

POSSIBILITIES OF PREVENTION AND TREATMENT OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS INFECTIONS INCLUDING NEW DRUGS AND COMPOUNDS WITH POTENTIAL APPLICATION

Anna Majewska¹, Beata Młynarczyk-Bonikowska^{2*}, Magdalena Malejczyk²,
Sławomir Majewski³, Grażyna Młynarczyk¹

¹ Chair and Department of Medical Microbiology, Medical University of Warsaw

² Department of Diagnostics of Sexually Transmitted Diseases

³ Department of Dermatology and Venereology

Received in March, accepted in June 2019

Abstract: Human Cytomegalovirus (hCMV) or human herpesvirus 5 (HHV5) is one of the most common pathogens. Studies indicate the presence of infection in 60–100% of individuals. The ability to cause asymptomatic, infection and a latency promotes the persistence and spread of the virus. hCMV infection is usually asymptomatic and does not require treatment, but in some cases especially in immunocompromised persons (e.g., transplant recipients, patients with hematological malignancies, untreated HIV infected individuals) symptoms can be serious and life-threatening. The paper presents drugs currently used for treatment or prevention of hCMV infection, as well as the prospect of new treatment options. Currently, ganciclovir or valganciclovir are used as the first-line drugs and foscarnet and cidofovir are used alternatively. These drugs usually allow to control hCMV infections, however, there are important limitations. These include the toxicity and the possibility of the development of resistance, including the cross-resistance to all four drugs because they have a common mechanism of action, inhibition of viral DNA polymerase. Therefore, the creation of new drugs, with different mechanisms of action, lower toxicity and better pharmacokinetic parameters is important. Recently, the new drug, letermovir have been registered. Letermovir acts as hCMV DNA terminase inhibitor and due to the different mechanism of action the drug is active against hCMV strains resistant to DNA polymerase inhibitors, and potentially can act synergistically with them. The other drugs that are in the research stage or clinical studies include: brincidofovir, a cidofovir derivative, maribavir, a competitive inhibitor of ATP, cyclopropavir, a guanosine analog and antiviral peptides.

1. Introduction – epidemiology of hCMV infections and prophylaxis schemes. 2. Drugs approved for use in the prevention and treatment of hCMV infections. 2.1. Nucleoside analogues: ganciclovir and valganciclovir. 2.2. Foscarnet. 2.3. Cidofovir. 2.4. Letermovir. 3. Compounds with potential use in the treatment of hCMV infections. 3.1. Brincidofovir. 3.2. Maribavir. 3.3. Cyclopropavir 3.4. Antiviral peptides. 4. Summary

MOŻLIWOŚCI ZAPOBIEGANIA I LECZENIA ZAKAŻEŃ LUDZKIM WIRUSEM CYTOMEGALII Z UWZGLĘDNIENIEM NOWYCH LEKÓW I ZWIĄZKÓW O POTENCJALNYM ZASTOSOWANIU

Streszczenie: Ludzki wirus cytomegalii (hCMV) czyli ludzki herpeswirus 5 (HHV-5) jest jednym z najpowszechniej występujących patogenów. Badania seroepidemiologiczne wykazują obecność zakażenia u 60–100% w zależności od badanej populacji. Zdolność do wywoływania zakażenia bezobjawowego oraz przechodzenia w fazę latencji sprzyja utrzymywaniu się i rozprzestrzenianiu wirusa w populacji. Zakażenie hCMV jest zwykle bezobjawowe i nie wymaga leczenia, jednak w niektórych przypadkach szczególnie u osób z obniżoną odpornością (np.: biorców przeszczepów, chorych z nowotworami hematologicznymi, nieleczonych osób zakażonych HIV) może mieć ciężki przebieg i stanowić zagrożenie dla zdrowia i życia. W pracy przedstawiono leki obecnie stosowane w terapii lub zapobieganiu wