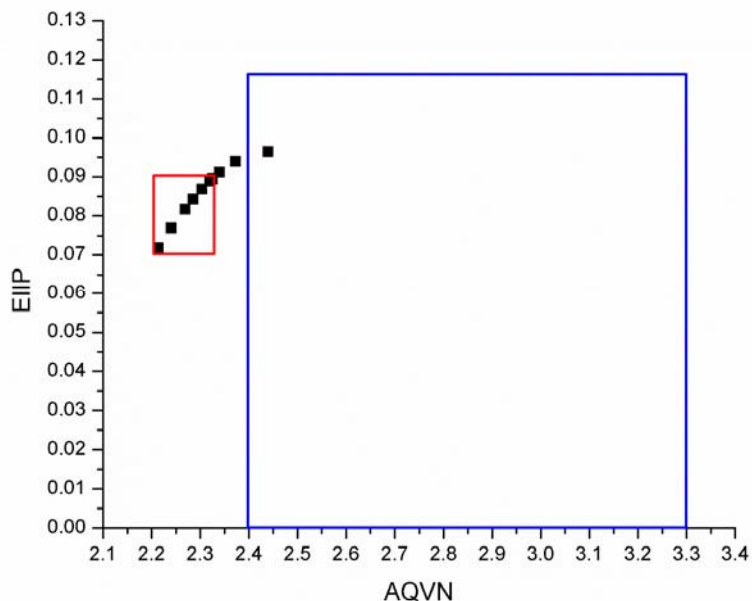
Tabela 2. Set za učenje M2WT

CMPD_CHEMBLID	Formula	AQVN	EIIP
CHEMBL3764303	C17H29N3	2.28571	0.084255
CHEMBL3764131	C15H25N3	2.32558	0.089523
CHEMBL3764858	C17H27N3	2.34043	0.091131
CHEMBL3763849	C17H29N3	2.28571	0.084255
CHEMBL3764014	C16H27N3	2.30435	0.086885
CHEMBL3764314	C20H33N3	2.28571	0.084255
CHEMBL3764975	C20H27N3	2.44	0.096408
CHEMBL3765730	C18H31N3	2.26923	0.081697
CHEMBL3764043	C18H31N3	2.26923	0.081697
CHEMBL3763716	C18H31N3	2.26923	0.081697
CHEMBL3765636	C20H35N3	2.24138	0.07691
CHEMBL3763447	C15H25N3	2.32558	0.089523
CHEMBL3764482	C23H33N3	2.37288	0.093931
CHEMBL3764590	C18H29N3	2.32	0.088868
CHEMBL660	C10H17N	2.21429	0.071739

Tabela 3. Set za učenje S31N

CMPD_CHEMBLID	Formula	AQVN	EIIP
CHEMBL3764303	C17H29N3	2.28571	0.084255
CHEMBL3764314	C20H33N3	2.28571	0.084255
CHEMBL3765636	C20H35N3	2.24138	0.07691
CHEMBL3764043	C18H31N3	2.26923	0.081697
CHEMBL3764975	C20H27N3	2.44	0.096408
CHEMBL3764590	C18H29N3	2.32	0.088868
CHEMBL3765170	C16H27N3	2.30435	0.086885
CHEMBL3763716	C18H31N3	2.26923	0.081697
CHEMBL3764482	C23H33N3	2.37288	0.093931
CHEMBL3764655	C17H27N3	2.34043	0.091131
CHEMBL3764131	C15H25N3	2.32558	0.089523

Analizom vrednosti datih u Tabelama 2 i 3 utvrđeno je da se vrednosti deskriptora AQVN i EIIP za 80% analiziranih inhibitora M2 proteina nalaze u domenu (2,21–2,32) i (0,071– 0,089 Ry).



Slika 4. Šematski prikaz EIIP/AQVN kriterijuma za odabir kandidata M2 inhibitora. Zajednički domen aktivnih jedinjenja i za WT i za S31N M2 (crveno) sa AQVN (2.21–2.32), EIIP (0.071–0.089). Hemijski prostor (plavi) sa AQVN (2,40–3,30) EIIP (0,000–0,116) —EIIP / AQVN domen homologne distribucije > 90% jedinjenja iz baze podataka PubChem Compound Database.

EIIP/AQVN opseg zajedničkog aktivnog domena za dvojne inhibitore WT/ S31N M2 influence A u kome se nalazi više od 80% jedinjenja inhibitora WT M2 jonskog kanala virusa influence i 83% inhibitora mutiranih jonskih kanala M2 S31N iz skupa za učenje usvojen je kao kriterijum za *in silico* odabir jedinjenja koja predstavljaju kandidate za dvostruke inhibitore M2 WT i S31 rezistentnih na amantadin (slika 4).

4.2. Odabir lekova iz baze DrugBank

Ovaj kriterijum je korišćen kao filter pri skriningu baze odobrenih lekova u cilju identifikacije kandidata za lekove koji su dvostruki inhibitori M2 jonskog kanala virusa influence tipa A - WT (virusa divljeg tipa) i virusa koji su rezistentni na amantadin sa mutacijom u proteinu M2. Za pretragu kandidata za dvojne inhibitore M2 jonskog kanala virusa influence A je analizirano 2627 odobrenih lekova, malih organskih molekula iz DrugBank baze (<http://www.drugbank.ca>). Za svaki od ovih lekova izračunate su AQVN i EIIP vrednosti.

Primenom EIIP/AQVN filtera za selekciju dvostrukih inhibitora proteina M2 WT i M2 S31N influence A od 2.627 odobrenih lekova iz DrugBank-a (<http://www.drugbank.ca>) (Wishart i sar., 2008) odabrano je 39 lekova (Tab. 4).

Tabela 4. Predloženi kandidati za dvojne inhibitore M2 jonskog kanala influence A.

DrugBank broj	Naziv	Formula	AQVN	EIIP
DB00915	Amantadin	C10H17N	2.214286	0.071739
DB06689	Etanolamin-oleat	C18H34O2.C2H7NO	2.215385	0.071958
DB00153	Ergokalciferol	C28H44O	2.219178	0.072708
DB00898	Etanol	C2H6O	2.222222	0.073303
DB01105	Sibutramin	C17H26CIN	2.222222	0.073303
DB01158	Bretilijum	C11H17BrN	2.233333	0.075425
DB00804	Diciklomin (Dicikoverin)	C19H35NO2	2.245614	0.077673
DB00146	Kalcifediol (Kalcidiol)	C27H44O2	2.246575	0.077845
DB01436	Alfakalcidol	C27H44O2	2.246575	0.077845
DB00154	Dihomo-gama- linoleinska kiselina	C20H34O2	2.25	0.078451
DB00592	Piperazin	C4H10N2	2.25	0.078451
DB01191	Deksfenfluramin	C12H16F3N	2.25	0.078451
DB01431	Alilestrenol	C21H32O	2.259259	0.080048
DB00375	Kolestipol	C8H23N5.C3H5ClO	2.26087	0.080319
DB00330	Etambutol	C10H24N2O2	2.263158	0.080701
DB00162	Vitamin A	C20H30O	2.27451	0.082539
DB01365	Mefentermin	C11H17N	2.275862	0.082751
DB01170	Gvanetidin	C10H22N4	2.277778	0.08305
DB00132	Alfa-linoleinska kiselina	C18H30O2	2.28	0.083392
DB06809	Pleriksafor	C28H54N8	2.288889	0.084723
DB08868	Fingolimod	C19H33NO2	2.290909	0.085017
DB00858	Drostanolon	C20H32O2	2.296296	0.085784
DB00136	Kalcitriol	C27H44O3	2.297297	0.085924
DB00910	Parikalcitol	C27H44O3	2.297297	0.085924
DB00376	Triheksifenidil	C20H31NO	2.301887	0.086554
DB01022	Filohinon	C31H46O2	2.303797	0.086811
DB00191	Fentermin	C10H15N	2.307692	0.087326
DB00313	Valproinska kiselina	C8H16O2	2.307692	0.087326
DB01577	Metamfetamin	C10H15N	2.307692	0.087326
DB06204	Tapentadol	C14H23NO	2.307692	0.087326
DB06709	Metaholin	C8H18NO2	2.310345	0.087669
DB08887	Etil- eikozapentaenoat	C22H34O2	2.310345	0.087669
DB01187	Jofendilat	C19H29IO2	2.313725	0.088098
DB01337	Pankuronijum	C35H60N2O4	2.316832	0.088483
DB00947	Fulvestrant	C32H47F5O3S	2.318182	0.088648
DB01083	Orlistat	C29H53NO5	2.318182	0.088648
DB00387	Prociklidin	C19H29NO	2.32	0.088868
DB00942	Cikrimin	C19H29NO	2.32	0.088868
DB08804	Nandrolon dekanoat	C28H44O3	2.32	0.088868

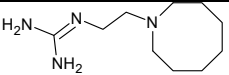
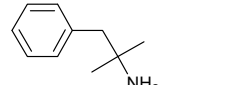
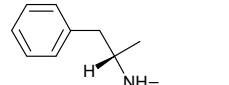
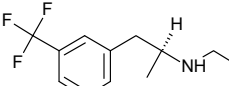
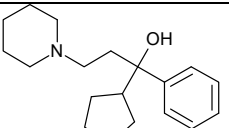
Kandidati za inhibitore M2 proteina virusa influence dati u Tab.4 su selektovani na osnovu kriterijuma koji uzima u obzir dugodosežne interakcije između lekova i terapijskog cilja (interakcija na rastojanjima između 5 i 1000 Å). Primenom kriterijuma za virtuelni skrining zasnovan na EIIP/AQVN, odabrano je 39 lekova (Tab. 4) od 2.627 odobrenih lekova iz DrugBank-a (<http://www.drugbank.ca>) (Wishart et al., 2008).

Da bi se dobila potpuna informacija o mogućoj aktivnosti odabranih kandidata za inhibitore bilo je potrebno utvrditi njihovu strukturnu (3D) podudarnost sa M2 proteinom koja je neophodan uslov hemijskog vezivanja ovih molekula. U ovom cilju su odabrani kandidati za inhibitore (Tab. 4) dalje analizirani metodama molekularnog dokinga.

4.3. Hemoinformatička analiza

Svih 39 odabranih lekova uključeno je u softver Pentacle, protonovano na pH 7,4 i orijentisano prema glavnom momentu inercije. U strukturno zasnovanom virtuelnom skriningu, koristili smo metod udaljenosti od centroida seta za učenje, kao kriterijum za sličnost između skupa za učenje i jedinjenja kandidata. Najboljih 5 kandidata iz DrugBank-a su predstavljeni u tabeli 5.

Tabela 5. Pet najboljih kandidata prema strukturno zasnovanom virtuelnom skriningu, sa ID-om DrugBank baze, udaljenošću od centroida, strukturom i vrednostima deskriptora AQVN/EIIP.

DrugBank broj	Naziv	Udaljenost od centroida skupa za učenje	Struktura	AQVN	EIIP
DB01170	Gvanetidin	1.3446		2.277778	0.08305
DB00191	Fentermin	1.4234		2.307692	0.087326
DB01577	Metamfetamin	1.4334		2.307692	0.087326
DB01191	Deksfenfluramin	1.5377		2.25	0.078451
DB00942	Cikrimin	1.6057		2.32	0.088868

Zatim smo izvršili molekularno dokovanje pet kandidata na WT M2 kanala i na mutant S31N. Dobijene doking energije su predstavljene u tabeli 6. Kandidat sa najnižom energijom vezivanja i jednakim afinitetom i za WT kanal i S31N mutant je bio cikrimin, sa vezivnom energijom od -8,3 kcal/mol. Udokovane konformacije cikrimina su predstavljene na slikama 5 i 6. Utvrđeno je da cikrimin zadržava odgovarajuće interakcije između receptora i liganda, i to Ala 30 i Ser 31 u slučaju WT i Asn 31 u slučaju S31N mutanta M2 kanala. Kao što je prikazano na slikama 5 i 6, orijentacija cikrimina, u poređenju sa kristalnim koordinatama amantadina i M2WJ332, pokazuje sposobnost cikrimina da ostvari vodonične veze sa Ser 31, tj. Asn 31, dok istovremeno zadržava hidrofobne interakcije sa Ala 30. To bi moglo biti moguće objašnjenje zašto cikrimin pokazuje relativno visok i

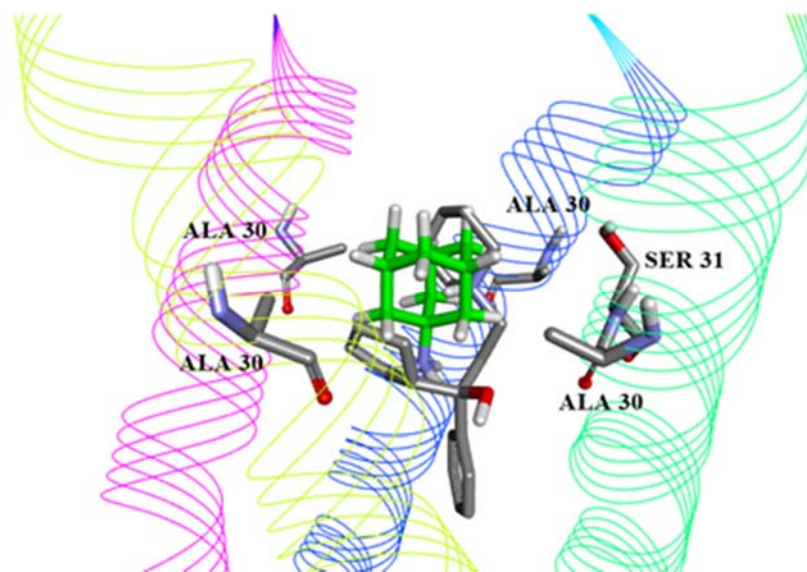
jednak afinitet i za WT i za S31N mutirani M2 kanal (-8,3 kcal / mol, ili 800 nM). Ostala jedinjenja pokazuju slične obrasce vezivanja kao cikrimin, međutim, u većini drugih slučajeva odnos afiniteta ide u korist proteina WT M2 kanala.

Tabela 6. Doking energije pet najboljih kandidata iz virtuelnog skrininga, sa ID-om Drugbank-a, doking energijama i odnosom afiniteta prema WT i S31N M2 kanalu.

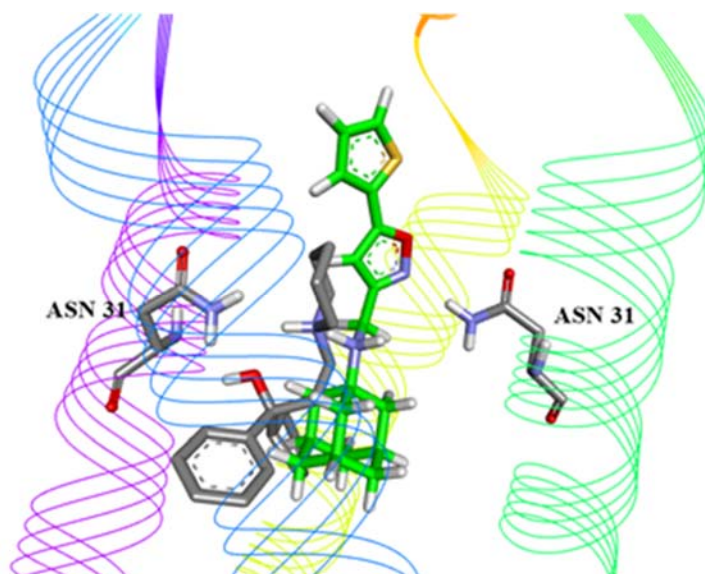
DrugBank broj	Naziv	Doking energija na WT M2 kanala (kcal/mol)	Doking energija na S31N mutantu M2 channel (kcal/mol)	Odnos afiniteta WT:S31N*
DB00942	Cikrimin	-8.3	-8.3	1
DB01191	Deksfenfluramin	-6.3	-6.0	0.6
DB01170	Gvanetidin	-5.9	-5.7	0.71
DB00191	Fentermin	-5.3	-4.8	0.43
DB01577	Metamfetamin	-4.8	-4.5	0.6

*Odnos afiniteta predstavlja odnos konstanti disocijacija kompleksa protein-ligand, i računa se na

sledeći način: $\frac{K_{WT}}{K_{S31N}} = e^{\frac{\Delta G_{WT} - \Delta G_{S31N}}{RT}}$, gde ΔG predstavlja slobodnu energiju vezivanja iz dokinga (doking energiju), R univerzalnu gasnu konstantu, koja iznosi 8,314 J mol⁻¹ K, a za vrenost T se uzimaju standardni uslovi, tj temperatura 298K (25 °C).



Slika 5. Najbolje rangirana konformacija cikrimina (atomi ugljenika su obojeni u sivo) u strukturi WT M2 kanala (PDB 2KQT), dobijenoj NMR čvrstog stanja, u poređenju sa koordinatama amantadina u kompleksu (atomi ugljenika su obojeni u zeleno).



Slika 6. Najbolje rangirana doking konformacija cikrimina (atomi ugljenika su obojeni u sivo) u strukturi mutanta S31N M2 kanala (PDB 2LY0), u poređenju sa koordinatama leka M2WJ332 u kompleksu (atomi ugljenika su obojeni u zeleno).

4.4. Ispitivanje antivirusne aktivnosti cikrimina *in vitro*

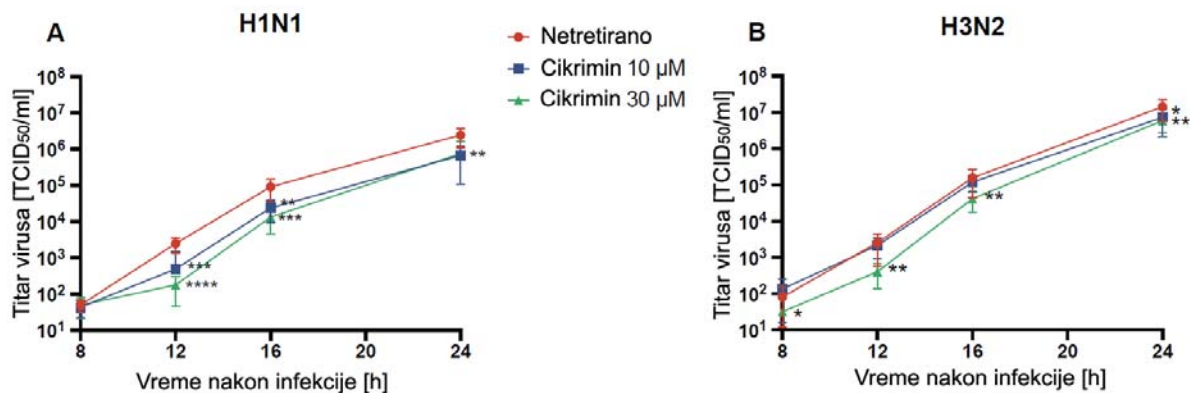
Testirana je *in vitro* antivirusna aktivnost cikrimina, jednog od pet najbolje rangiranih jedinjenja na osnovu virtuelnog skrininga DrugBank-a (Radosevic i sar., 2019). Dodavanje cikrimina ćelijama inficiranim influenza virusima A/CA/07/2009 (H1N1) i A/New York/55/04 (H3N2) rezultiralo je statistički značajnim dozno-zavisnim smanjenjem virusne replikacije.

Tretman sa 10 i 30 μM cikrimina rezultiralo je značajnim smanjenjem pH1N1 titra virusa u 12, 16 i 24 sata posle infekcije (Slika 7a).

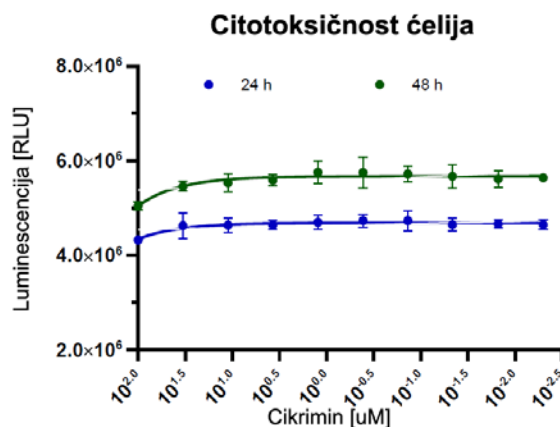
Tretman sa 10 i 30 μM cikrimina rezultirao je statistički značajnim smanjenjem H3N2 titra virusa prvog dana posle infekcije.

Tretman sa 30 μM cikrimina takođe je rezultirao statistički značajnim smanjenjem titra virusa H3N2 u 8, 12 i 16 sati posle infekcije (Slika 7b) (Matejin i sar., 2019).

Kvantifikacijom luminiscentnog signala, koji odgovara količini prisutnog ATP, određena je održivost ćelija u kulturi. ATP je direktno proporcionalan broju metabolički aktivnih ćelija. Slika 8 pokazuje da 100 μM cikrimina izaziva nisku citotoksičnost, pa su zato za antivirusni test korišćene doze od 10 μM i 30 μM cikrimina.



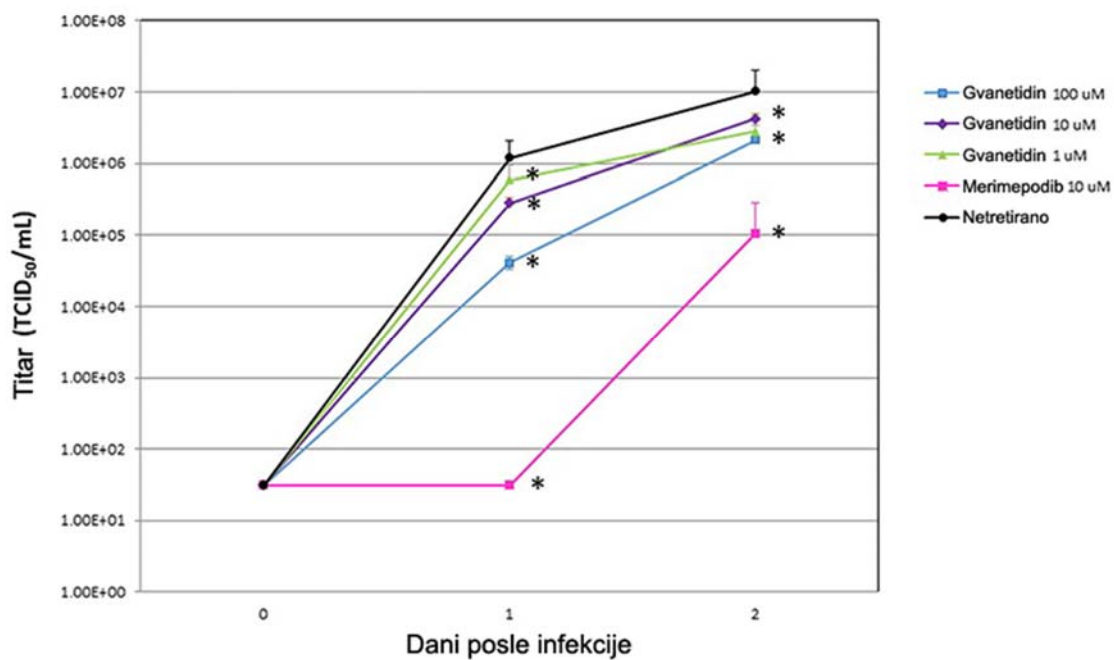
Slika 7. Dozno zavisni efekat cikrimina na replikaciju virusa influence. (A) Influenza A/CA/07/2009 (H1N1) i (B) Influenza A/New York/55/04 (H3N2). Replikacija virusa u MDCK ćelijama nakon tretmana sa naznačenim koncentracijama cikrimina.



Slika 8. Citotoksični efekat cikrimina na MDCK ćelije, detektovano metodom održivosti luminescentnih ćelija

4.5. Ispitivanje *in vitro* antivirusne aktivnosti gvanetidina

Drugo jedinjenje čija je antivirusna aktivnost testirana *in vitro* je bio gvanetidin. Kao pozitivna kontrola, virus influence A / CA / 07/2009 (H1N1) je pomešan sa 10 µM merimepodiba, inhibitorom IMPDH (Inozin monofosfat dehidrogenaze), sa poznatom antivirusnom aktivnošću protiv raznih virusa, uključujući i virus influence (Markland i sar., 2000; Tong i sar., 2018). Dodavanje različitih doza gvanetidina ćelijama zaraženim virusom influence A (H1N1) rezultiralo je smanjenjem titra virusa (Slika 9). Tretman sa 100 i 10 µM gvanetidina rezultirao je značajnim smanjenjem virusnog titra prvog dana posle infekcije, pri čemu je 100 µM gvanetidina izazvalo smanjenje virusnog titra od 1-2log (Radosevic i sar., 2019).



Slika 9. Virusni titri influenze A/CA/07/2009 (H1N1) 0, 1 i 2 dana posle infekcije nakon tretmana naznačenim koncentracijama leka. 10 μ M merimepodib je korišćen kao pozitivna kontrola. Rezultati su ucrtani kao srednja vrednost triplikata, sa prikazanim standardnim odstupanjima. Statistički značajno smanjenje virusnog opterećenja označeno je zvezdicom.

5. Diskusija

Influenca je veliki globalni zdravstveni problem. Javlja se u vidu godišnjih epidemija i povremenih pandemija koje imaju teške posledice po zdravlje ljudi (prema proceni Svetske Zdravstvene Organizacije svake godine oboli između 2 i 3 miliona ljudi i umire 250.000 do 500.000) i globalnu ekonomiju. Posledice infekcije izazvane influenza virusom mogu varirati od asimptomatskih do virusnih pneumonija opasnih po život. Broj lekova za lečenje ove bolesti je veoma ograničen a primetna je sve učestalija pojava virusa rezistentnih na postojeću terapiju. Virus influenza veoma brzo evoluiraju zbog čega imaju visok pandemijski potencijal pa je pretnja od novih pandemija stalno prisutna. Ovo se posebno odnosi na virus ptičijeg gripa H5N1 koji zbog visokog stepena smrtnosti kod ljudi inficiranih ovim virusom (>60%) predstavlja najveću globalnu pretnju za čovečanstvo. Ova situacija nameće potrebu za ubrzanim razvojem lekova koji bi umanjili negativne posledice po zdravlje ljudi, kako sadašnjih sezonskih epidemija gripa, tako i mogućih budućih pandemija (Hayden i de Jong, 2011). Pošto je razvoj lekova veoma dugotrajan i skup proces (traje 10 do 15 godina i košta 1,5 do 2 milijarde \$), prenamena lekova koji su već odobreni za lečenje drugih bolesti je pristup koji omogućava da se do lekova za influencu dođe znatno brže uz veliku materijalnu uštedu. U ovom procesu preselekcija odobrenih lekova primenom računarskih postupaka (*in silico* skrining) predstavlja ključni korak u izboru lekova koji će se dalje eksperimentalno testirati *in vitro* i *in vivo*.

In silico molekularni dizajn već nekoliko decenija unazad igra važnu ulogu u razvoju terapija zasnovanih na malim molekulima (Leelananda i Lindert, 2016). Veliki broj jedinjenja koja su dostigla kliničku fazu razvoja ili lekovi koji su odobreni u SAD, su ili otkriveni ili optimizovani primenom računarskih metoda (Leelananda i Lindert, 2016). Različite *in silico* tehnike koje se koriste u kompjuterskoj farmakologiji su pomogle u razumevanju mehanizama na kojima se zasniva delovanje lekova što je omogućilo povećanje njihove efikasnosti uz manja propratna negativna delovanja. U ovu grupu *in silico* tehnika spada i nedavno razvijeni kompjuterski postupak za prenamenu lekova za terapiju gripa (Sencanski i sar., 2015).

U ranijim studijama *in silico* kriterijum zasnovan na molekulskim deskriptorima AQVN i EIIP uspešno je korišćen za selekciju lekova za lečenje virusnih i bakterijskih infekcija (Veljković i sar., 2015). Jedan od karakterističnih primera uspešnosti ovog pristupa u prenameni lekova je i selekcija ibuprofena kao široko dostupnog i jeftinog leka za lečenje Ebole (Veljković i sar., 2015). Aktivnost ovog leka koji je odabran skriningom baze odobrenih lekova GenBank pomoću EIIP/AQVN filtera kasnije je i eksperimentalno potvrđena (Zhao i sar., 2016; Paessler i sar., 2018.). U ovom slučaju je posebno važno istaći jednostavnost ovog *in silico* postupka, koji ne zahteva dugotrajne i komplikovane proračune na superkompjuterima, koja je omogućila prenamenu ibuprofena za lečenje Ebole na samom početku nedavne epidemije u Zapadnoj Africi. Ovo ukazuje da bi se prenamena lekova zasnovana na ovom pristupu mogla uspešno koristiti i u slučaju neke naredne epidemije ili pandemije. Nedavni primer selekcije inhibitora za glavnu proteazu virusa SARS-CoV-2 ovo potvrđuje (Sencanski i sar., 2020; Parveen i sar., 2020).

Veoma je teško da se primenom samo jedne računarske metode analiziraju složene biološke strukture i procesi pošto svaka metoda ima svoje prednosti i ograničenja. Praksa je pokazala da istovremena primena kombinovanih *in silico* pristupa omogućava izbor lekova za prenamenu koji u kasnijim eksperimentalnim testiranjima daju mnogo bolje rezultate (Baig i sar., 2016).

U našoj studiji prilikom odabira kandidata koji su dvostruki inhibitori M2 jonskog kanala virusa influenza tipa A - WT virusa i virusa sa mutiranim proteinom M2 S31N, koristili smo protokol zasnovan na primeni kombinovanih *in silico* filtera koji su zasnovani na kratkodosežnim i dalekodosežnim međumolekulskim interakcijama. Ovakav pristup virtuelnog skrininga omogućio je selekciju odobrenih lekova, koji bi mogli da se koriste u lečenju gripa, analizom velikog broja

jedinjenja za veoma kratko vreme i uz korišćenje minimalnih računarskih resursa. Primenom kombinovanih *in silico* filtera za VS u ovoj studiji odabrani su kandidati za dvostruke inhibitori M2 jonskog kanala virusa influence tipa A - WT virusa i virusa sa mutacijom u proteinu M2 - M2-S31N, dominantnom mutacijom u M2 među trenutno cirkulišućim virusima influence A (Dong i sar., 2015).

U ranijoj studiji u kojoj su korišćeni EIIP/AQVN hemijski deskriptori za analizu distribucije 86,000.000 jedinjenja iz PubChem baze, utvrđeno je da je 92,5% jedinjenja iz baze PubChem (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>) homogeno raspoređeno unutar intervala EIIP (0.00–0.11 Ry) i AQVN (2.4–3.3) (Veljković i sar., 2011). Ovaj domen koji obuhvata većinu poznatih hemijskih jedinjenja označen je kao „osnovni EIIP/AQVN hemijski prostor“ (eng. basic chemical space, BCS). Rezultati primene VS zasnovanog na EIIP/AQVN deskriptorima pokazali su da je aktivna grupa kandidata za M2 inhibitora vrlo specifična i da pripada retkom klasteru jedinjenja koja su van BCS. Ovo otkriće ukazuje na to da samo mali broj jedinjenja koja se nalaze u ustanovljenom aktivnom EIIP/AQVN domenu ima mogućnost da inhibira M2 protein. Važno je napomenuti da ovaj domen EIIP/AQVN u kome se nalaze kandidati za dvostruke inhibitore M2 obuhvata samo 3% od svih poznatih jedinjenja iz PubChem. Stoga nije iznenađujuće što su rezultati ranijih eksperimentalnih skrininga utvrdili da je M2 „teška“ ciljna terapijska meta za ispitivanje selektivne inhibicije u eksperimentima visokopropusnog skrininga (eng. high-throughput screening, HTS). Ovo objašnjava zašto je do sada nađeno 10 do 100 puta manje hit jedinjenja koja bi predstavljala moguće dvojne M2 inhibitore, u poređenju sa hit jedinjenjima koja su određena za druge terapijske proteinske mete (Baldi i sar., 2013).

Jedinjenja selektovana bioinformatičkim VS baziranom na EIIP/AQVN filteru su dalje podvrgnuta ligand zasnovanom VS-u. Na ovaj način je i odabrano pet najboljih kandidata. Ovi kandidati za dvojne M2 inhibitore influence izabrani su na osnovu podudarnosti farmakofora i udaljenosti od centroida skupa za učenje, pri čemu je kao kriterijum korišćena sličnost između skupa za učenje i odabranih jedinjenja kandidata. Na ovaj način od 5 najboljih kandidata odabranih iz baze DrugBank po ovom kriterijumu je za dalje eksperimentalno testiranje selektovan gvanetid. Postupkom molekularnog dokovanja 5 odabranih kandidata na WT M2 kanala i na mutant S31N kao najbolji kandidat sa najnižom energijom vezivanja i jednakim afinitetom i za WT kanal i S31N mutant je odabran cikrimin. Ova dva jedinjenja su odabrana dalje za eksperimentalno testiranje *in vitro* njihove aktivnosti kao inhibitora M2 proteina.

Poznavanje veze između strukture i funkcije M2 jonskog kanala kao terapijske mete je neophodan uslov za uspešan razvoj njegovih inhibitora. M2 jonski kanali virusa gripa predstavljaju proton selektivne kanale, integrisane u virusni omotač. Ovi proteini su glavna terapijska meta amantadina i rimantadina, dva leka odobrena za lečenje gripa koja inhibiraju M2 protein (Wu i sar., 2014). Molekularna osnova rezistencije na adamantine je povezana sa više mutacija (L26F, V27A, A30T, A30V, G34E i L38F) a S31N varijanta je pronađena u više od 95% trenutno cirkulišućih sojeva influenza A virusa (Hurt i sar., 2017). Takođe u prethodnim studijama je pokazano da dvostruki inhibitori, koji imaju kao mete i WT i mutiran M2 protein, mogu imati prednosti u odnosu na mono inhibitore. To se ogleda u višoj genetskoj barijeri koja omogućava dvostrukim inhibitorima da sačuvaju aktivnost ako mutant povratnom mutacijom vrati WT sekvencu (Ma i sar., 2016; Wang, 2016). Raniji radovi su pokazali da kombinovanim blokiranjem M2 kanala oseltamivrom i ribavirinom dolazi do sinergijskog antivirusnog efekta i odložene rezistencije na lekove (Dunning i sar., 2014). Dokazano je i da primena kombinovane terapije dovodi do smanjenja razvoja rezistencije i neželjenih efekata i kod osoba sa kompromitovanim imunim sistemom koje se podvrgavaju produženom antivirusnom tretmanu (Ison, 2013). Iz tog razloga se kombinovana terapija preporučuje u kliničkoj praksi i može se klasifikovati u ranu kombinovanu hemoterapiju i sekvencijalnu hemoterapiju sa više lekova (Galabov i sar., 2015).

Cikrimin je centralni antiholinergički lek koji se koristi za smanjenje nivoa acetilholina da bi se uravnotežio nivo dopamina u lečenju Parkinsonove bolesti (Kafer i Poch, 1957; Fahn, 2015). Zanimljivo je da lek protiv influence, amantadin, prethodno prenamenjen za lečenje Parkinsonove bolesti, takođe uzrokuje antiholinergičke neželjene efekte (Horstink i sar., 2006). Amantadin je odobren za lečenje motoričke komplikacije kod Parkinsonove bolesti posle kliničkih ispitivanja, ali se inicijalni korak za istraživanje amantadina za Parkinsonovu bolest zasnivao na zapažanju lekara da je bolesniku od Parkinsonove bolesti u jednom momentu prepisan amantadin zbog simptoma gripa što je dovelo do poboljšanja simptoma primarne bolesti (Athauda i Foltynie, 2018). Pošto su amantadin i cikrimin u istom EIIP/AQVN domenu, na osnovu rezultata prethodnih studija može se očekivati da ova dva leka dele iste terapijske ciljeve. Zanimljivo je da su i drugi lekovi protiv Parkinsonove bolesti koji imaju strukturu sličnu amantadinu, poput biperidena, triperidena i triheksifenidila (koga smo takođe identifikovali u našoj *in silico* studiji kao potencijalnog kandidata za M2 inhibitor) pokazali inhibitornu aktivnost protiv virusa influence tipa A (Wu i sar., 2017; An i sar., 2014).

Nakon odabira cikrimina kao jednog od najboljih kandidata u našoj studiji, ispitali smo njegovu *in vitro* aktivnost na ćelijskim kulturama inficiranim sa pandemijskim influenza pH1N1 virusom i sezonskim H3N2 virusima. Rezultati ovog ispitivanja su pokazali značajnu antivirusnu aktivnost ovog leka na izabranim sojevima virusa influence A/CA07/2009 (H1N1) i A/New York/55/04 (H3N2) na način koji zavisi od doze (Matejin i sar., 2019).

Drugi lek na našoj listi koji je odabran *in silico* postupkom je gvanetidin. Ovaj lek je prvobitno bio korišćen kao blokator adrenergičkih neurona i kao antihipertenziv ali dolaskom novije generacije lekova je povučen iz upotrebe. Nakon *in silico* analize ovaj lek je testiran *in vitro* na ćelijskim kulturama inficiranim pandemijskim virusom influence A/CA/07/2009 (H1N1). Pokazano je da gvanetidin inhibira replikaciju ovog virusa na dozno zavisani način (Radosevic i sar., 2019).

Ostali lekovi izabrani kao potencijalni inhibitori M2 jonskog kanala su ergokalciferol, kalcidiol, alfa-kalcidol. Ovaj rezultat je veoma zanimljiv jer su metaboliti vitamina D prethodno bili povezani sa potencijalnom anti-influenca aktivnošću. Podaci iz literature pružaju dokaze za i protiv pozitivnog efekta unošenja suplemenata vit D na proizvodnju antitela ali ono što su i studije pokazale je da vitamin D nesumnjivo ima važnu ulogu kao imunomodulirajući agens u virusnim infekcijama (Gruber-Bzura, 2018). Poznato je da su ciljne grupe za vakcinaciju protiv gripa deca i starije osobe. Mlađa deca, kod kojih se infekcije lako i brzo šire zbog nezrelosti imunskog sistema mogu razviti tešku kliničku sliku. Dok su u drugoj grupi starije osobe koje uglavnom imaju smanjen imunološki odgovor na vakcinaciju protiv gripa (Sundaram i Coleman, 2012). Pored toga, ove dve populacije su češće izložena deficitu vitamina D zbog smanjene sinteze i smanjene bubrežne proizvodnje aktivnog metabolita, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$.

Još jedan lek koji je odobrila FDA, sa dokumentovanim anti-influenca aktivnošću je alfa-linolenska kiselina, jedinjenje koje je u našoj analizi izabrano kao potencijalni inhibitor M2 jonskog kanala, što ukazuje na efikasnost predloženog kriterijuma za izbor ove vrste lekova. Ovo jedinjenje, koje se nalazi u okviru predloženog EIIP/AQVN domena, ranije je bilo predmet *in vitro* analize pri čemu je pokazano da pored toga što inhibira influenza A viruse, učestvuje i u modulaciji IFN- α i smanjuje apoptozu (Bai i sar., 2012).

Među najbolje rangiranim inhibitorima iz naše studije je i metamfetamin. Ovaj lek, pored toga što ima širok spektar delovanja na neurone, utiče i na imunski sistem tako što smanjuje otpornost domaćina prema patogenima. Prethodne studije su pokazale da upotreba metamfetamina povećava faktor rizika za infekciju i replikaciju virusa humane imunodeficijencije 1 (HIV-1) u makrofazima i dendritičnim ćelijama kao i za infekciju virusom hepatitisa C (HCV) (Gonzales i sar., 2006; Liang i sar., 2008). Međutim, dokumentovana je inhibitorna aktivnost metamfetamin protiv virusa influence tipa A, pri čemu je pokazano da metamfetamin inhibira replikaciju influenza virusa tip A *in vitro*

prvenstveno dejstvom na virusnu replikaciju u kojoj M2 igra glavnu ulogu (Chen i sar., 2012). Iako je pokazano da metamfetamina inhibira replikaciju influenza virusa tip A, treba uzeti u obzir i njegovo dejstvo u populaciji koja zloupotrebljava droge, budući da će ispitanici u ovoj određenoj populaciji verovatnije biti pozitivni na HIV i / ili HCV, a metamfetamin može pojačati infekciju ova dva patogena. Ovo su razlozi zbog kojih bi se prenamena metamfetamina kao leka za influencu morala uzeti sa velikom rezervom.

Prenamenom lekova otkrivaju se nove indikacije prvenstveno za odobrene lekove, ali takođe i za druge kategorije jedinjenja kao što su: lekovi u kliničkom razvoju, lekovi koji nisu uspeli da pokažu dovoljnu efikasnost tokom kliničkog ispitivanja u II ili III fazi, lekovi koji su povučeni iz komercijalnih razloga i različiti prirodni proizvodi (Sencanski i sar., 2015).

Nedavno je stavljen na raspolaganje baza podataka, u obliku web servera sa otvorenim pristupom, pod nazivom „DrugRepV“ (<https://bioinfo.imtech.res.in/manojk/drugrepv/>). U ovoj bazi se nalaze literaturni podaci o prenamenjenim lekovima sa antivirusnom aktivnošću kao i podaci o biološkim, hemijskim, strukturnim i patogenim svojstvima 23 virusa koji su odgovorni za izazivanje epidemija i pandemija. DrugRepV nudi mogućnosti pretraživanja po kategorijama kao što su lekovi, virusi, mete lekova, klinička ispitivanja, eseji, itd. Efikasnost ove baze podržava i njeno direktno povezivanje sa drugim komplementarnim bazama podataka kao što su DrugBank, PubChem, NCBI-Takonomija, Clinicaltrials.gov. (Rajput i sar., 2021).

Može se očekivati da će postupak *in silico* prenamene lekova koji je razvijen u ovom radu u kombinaciji sa DrugRepV i sličnim bazama predstavljati značajnu ulogu u terapijskom odgovoru na moguće buduće virusne epidemije i pandemije.

6. Zaključci

Na osnovu rezultata iznetih u radu mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Određen je bioinformatički kriterijum zasnovan na EIIP/AQVN parametrima za *in silico* pretraživanje molekularnih biblioteka u cilju identifikacije kandidata za lekove - dvostruke inhibitora M2 jonskog kanala WT influenza A virusa i virusa sa mutacijom S31N u proteinu M2 na osnovu analize zajedničkog domena u kome se nalazi više od 80% aktivnih inhibitora M2 jonskog kanala influenza.
2. Na osnovu primene EIIP/AQVN bioinformatičkog kriterijuma za virtuelni skrining odabrano je 39 lekova od ukupno 2627 odobrenih lekova iz baze DrugBank koji su predloženi kao potencijalni kandidati za dvostruke inhibitore M2 jonskih kanala virusa influenza tipa A.
3. Na osnovu hemoinformatičkog kriterijuma za virtuelni skrining (VS), zasnovanog na međusobnoj strukturnoj sličnosti (ligand zasnovani VS) poznatih inhibitora M2 proteina sa kandidatima za lekove - dvostruke inhibitora M2 jonskog kanala WT virusa influenza A i virusa sa mutacijom S31N u proteinu M2, od 39 lekova je predloženo pet najboljih kandidata, a kao najbolji među njima odabran je gvanetid. Molekulskim dokingom pet najboljih kandidata na divlji tip M2 i mutirani M1 S31N kao molekul sa najmanjom energijom vezivanja i jednakim afinitetom za oba kanala je identifikovan lek cikrimin.
4. Eksperimentalni rezultati su potvrdili predviđenu aktivnost cikrimina protiv dva različita podtipa virusa gripa A pandemijskog pH1N1 i sezonskog H3N2.
5. Pokazana je *in vitro* aktivnost gvanetidina protiv pandemijskog virusa gripa pH1N1.
6. Predloženi bioinformatički kriterijum predstavlja osnov za selekciju dvostrukih inhibitora M2 jonskih kanala WT virusa influenza tipa A pH1N1 i H3N2 i ovih virusa sa mutacijom S31N u proteinu M2 virtuelnim pretraživanjem molekularnih biblioteka.

7. Literatura

Abdulganiyu, A.Y., Zahraddeen, S., Kabir, Y.M. & Abubakar U.S. (2016). Comparison Of Popular Bioinformatics Databases. *International Journal of Applied and Advanced Scientific Research*, 1(1): p. 19-28.

Abed, Y., Saim-Mamoun, A., & Boivin, G. (2021). Fitness of influenza A and B viruses with reduced susceptibility to baloxavir: A mini-review. *Reviews in medical virology*, 31(3), e2175.

Ajdacic, V., & Veljkovic, V. (1978). Antibiotic activity of organic compounds and their average quasi-valence number. *Experientia*, 34(5), 633-635.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389–3402.

An, L., Liu, R., Tang, W., Wu, J. G., & Chen, X. (2014). Screening and identification of inhibitors against influenza A virus from a US drug collection of 1280 drugs. *Antiviral research*, 109, 54–63.

Asha, K., & Kumar, B. (2019). Emerging Influenza D Virus Threat: What We Know so Far!. *Journal of clinical medicine*, 8(2), 192.

Augen J. (2002). The evolving role of information technology in the drug discovery process. *Drug discovery today*, 7(5), 315–323.

Athauda, D., & Foltynie, T. (2018). Drug Repurposing in Parkinson's Disease. *CNS drugs*, 32(8), 747–761

Baguelin, M., Jit, M., Miller, E., & Edmunds, W. J. (2012). Health and economic impact of the seasonal influenza vaccination programme in England. *Vaccine*, 30(23), 3459–3462.

Balgi, A. D., Wang, J., Cheng, D. Y., Ma, C., Pfeifer, T. A., Shimizu, Y., Anderson, H. J., Pinto, L. H., Lamb, R. A., DeGrado, W. F., & Roberge, M. (2013). Inhibitors of the influenza A virus M2 proton channel discovered using a high-throughput yeast growth restoration assay. *PloS one*, 8(2), e55271.

Bai, S. W., Chen, C. Y., Ji, J., Xie, Q. M., Ma, Y., Sun, B. L., et al. (2012). Inhibition effect of alpha-lipoic acid on the propagation of influenza a virus in MDCK cells. *Pak. Vet. J.* 32, 101–106.

Baig, M. H., Ahmad, K., Roy, S., Ashraf, J. M., Adil, M., Siddiqui, M. H., Khan, S., Kamal, M. A., Provazník, I., & Choi, I. (2016). Computer Aided Drug Design: Success and Limitations. *Current pharmaceutical design*, 22(5), 572–581.

Banerjee, P., Erehman, J., Gohlke, B. O., Wilhelm, T., Preissner, R., & Dunkel, M. (2015). Super Natural II--a database of natural products. *Nucleic acids research*, 43(Database issue), D935–D939.

Boulo, S., Akarsu, H., Ruigrok, R. W., & Baudin, F. (2007). Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus research*, 124(1-2), 12–21.

Bouvier, N.M., & Palese, P. (2008). The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 26(4suppl):D49-D53.

Boyd, M. J., Bandarage, U. K., Bennett, H., Byrn, R. R., Davies, I., Gu, W., Jacobs, M., Ledebor, M. W., Ledford, B., Leeman, J. R., Perola, E., Wang, T., Bennani, Y., Clark, M. P., & Charifson, P.

- S. (2015). Isosteric replacements of the carboxylic acid of drug candidate VX-787: Effect of charge on antiviral potency and kinase activity of azaindole-based influenza PB2 inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 25(9), 1990–1994.
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2013). ‘Chapter 39. Orthomyxoviruses (Influenza Viruses)’, in Jawetz, Melnick, & Adelberg’s *Medical Microbiology*, 26e. New York City: McGraw-Hill, 536–549.
- Brooks, G. F., Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., ... Mietzner, T. A. (2016). *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology: 24th Edition*. New York: The McGraw-Hill, 565-578.
- Brune, D., & Kim, S. (1994). Hydrodynamic steering effects in protein association. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8), 2930- 2934.
- Bui, M., Whittaker, G., & Helenius, A. (1996). Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *Journal of virology*, 70(12), 8391–8401.
- Bui, M., Wills, E. G., Helenius, A., & Whittaker, G. R. (2000). Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *Journal of virology*, 74(4), 1781–1786.
- Cady, S. D., Schmidt-Rohr, K., Wang, J., Soto, C. S., Degrado, W. F., & Hong, M. (2010). Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers. *Nature*, 463(7281), 689–692.
- Camacho, C. J., Kimura, S. R., DeLisi, C., & Vajda, S. (2000). Kinetics of desolvation-mediated protein-protein binding. *Biophysical journal*, 78(3), 1094–1105.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. (2020) Influenza: Seasonal Flu Vaccine Effectiveness Studies. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/vaccines-work/effectiveness-studies.htm>
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. (2015) Influenza: Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. Available from: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/flu.html#vaccine>
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. (2006). High levels of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses and interim guidelines for use of antiviral agents--United States, 2005-06 influenza season. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 55(2), 44–46.
- Clementi, N., Criscuolo, E., Castelli, M., & Clementi, M. (2012). Broad-range neutralizing anti-influenza A human monoclonal antibodies: new perspectives in therapy and prophylaxis. *The new microbiologica*, 35(4), 399–406.
- Chan-Tack, K. M., Murray, J. S., & Birnkrant, D. B. (2009). Use of ribavirin to treat influenza. *The New England journal of medicine*, 361(17), 1713–1714
- Chandrasekaran, S. N., Ceulemans, H., Boyd, J. D., & Carpenter, A. E. (2021). Image-based profiling for drug discovery: due for a machine-learning upgrade?. *Nature reviews. Drug discovery*, 20(2), 145–159. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00117-w>
- Chapeville, F., & Haenni, A.L. (Editors). (1980). *Chemical Recognition in Biology*. Springer-Verlag, Berlin.

- Chang, T.T., Sun, M.F., Chen, H.Y., Tsai, F.J., Fisher, M., Lin, J. G. & Chen, C. Y. (2011). Novel hemagglutinin inhibitors for H1N1 influenza virus screening from TCM database. *Molecular Simulation*, 37:5, 361-368.
- Chen C. Y. (2011). TCM Database@Taiwan: the world's largest traditional Chinese medicine database for drug screening in silico. *PloS one*, 6(1), e15939.
- Chen, Y. H., Wu, K. L., & Chen, C. H. (2012). Methamphetamine reduces human influenza A virus replication. *PloS one*, 7(11), e48335.
- Chenavas, S., Estrozi, L. F., Slama-Schwok, A., Delmas, B., Di Primo, C., Baudin, F., Li, X., Crépin, T., & Ruigrok, R. W. (2013). Monomeric nucleoprotein of influenza A virus. *PLoS pathogens*, 9(3), e1003275.
- Chemaly, R. F., Marty, F. M., Wolfe, C. R., Lawrence, S. J., Dadwal, S., Soave, R., Farthing, J., Hawley, S., Montanez, P., Hwang, J., Ho, J., Lewis, S., Wang, G., & Boeckh, M. (2021). DAS181 Treatment of Severe Lower Respiratory Tract Parainfluenza Virus Infection in Immunocompromised Patients: A Phase 2 Randomized, Placebo-Controlled Study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, ciab113. Advance online publication.
- ChEMBL documentation. [Online] www.ebi.ac.uk; 2019 [cited 2019 March 24]. Available from: <https://www.ebi.ac.uk/rdf/documentation/chembl/>.
- Crotty, S., Maag, D., Arnold, J. J., Zhong, W., Lau, J. Y., Hong, Z., Andino, R., & Cameron, C. E. (2000). The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen. *Nature medicine*, 6(12), 1375–1379.
- Cook, C. E., Lopez, R., Stroe, O., Cochrane, G., Brooksbank, C., Birney, E., & Apweiler, R. (2019). The European Bioinformatics Institute in 2018: tools, infrastructure and training. *Nucleic acids research*, 47(D1), D15–D22.
- Davies, M., Nowotka, M., Papadatos, G., Dedman, N., Gaulton, A., Atkinson, F., Bellis, L., & Overington, J. P. (2015). ChEMBL web services: streamlining access to drug discovery data and utilities. *Nucleic acids research*, 43(W1), W612–W620.
- De Clercq, E. (2006). Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nature Reviews Drug Discovery* 5 (12), 1015-1025
- DiMasi, J. A. (2001). Risks in new drug development: approval success rates for investigational drugs. *Clin.Pharma.Therapeutics*. 69(5), 297-307.
- DiMasi, J. A., Hansen, R. W., & Grabowski, H. G. (2003). The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of health economics*, 22(2), 151–185.
- Dias, A., Bouvier, D., Crépin, T., McCarthy, A. A., Hart, D. J., Baudin, F., Cusack, S., & Ruigrok, R. W. (2009). The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature*, 458(7240), 914–918.
- Deore, A., Dhumane, J., Wagh, R., & Sonawane, R. (2019). The Stages of Drug Discovery and Development Process. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 7(6), 62-67.
- Dolin, R., Reichman, R. C., Madore, H. P., Maynard, R., Linton, P. N., & Webber-Jones, J. (1982). A controlled trial of amantadine and rimantadine in the prophylaxis of influenza A infection. *The New England journal of medicine*, 307(10), 580–584.

- Dong, G., Peng, C., Luo, J., Wang, C., Han, L., Wu, B., Ji, G., & He, H. (2015). Adamantane-resistant influenza A viruses in the world (1902–2013): frequency and distribution of M2 gene mutations. *PLoS one*, 10(3), e0119115.
- Domachowske, J. B., Pankow-Culot, H., Bautista, M., Feng, Y., Claeys, C., Peeters, M., Innis, B. L., & Jain, V. (2013). A randomized trial of candidate inactivated quadrivalent influenza vaccine versus trivalent influenza vaccines in children aged 3–17 years. *The Journal of infectious diseases*, 207(12), 1878–1887.
- Du, J., Cross, T. A., & Zhou, H. X. (2012). Recent progress in structure-based anti-influenza drug design. *Drug discovery today*, 17(19–20), 1111–1120.
- Dunning, J., Baillie, J. K., Cao, B., Hayden, F. G., & International Severe Acute Respiratory and Emerging Infection Consortium (ISARIC) (2014). Antiviral combinations for severe influenza. *The Lancet. Infectious diseases*, 14(12), 1259–1270.
- Durán, A., Martínez, G. C., & Pastor, M. (2008). Development and validation of AMANDA, a new algorithm for selecting highly relevant regions in Molecular Interaction Fields. *Journal of chemical information and modeling*, 48(9), 1813–1823.
- Durán, A., Zamora, I., & Pastor, M. (2009). Suitability of GRIND-based principal properties for the description of molecular similarity and ligand-based virtual screening. *Journal of chemical information and modeling*, 49(9), 2129–2138.
- ECDC – European Centre for Disease prevention and Control. (2018). Influenza vaccination. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/seasonal-influenza/prevention-and-control/seasonal-influenza-vaccines>
- EMA- European Medicines Agency. (2014). Interim guidance on enhanced safety surveillance for seasonal influenza vaccines in the EU
- Everett, H. E., Nash, B., Londt, B. Z., Kelly, M. D., Coward, V., Nunez, A., van Diemen, P. M., Brown, I. H., & Brookes, S. M. (2020). Interspecies Transmission of Reassortant Swine Influenza A Virus Containing Genes from Swine Influenza A(H1N1)pdm09 and A(H1N2) Viruses. *Emerging infectious diseases*, 26(2), 273–281.
- Fahn S. (2015). The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 30(1), 4–18.
- Fröhlich, H. (1968). Long-range coherence and energy storage in biological systems. *International Journal of Quantum Chemistry*, 2(5), 641–649.
- Fröhlich, H. (1970). Long Range Coherence and the Action of Enzymes. *Nature*, 228, 1093.
- Fröhlich, H. (1975). The extraordinary dielectric properties of biological materials and the action of enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(11), 4211–4215.
- Furuta, Y., Komeno, T., & Nakamura, T. (2017). Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 93(7), 449–463. <https://doi.org/10.2183/pjab.93.027>
- Burmeister, W. P., Henrissat, B., Bosso, C., Cusack, S., & Ruigrok, R. W. (1993). Influenza B virus neuraminidase can synthesize its own inhibitor. *Structure (London, England : 1993)*, 1(1), 19–26.
- Galabov, A. S., Mileva, M., Simeonova, L., & Gegova, G. (2015). Combination activity of neuraminidase inhibitor oseltamivir and α -tocopherol in influenza virus A (H3N2) infection in mice. *Antiviral chemistry & chemotherapy*, 24(3–4), 83–91.

- Gaulton, A., Bellis, L. J., Bento, A. P., Chambers, J., Davies, M., Hersey, A., Light, Y., McGlinchey, S., Michalovich, D., Al-Lazikani, B., & Overington, J. P. (2012). ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic acids research*, 40(Database issue), D1100–D1107
- Gaush, C. R., & Smith, T. F. (1968). Replication and plaque assay of influenza virus in an established line of canine kidney cells. *Applied microbiology*, 16(4), 588–594.
- Gonzales, R., Marinelli-Casey, P., Shoptaw, S., Ang, A., & Rawson, R. A. (2006). Hepatitis C virus infection among methamphetamine-dependent individuals in outpatient treatment. *Journal of substance abuse treatment*, 31(2), 195–202.
- Gruber-Bzura B. M. (2018). Vitamin D and Influenza-Prevention or Therapy?. *International journal of molecular sciences*, 19(8), 2419.
- Guo, Y. J., Jin, F. G., Wang, P., Wang, M., & Zhu, J. M. (1983). Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus. *The Journal of general virology*, 64 (Pt 1), 177–182.
- Haasbach, E., Reiling, S. J., Ehrhardt, C., Droebner, K., Rückle, A., Hrinčius, E. R., Leban, J., Strobl, S., Vitt, D., Ludwig, S., & Planz, O. (2013). The NF-kappaB inhibitor SC75741 protects mice against highly pathogenic avian influenza A virus. *Antiviral research*, 99(3), 336–344.
- Haaheim, L. R., & Oxford, J. S. (2013). Basic influenza virology and immunology. *Pandemic influenza*. Wallingford: CABI, pp. 19–30.
- Hayden F. G. (2006). Antiviral resistance in influenza viruses--implications for management and pandemic response. *The New England journal of medicine*, 354(8), 785–788.
- Hayden, F. G., & de Jong, M. D. (2011). Emerging influenza antiviral resistance threats. *The Journal of infectious diseases*, 203(1), 6–10.
- Hale, B.G., Randall, R.E., Ortin, J., & Jackson, D. (2008). The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *Journal of General Virology*, 89(19):2359-2376.
- Hampson A. W. (2008). Vaccines for pandemic influenza. The history of our current vaccines, their limitations and the requirements to deal with a pandemic threat. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, 37(6), 510–517.
- Harper, S. A., Bradley, J. S., Englund, J. A., File, T. M., Gravenstein, S., Hayden, F. G., McGeer, A. J., Neuzil, K. M., Pavia, A. T., Tapper, M. L., Uyeki, T. M., Zimmerman, R. K., & Expert Panel of the Infectious Diseases Society of America (2009). Seasonal influenza in adults and children--diagnosis, treatment, chemoprophylaxis, and institutional outbreak management: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 48(8), 1003–1032.
- Hassanipour, S., Arab-Zozani, M., Amani, B., Heidarzad, F., Fathalipour, M., & Martinez-de-Hoyo, R. (2021). The efficacy and safety of Favipiravir in treatment of COVID-19: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Scientific reports*, 11(1), 11022.
- Herz, C., Stavnezer, E., Krug, R., & Gurney, T., Jr (1981). Influenza virus, an RNA virus, synthesizes its messenger RNA in the nucleus of infected cells. *Cell*, 26(3 Pt 1), 391–400.
- Horstink, M., Tolosa, E., Bonuccelli, U., Deuschl, G., Friedman, A., Kanovsky, P., Larsen, J. P., Lees, A., Oertel, W., Poewe, W., Rascol, O., Sampaio, C., European Federation of Neurological Societies, & Movement Disorder Society-European Section (2006). Review of the therapeutic management of Parkinson's disease. Report of a joint task force of the European Federation of

Neurological Societies and the Movement Disorder Society-European Section. Part I: early (uncomplicated) Parkinson's disease. *European journal of neurology*, 13(11), 1170–1185.

Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B., & Philpott, K. L. (2011). Principles of early drug discovery. *British journal of pharmacology*, 162(6), 1239–1249.

Hurt, A., Komadina, N., Deng, Y. M., Kaye, M., Sullivan, S., Subbarao, K., & Barr, I. (2017). Detection of adamantane-sensitive influenza A(H3N2) viruses in Australia, 2017: a cause for hope?. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 22(47), 17-00731.

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). Available online at: <http://www.ictvonline.org/virus> Taxonomy (Accessed December 23, 2020).

Ison, M. G. (2013). Influenza prevention and treatment in transplant recipients and immunocompromised hosts. *Influenza and other respiratory viruses*, 7 Suppl 3(Suppl 3), 60–66.

Ison, J., Rapacki, K., Ménager, H., Kalaš, M., Rydza, E., Chmura, P., Anthon, C., Beard, N., Berka, K., Bolser, D., Booth, T., Bretaudeau, A., Brezovsky, J., Casadio, R., Cesareni, G., Coppens, F., Cornell, M., Cuccuru, G., Davidsen, K., Vedova, G. D., ... Brunak, S. (2016). Tools and data services registry: a community effort to document bioinformatics resources. *Nucleic acids research*, 44(D1), D38–D47.

Ison M. G. (2017). Antiviral Treatments. *Clinics in chest medicine*, 38(1), 139–153.

Jagger, B. W., Wise, H. M., Kash, J. C., Walters, K. A., Wills, N. M., Xiao, Y. L., Dunfee, R. L., Schwartzman, L. M., Ozinsky, A., Bell, G. L., Dalton, R. M., Lo, A., Efstathiou, S., Atkins, J. F., Firth, A. E., Taubenberger, J. K., & Digard, P. (2012). An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6091), 199–204.

Johnson, N. P., & Mueller, J. (2002). Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bulletin of the history of medicine*, 76(1), 105–115.

Kafer, J. P., & Poch, G. F. (1957). Cycrimine, a new drug in the treatment of Parkinson's disease and Parkinsonism. *Prensa Med. Argent* 44, 1071–1075

Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2021). PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. *Nucleic acids research*, 49(D1), D1388–D1395.

Kiso, M., Mitamura, K., Sakai-Tagawa, Y., Shiraishi, K., Kawakami, C., Kimura, K., Hayden, F. G., Sugaya, N., & Kawaoka, Y. (2004). Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet (London, England)*, 364(9436), 759–765.

Kern, F., Fehlmann, T., & Keller, A. (2020). On the lifetime of bioinformatics web services. *Nucleic acids research*, 48(22), 12523–12533.

Krátký, M., & Vinšová, J. (2011). Antiviral activity of substituted salicylanilides--a review. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11(11), 956–967.

Kreijtz, J. H., Fouchier, R. A., & Rimmelzwaan, G. F. (2011). Immune responses to influenza virus infection. *Virus research*, 162(1-2), 19–30.

Krug, R.M., & Aramini, J.M. (2009). Emerging antiviral targets for influenza A virus. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(6):269-277.

- Landolt, G. A., & Olsen, C. W. (2007). Up to new tricks - a review of cross-species transmission of influenza A viruses. *Animal health research reviews*, 8(1), 1–21.
- Lamb, R.A., Holsinger, L.J., & Pinto, L.H. (1994). The influenza A virus M2 ion channel protein and its role in the influenza virus life cycle. In E. Wimmer (Ed.), *Cellular Receptors of Animal Viruses*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Lab Press, 303–321.
- Lamb, R. A. & Krug, R. M. (2001). Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In *Fields Virology*, 4 edn, pp. 1487-1531. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Le Goffic, R., Bouguyon, E., Chevalier, C., Vidic, J., Da Costa, B., Leymarie, O., Bourdieu, C., Decamps, L., Dhorne-Pollet, S., & Delmas, B. (2010). Influenza A virus protein PB1-F2 exacerbates IFN-beta expression of human respiratory epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(8), 4812–4823.
- Lee, C. W., & Saif, Y. M. (2009). Avian influenza virus. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 32(4), 301–310.
- Lee, S. M., & Yen, H. L. (2012). Targeting the host or the virus: current and novel concepts for antiviral approaches against influenza virus infection. *Antiviral research*, 96(3), 391–404.
- Lee, Y. T., Kim, K. H., Ko, E. J., Lee, Y. N., Kim, M. C., Kwon, Y. M., Tang, Y., Cho, M. K., Lee, Y. J., & Kang, S. M. (2014). New vaccines against influenza virus. *Clinical and experimental vaccine research*, 3(1), 12–28.
- Leelananda, S. P., & Lindert, S. (2016). Computational methods in drug discovery. *Beilstein journal of organic chemistry*, 12, 2694–2718.
- Leonov, H., Astrahan, P., Krugliak, M., & Arkin, I. T. (2011). How do aminoadamantanes block the influenza M2 channel, and how does resistance develop?. *Journal of the American Chemical Society*, 133(25), 9903–9911
- Li, Q., Zhou, L., Zhou, M., Chen, Z., Li, F., Wu, H., Xiang, N., Chen, E., Tang, F., Wang, D., Meng, L., Hong, Z., Tu, W., Cao, Y., Li, L., Ding, F., Liu, B., Wang, M., Xie, R., Gao, R., ... Feng, Z. (2014). Epidemiology of human infections with avian influenza A(H7N9) virus in China. *The New England journal of medicine*, 370(6), 520–532.
- Li, G. M., Chiu, C., Wrammert, J., McCausland, M., Andrews, S. F., Zheng, N. Y., Lee, J. H., Huang, M., Qu, X., Edupuganti, S., Mulligan, M., Das, S. R., Yewdell, J. W., Mehta, A. K., Wilson, P. C., & Ahmed, R. (2012). Pandemic H1N1 influenza vaccine induces a recall response in humans that favors broadly cross-reactive memory B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(23), 9047–9052.
- Lin, C. H., Chang, T. T., Sun, M. F., Chen, H. Y., Tsai, F. J., Chang, K. L., Fisher, M., & Chen, C. Y. (2011). Potent inhibitor design against H1N1 swine influenza: structure-based and molecular dynamics analysis for M2 inhibitors from traditional Chinese medicine database. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 28(4), 471–482.
- Lin, L. T., Hsu, W. C., & Lin, C. C. (2014). Antiviral natural products and herbal medicines. *Journal of traditional and complementary medicine*, 4(1), 24–35.
- Liang, H., Wang, X., Chen, H., Song, L., Ye, L., Wang, S. H., Wang, Y. J., Zhou, L., & Ho, W. Z. (2008). Methamphetamine enhances HIV infection of macrophages. *The American journal of pathology*, 172(6), 1617–1624.

- Liu, Q., Ma, J., Strayer, D. R., Mitchell, W. M., Carter, W. A., Ma, W., & Richt, J. A. (2014). Emergence of a novel drug resistant H7N9 influenza virus: evidence based clinical potential of a natural IFN- α for infection control and treatment. *Expert review of anti-infective therapy*, 12(2), 165–169.
- Loregian, A., Mercorelli, B., Nannetti, G., Compagnin, C., & Palù, G. (2014). Antiviral strategies against influenza virus: towards new therapeutic approaches. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71(19), 3659–3683.
- Ma, C., Zhang, J., & Wang, J. (2016). Pharmacological Characterization of the Spectrum of Antiviral Activity and Genetic Barrier to Drug Resistance of M2-S31N Channel Blockers. *Molecular pharmacology*, 90(3), 188–198.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. , & Clark, D. P. (2009). ‘Essentials of Immunology’, in *Brock Biology of Microorganisms*. San Francisco: Pearson, 839– 899.
- Maga, G., Veljkovic, N., Crespan, E., Spadari, S., Prljic, J., Perovic, V., ... & Veljkovic, V. (2013). New in silico and conventional in vitro approaches to advance HIV drug discovery and design. *Expert opinion on drug discovery*, 8(1), 83-92.
- Manber, U., & Bigot P. (1997). *USENIX Symposium on Internet Technologies and Systems (NSITS'97)* Monterey, CA, pp. 231–239.
- Markland, W., McQuaid, T. J., Jain, J., & Kwong, A. D. (2000). Broad-spectrum antiviral activity of the IMP dehydrogenase inhibitor VX-497: a comparison with ribavirin and demonstration of antiviral additivity with alpha interferon. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(4), 859–866.
- Masoudi-Sobhanzadeh, Y., Omid, Y., Amanlou, M., & Masoudi-Nejad, A. (2020). Drug databases and their contributions to drug repurposing. *Genomics*, 112(2), 1087–1095.
- Matejin, S., Bukreyeva, N., Radosevic, D., Sencanski, M., Mantlo, E., Veljkovic, V., Glisic, S., & Paessler, S. (2019). In vitro anti-influenza activity of in silico repurposed candidate drug cycrimine. *Antiviral therapy*, 24(8), 589–593.
- Matsuzaki, Y., Katsushima, N., Nagai, Y., Shoji, M., Itagaki, T., Sakamoto, M., Kitaoka, S., Mizuta, K., & Nishimura, H. (2006). Clinical features of influenza C virus infection in children. *The Journal of infectious diseases*, 193(9), 1229–1235.
- McCloskey, M. A., & Poo, M. M. (1986). Rates of membrane-associated reactions: reduction of dimensionality revisited. *The Journal of cell biology*, 102(1), 88–96.
- McKimm-Breschkin, J. L., Jiang, S., Hui, D. S., Beigel, J. H., Govorkova, E. A., & Lee, N. (2018). Prevention and treatment of respiratory viral infections: Presentations on antivirals, traditional therapies and host-directed interventions at the 5th ISIRV Antiviral Group conference. *Antiviral research*, 149, 118–142.
- Medina, R. A., & García-Sastre, A. (2011). Influenza A viruses: new research developments. *Nature reviews. Microbiology*, 9(8), 590–603.
- Meijer, A., Rebelo-de-Andrade, H., Correia, V., Besselaar, T., Drager-Dayal, R., Fry, A., Gregory, V., Gubareva, L., Kageyama, T., Lackenby, A., Lo, J., Odagiri, T., Pereyaslov, D., Siqueira, M. M., Takashita, E., Tashiro, M., Wang, D., Wong, S., Zhang, W., Daniels, R. S., ... Hurt, A. C. (2014). Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2012-2013. *Antiviral research*, 110, 31–41.

- Mercorelli, B., Palù, G., & Loregian, A. (2018). Drug Repurposing for Viral Infectious Diseases: How Far Are We?. *Trends in microbiology*, 26(10), 865–876.
- Moeller, A., Kirchdoerfer, R. N., Potter, C. S., Carragher, B., & Wilson, I. A. (2012). Organization of the influenza virus replication machinery. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6114), 1631–1634.
- MOPAC2016, James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA, [HTTP://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net) (2016).
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16), 2785–2791.
- Mostafa, A., Abdelwhab, E. M., Mettenleiter, T. C., & Pleschka, S. (2018). Zoonotic Potential of Influenza A Viruses: A Comprehensive Overview. *Viruses*, 10(9), 497. <https://doi.org/10.3390/v10090497>
- Mould, J. A., Paterson, R. G., Takeda, M., Ohigashi, Y., Venkataraman, P., Lamb, R. A., & Pinto, L. H. (2003). Influenza B virus BM2 protein has ion channel activity that conducts protons across membranes. *Developmental cell*, 5(1), 175–184.
- Musharrafieh, R., Ma, C., & Wang, J. (2020). Discovery of M2 channel blockers targeting the drug-resistant double mutants M2-S31N/L26I and M2-S31N/V27A from the influenza A viruses. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*, 141, 105124.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S. & Pfaller, M. A. (2016): *Orthomyxoviruses*. *Medical Microbiology*, 8th ed., Elsevier Inc., Philadelphia, PA, 487.-495.
- Nagata, K., Kawaguchi, A., & Naito, T. (2008). Host factors for replication and transcription of the influenza virus genome. *Reviews in medical virology*, 18(4), 247–260.
- Nayak, D. P., Lehmann, S., & Reichl, U. (2005). Downstream processing of MDCK cell-derived equine influenza virus. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 823(2), 75–81.
- Nayak, D. P., Balogun, R. A., Yamada, H., Zhou, Z. H., & Barman, S. (2009). Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus research*, 143(2), 147–161.
- Nguyen, J. T., Smee, D. F., Barnard, D. L., Julander, J. G., Gross, M., de Jong, M. D., & Went, G. T. (2012). Efficacy of combined therapy with amantadine, oseltamivir, and ribavirin in vivo against susceptible and amantadine-resistant influenza A viruses. *PloS one*, 7(1), e31006.
- Nicholls, J. M., Moss, R. B., & Haslam, S. M. (2013). The use of sialidase therapy for respiratory viral infections. *Antiviral research*, 98(3), 401–409.
- O'Hanlon, R., & Shaw, M. L. (2019). Baloxavir marboxil: the new influenza drug on the market. *Current opinion in virology*, 35, 14–18.
- Osterhaus, A. D., Rimmelzwaan, G. F., Martina, B. E., Bestebroer, T. M., & Fouchier, R. A. (2000). Influenza B virus in seals. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5468), 1051–1053.
- Parveen,S., Alnoman, R.B., Bayazeed, A. A., & Alqahtani, A. M.(2020). Computational Insights into the Drug Repurposing and Synergism of FDA-approved Influenza Drugs Binding with SARS-CoV-2 Protease against COVID-19. *American Journal of Microbiological Research*, 8 (3), 93-102.

- Paterson, D., & Fodor, E. (2012). Emerging roles for the influenza A virus nuclear export protein (NEP). *PLoS pathogens*, 8(12), e1003019.
- Pastor, M., Cruciani, G., McLay, I., Pickett, S., & Clementi, S. (2000). GRIND-INdependent descriptors (GRIND): a novel class of alignment-independent three-dimensional molecular descriptors. *Journal of medicinal chemistry*, 43(17), 3233–3243.
- Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R., & Schacht, A. L. (2010). How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(3), 203–214.
- Perales, B., Sanz-Ezquerro, J. J., Gastaminza, P., Ortega, J., Santarén, J. F., Ortín, J., & Nieto, A. (2000). The replication activity of influenza virus polymerase is linked to the capacity of the PA subunit to induce proteolysis. *Journal of virology*, 74(3), 1307–1312.
- Peters, R. (2005). Translocation Through the Nuclear Pore Complex: Selectivity and Speed by Reduction-of-Dimensionality. *Traffic*, 6(5), 421–427.
- Perovic, V.(2013). Razvoj multifunkcionalne bioinformatičke platforme zasnovane na potencijalu elektron-jon interakcije bioloških molekula. Matematički fakultet, Univerzitet u Beogradu
- Pinto, L. H., Holsinger, L. J., & Lamb, R. A. (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, 69(3), 517–528.
- Pinto, L. H., & Lamb, R. A. (2006). The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *The Journal of biological chemistry*, 281(14), 8997–9000.
- Pizzorno, A., Abed, Y., & Boivin, G. (2011). Influenza drug resistance. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 32(4), 409–422.
- Pizzorno, A., Bouhy, X., Abed, Y., & Boivin, G. (2011). Generation and characterization of recombinant pandemic influenza A(H1N1) viruses resistant to neuraminidase inhibitors. *The Journal of infectious diseases*, 203(1), 25–31.
- Paessler, S., Huang, C., Sencanski, M., Veljkovic, N., Perovic, V., Glisic, S., & Veljkovic, V. (2018). Ibuprofen as a template molecule for drug design against Ebola virus. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 23, 947–953.
- Radovanov, J.(2016). Zastupljenost i karakterizacija influenza A virusa izolovanih iz respiratornih uzoraka pacijenata sa teritorije Južnobačkog okruga. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Radosevic, D., Sencanski, M., Perovic, V., Veljkovic, N., Prljic, J., Veljkovic, V., Mantlo, E., Bukreyeva, N., Paessler, S., & Glisic, S. (2019). Virtual Screen for Repurposing of Drugs for Candidate Influenza a M2 Ion-Channel Inhibitors. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 67.
- Rajput, A., Kumar, A., Megha, K., Thakur, A., & Kumar, M. (2021). DrugRepV: a compendium of repurposed drugs and chemicals targeting epidemic and pandemic viruses. *Briefings in bioinformatics*, 22(2), 1076–1084.
- Rebhan, M., Chalifa-Caspi, V., Prilusky, J., & Lancet, D. (1998). GeneCards: a novel functional genomics compendium with automated data mining and query reformulation support. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(8), 656–664.

- Resa-Infante, P., Jorba, N., Coloma, R., & Ortin, J. (2011). The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA biology*, 8(2), 207–215. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.14513>
- Rossmann, J. S., & Lamb, R. A. (2011). Influenza virus assembly and budding. *Virology*, 411(2), 229–236.
- Rudenko, L., Kiseleva, I., Krutikova, E., Stepanova, E., Rekestin, A., Donina, S., Pisareva, M., Grigorieva, E., Kryshen, K., Muzhikyan, A., Makarova, M., Sparrow, E. G., Torelli, G., & Kieny, M. P. (2018). Rationale for vaccination with trivalent or quadrivalent live attenuated influenza vaccines: Protective vaccine efficacy in the ferret model. *PloS one*, 13(12), e0208028.
- Schmidt, U., Struck, S., Gruening, B., Hossbach, J., Jaeger, I. S., Parol, R., Lindequist, U., Teuscher, E., & Preissner, R. (2009). SuperToxic: a comprehensive database of toxic compounds. *Nucleic acids research*, 37(Database issue), D295–D299.
- Sanner M. F. (1999). Python: a programming language for software integration and development. *Journal of molecular graphics & modelling*, 17(1), 57–61.
- Samji T. (2009). Influenza A: understanding the viral life cycle. *The Yale journal of biology and medicine*, 82(4), 153–159.
- Samwald, M., Jentsch, A., Bouton, C., Kallesøe, C. S., Willighagen, E., Hajagos, J., Marshall, M. S., Prud'hommeaux, E., Hassenzadeh, O., Pichler, E., & Stephens, S. (2011). Linked open drug data for pharmaceutical research and development. *Journal of cheminformatics*, 3(1), 19.
- Seifert, M. H., Wolf, K., & Vitt, D. (2003). Virtual high-throughput in silico screening. *Biosilico*, 1(4), 143-149.
- Sencanski, M., Radosevic, D., Perovic, V., Gemovic, B., Stanojevic, M., Veljkovic, N., & Glisic, S. (2015). Natural Products as Promising Therapeutics for Treatment of Influenza Disease. *Current pharmaceutical design*, 21(38), 5573–5588.
- Sencanski, M., Perovic, V., Pajovic, S. B., Adzic, M., Paessler, S., & Glisic, S. (2020). Drug Repurposing for Candidate SARS-CoV-2 Main Protease Inhibitors by a Novel In Silico Method. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(17), 3830.
- Shasha, D., Valinsky, L., Hershkowitz Sikron, F., Glatman-Freedman, A., Mandelboim, M., Toledano, A., Paran, Y., Ben-Ami, R., & Goldman, D. (2020). Quadrivalent versus trivalent influenza vaccine: clinical outcomes in two influenza seasons, historical cohort study. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26(1), 101–106.
- Sharp, K., Fine, R., & Honig, B. (1987). Computer simulations of the diffusion of a substrate to an active site of an enzyme. *Science*, 236(4807), 1460-1463.
- Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual review of biochemistry*, 69, 531–569.
- Smoluchowski, M. V. (1917). Versuch einer mathematischen Theorie der Koagulationskinetik kolloider Lösungen. *Z. phys. Chem*, 92(129-168), 9.
- Steinmetzer, T., Harges, K., Bottcher-Friebertshauer, E., & Garten, W. (2015). Strategies for the development of influenza drugs: basis for new efficient combination therapies. *Top Med Chem*, 15, 143-181.

Stevanovic, S., Sencanski, M., Danel, M., Menendez, C., Belguedj, R., Bouraiou, A., Nikolic, K., Cojean, S., Loiseau, P. M., Glisic, S., Baltas, M., & Garcia-Sosa, A. T. (2019). Synthesis, In Silico, and In Vitro Evaluation of Anti-Leishmanial Activity of Oxadiazoles and Indolizine Containing Compounds Flagged against Anti-Targets. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(7), 1282.

Stewart J. J. (2013). Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *Journal of molecular modeling*, 19(1), 1–32.

Sundararaj, S., Guo, A., Habibi-Nazhad, B., Rouani, M., Stothard, P., Ellison, M., & Wishart, D. S. (2004). The CyberCell Database (CCDB): a comprehensive, self-updating, relational database to coordinate and facilitate in silico modeling of Escherichia coli. *Nucleic acids research*, 32(Database issue), D293–D295.

Sundaram, M. E., & Coleman, L. A. (2012). Vitamin D and influenza. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 3(4), 517–525.

Sur, M., Lopez, M. J., & Baker, M. B. (2020). Oseltamivir. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Suzuki, Y., Ito, T., Suzuki, T., Holland, R. E., Jr, Chambers, T. M., Kiso, M., Ishida, H., & Kawaoka, Y. (2000). Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *Journal of virology*, 74(24), 11825–11831.

Takeda, M., Pekosz, A., Shuck, K., Pinto, L. H., & Lamb, R. A. (2002). Influenza a virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture. *Journal of virology*, 76(3), 1391–1399.

Tang, Y., Zaitseva, F., Lamb, R. A., & Pinto, L. H. (2002). The gate of the influenza virus M2 proton channel is formed by a single tryptophan residue. *The Journal of biological chemistry*, 277(42), 39880–39886.

Tarbet, E. B., Maekawa, M., Furuta, Y., Babu, Y. S., Morrey, J. D., & Smee, D. F. (2012). Combinations of favipiravir and peramivir for the treatment of pandemic influenza A/California/04/2009 (H1N1) virus infections in mice. *Antiviral research*, 94(1), 103–110.

Tintori, C., Manetti, F., Veljkovic, N., Perovic, V., Vercammen, J., Hayes, S., ...& Botta, M. (2007). Novel virtual screening protocol based on the combined use of molecular modeling and electron-ion interaction potential techniques to design HIV-1 integrase inhibitors. *Journal of chemical information and modeling*, 47(4), 1536–1544.

Tintori, C., Veljkovic, N., Veljkovic, V., & Botta, M. (2010). Computational studies of the interaction between the HIV-1 integrase tetramer and the cofactor LEDGF/p75: insights from molecular dynamics simulations and the informational spectrum method. *Proteins*, 78(16), 3396–3408.

Tosh, P.K., Jacobson, R.M., & Poland, G.A. (2010). Influenza vaccines: From surveillance through production of protection. *Mayo Clinic Proceedings*, 85(3):257-273.

Tonkens R. (2005). An overview of the drug development process. *Physician executive*, 31(3), 48–52.

Tong, X., Smith, J., Bukreyeva, N., Koma, T., Manning, J. T., Kalkeri, R., Kwong, A. D., & Paessler, S. (2018). Merimepodib, an IMPDH inhibitor, suppresses replication of Zika virus and other emerging viral pathogens. *Antiviral research*, 149, 34–40.

Todeschini, R. & Consonni, V. (2009). *Molecular Descriptors for Chemoinformatics* (2 volumes). WILEY-VCH, Weinheim (Germany).

Triana-Baltzer, G. B., Gubareva, L. V., Nicholls, J. M., Pearce, M. B., Mishin, V. P., Belser, J. A., Chen, L. M., Chan, R. W., Chan, M. C., Hedlund, M., Larson, J. L., Moss, R. B., Katz, J. M., Tumpey, T. M., & Fang, F. (2009). Novel pandemic influenza A(H1N1) viruses are potently inhibited by DAS181, a sialidase fusion protein. *PloS one*, 4(11), e7788.

Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, 31(2), 455–461.

Tsimring, L. S., Levine, H., & Kessler, D. A. (1996). RNA virus evolution via a fitness-space model. *Physical review letters*, 76(23), 4440–4443.

UniProt Consortium (2011). Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. *Nucleic acids research*, 39(Database issue), D214–D219.

U.S. Department of Health and Human Services. (2011). *Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations*, 31st edn. U.S. Government Printing Office, Washington DC.

Van-Tam, J., & Sellwood, C. (2009). *Introduction to pandemic influenza*. CABI Publishing, Wallingford, pp.217.

Varghese, J.N.(1999). Development of neuraminidase inhibitors as antiinfluenza virus drugs. *Drug Develop Res* ,46, 176-96.

Vavricka, C. J., Li, Q., Wu, Y., Qi, J., Wang, M., Liu, Y., Gao, F., Liu, J., Feng, E., He, J., Wang, J., Liu, H., Jiang, H., & Gao, G. F. (2011). Structural and functional analysis of laninamivir and its octanoate prodrug reveals group specific mechanisms for influenza NA inhibition. *PLoS pathogens*, 7(10), e1002249.

Veit, M., & Thaa, B. (2011). Association of influenza virus proteins with membrane rafts. *Advances in virology*, 2011, 370606.

Veljkovic, V., & Slavic, I. (1972). Simple General-Model Pseudopotential. *Physical Review Letters*, 29, 105-107.

Veljkovic, V. (1973). The dependence of the Fermi energy on the atomic number. *Physics Letters A*, 45(1), 41-42.

Veljkovic, V., & Lalovic, D. I. (1973). General model pseudopotential for positive ions. *Physics Letters A*, 45(1), 59-60.

Veljkovic, V. J., & Lalovic, D. I. (1976). Theoretical prediction of mutagenicity and carcinogenicity of chemical substances. *Cancer biochemistry biophysics*, 1(6), 295.

Veljkovic, V., & Lalovic, D. I. (1977). Simple theoretical criterion of chemical carcinogenicity. *Experientia*, 33, 1228–1229.

Veljkovic, V., & Lalovic, D. I. (1978). Correlation between the carcinogenicity of organic substances and their spectral characteristics. *Experientia*, 34(10), 1342-1343.

Veljkovic, V., & Ajdacic, V. (1978). Cytostatic activity of organic compounds and their average quasi-valence number. *Experientia*, 34(5), 639-641.

Veljkovic, V. (1980) *Theoretical approach to preselection of cancerogens and chemical carcinogenesis*. Gordon & Breach, New York

- Veljkovic, V., Mouscadet, J. F., Veljkovic, N., Glisic, S., & Debyser, Z. (2007). Simple criterion for selection of flavonoid compounds with anti-HIV activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17(5), 1226–1232.
- Veljkovic, V., Veljkovic, N., Este, J. A., Huther, A., & Dietrich, U. (2007). Application of the EIIP/ISM bioinformatics concept in development of new drugs. *Current medicinal chemistry*, 14(4), 441-453.
- Veljkovic, V., Niman, H. L., Glisic, S., Veljkovic, N., Perovic, V., & Muller, C. P. (2009). Identification of hemagglutinin structural domain and polymorphisms which may modulate swine H1N1 interactions with human receptor. *BMC structural biology*, 9, 62.
- Veljkovic, N., Glisic, S., Perovic, V., & Veljkovic, V. (2011). The role of longrange intermolecular interactions in discovery of new drugs. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 6(12), 1263-1270.
- Veljkovic, N., Glisic, S., Prljic, J., Perovic, V., & Veljkovic, V. (2012). Simple and General Criterion for " In Silico" Screening of Candidate HIV Drugs. *Current pharmaceutical biotechnology*, 14, 89.
- Veljkovic, V., Loiseau, P. M., Figadere, B., Glisic, S., Veljkovic, N., Perovic, V. R., Cavanaugh, D. P., & Branch, D. R. (2015). Virtual screen for repurposing approved and experimental drugs for candidate inhibitors of EBOLA virus infection. *F1000Research*, 4, 34.
- Veljkovic, V., Goeijenbier, M., Glisic, S., Veljkovic, N., Perovic, V. R., Sencanski, M., Branch, D. R., & Paessler, S. (2015). In silico analysis suggests repurposing of ibuprofen for prevention and treatment of EBOLA virus disease. *F1000Research*, 4, 104.
- Veljkovic, V., Glisic, S., Perovic, V., Paessler, S., Veljkovic, N., & Nicolson, G. L. (2016). Simple Chemoinformatics Criterion Using Electron Donor-Acceptor Molecular Characteristics for Selection of Antibiotics Against Multi-Drug-Resistant Bacteria. *Discoveries (Craiova, Romania)*, 4(3), e64.
- Veljkovic, V., Glisic, S., Perovic, V., Veljkovic, N., & Nicolson, G.N. (2016). Pomegranate (*Punica granatum*): a natural source for the development of therapeutic compositions of food supplements with anticancer activities based on electron acceptor molecular characteristics. *Functional Foods in Health and Disease*, 6(12):769-787.
- Von Itzstein M. (2007). The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nature reviews. Drug discovery*, 6(12), 967–974.
- Wang, M. Z., Tai, C. Y., & Mendel, D. B. (2002). Mechanism by which mutations at his274 alter sensitivity of influenza A virus nl neuraminidase to oseltamivir carboxylate and zanamivir. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(12), 3809–3816.
- Wang, C., Lamb, R. A., & Pinto, L. H. (1995). Activation of the M2 ion channel of influenza virus: a role for the transmembrane domain histidine residue. *Biophysical journal*, 69(4), 1363–1371.
- Wang, J., Wu, Y., Ma, C., Fiorin, G., Wang, J., Pinto, L. H., Lamb, R. A., Klein, M. L., & Degrado, W. F. (2013). Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(4), 1315–1320.
- Wang, J. (2016). M2 as a target to combat influenza drug resistance: what does the evidence say? *Future Virol.* 11, 1–4.
- Wiegel, F. W., & DeLisi, C. (1982). Evaluation of reaction rate enhancement by reduction in dimensionality. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 243(5), R475-R479.

Wise, H. M., Barbezange, C., Jagger, B. W., Dalton, R. M., Gog, J. R., Curran, M. D., Taubenberger, J. K., Anderson, E. C., & Digard, P. (2011). Overlapping signals for translational regulation and packaging of influenza A virus segment 2. *Nucleic Acids Research*, 39(17), 7775-7790.

Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Cheng, D., Shrivastava, S., Tzur, D., Gautam, B., & Hassanali, M. (2008). DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic acids research*, 36(Database issue), D901–D906.

Whittaker, G. R., & Digard, P. (2006). Entry and intracellular transport of influenza virus. In *Influenza Virology: Current Topics*, pp. 37-64.

WHO (2011) Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. WHO Press, Geneva, pp. 11.

WHO. (2013). Meeting of the WHO expert working group on surveillance of influenza antiviral susceptibility, Geneva, July 2013. *Weekly Epidemiological Record*, 44-45(88):477-488.

WHO Influenza (2018). Factsheet; March. Available online at: [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) (Accessed December 23, 2020).

Wright, P. F. & Webster, R. G. (2001). Orthomyxoviruses. In *Fields Virology*, 4 edn, pp. 1533-1579. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

Wu, Y., Canturk, B., Jo, H., Ma, C., Gianti, E., Klein, M. L., Pinto, L. H., Lamb, R. A., Fiorin, G., Wang, J., & DeGrado, W. F. (2014). Flipping in the pore: discovery of dual inhibitors that bind in different orientations to the wild-type versus the amantadine-resistant S31N mutant of the influenza A virus M2 proton channel. *Journal of the American Chemical Society*, 136(52), 17987–17995.

Wu, N. C., & Wilson, I. A. (2020). Influenza Hemagglutinin Structures and Antibody Recognition. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 10(8), a038778.

www.clinicaltrials.gov

www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process

www.w3.org/wiki/HCLSIG/LODD

Yang, Y., Adelstein, S. J., & Kassis, A. I. (2009). Target discovery from data mining approaches. *Drug discovery today*, 14(3-4), 147–154.

Zambon, M., & Potter, C.W. (2009). Zuckerman, A.J., Banatvala, J.E., Griffiths, P.D., Schoub, B.D., Mortimer, P., (eds.) *Principles and practice of clinical virology: 6th Edition*. New York: John Wiley & Sons Ltd., 373-408.

Zhao, Y., Ren, J., Harlos, K., Jones, D. M., Zeltina, A., Bowden, T. A., Padilla-Parra, S., Fry, E. E., & Stuart, D. I. (2016). Toremfifene interacts with and destabilizes the Ebola virus glycoprotein. *Nature*, 535(7610), 169–172.

Zheng, W., & Tao, Y. J. (2013). Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. *FEBS letters*, 587(8), 1206–1214.

Biografija autora

Draginja Radošević je rođena 03.01.1986 u Novom Sadu. Diplomirala je 2011. na Prirodno matematičkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, studijska grupa Molekularna biologija.

2011/12. godine upisala je doktorske akademske studije na Biološkom Fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija, smer Molekularna biologija prokariota.

Od 2011. do 2014. bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a od 2014. je zaposlena na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Primena EIIP/ISM bioinformatičke platforme u otkrivanju novih terapijskih targeta i potencijalnih terapijskih molekula“ (evidencioni broj: 173001).

U septembru 2013. je bila na studijskom boravku od mesec dana, sufinansiranom od strane Ministarstva za nauku Republike Srbije u Institutu CRESA - Centre de Recerca en Sanitat Animal, Bellaterra, Barcelona, Španija, gde je učestvovala u eksperimentima razvoja vakcine protiv influence.

Do sada je objavila 4 naučna rada, od toga je jedan u vrhunskom međunarodnom časopisiu, dva u istaknutim međunarodnim časopisima i jedan u nacionalnom časopisu. Pored toga ima i 5 saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Драгиња Радошевић

број индекса Б 3009/ 2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

In silico одабир лекова из базе DrugBank као потенцијалних инхибитора М2 протеина вируса грипа и провера њихове активности *in vitro*

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 15.07.2021.

Радошевић Драгиња

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Драгиња Радошевић

Број индекса Б3009/ 2011

Студијски програм Молекуларна биологија прокариота

Наслов рада *In silico* одабир лекова из базе DrugBank као потенцијалних инхибитора М2 протеина вируса грипа и провера њихове активности *in vitro*

Ментори Др Сања Глишић, научни саветник, Института за нуклеарне науке Винча Универзитета у Београду

Др Горан Брајушковић, редовни професор, Биолошког факултета Универзитета у Београду

Потписани/а Драгиња Радошевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 15. 07. 2021

Radjevic Draginja

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

In silico одабир лекова из базе DrugBank као потенцијалних инхибитора М2 протеина вируса грипа и провера њихове активности *in vitro*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 15.07.2021

Радослав Драговић

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.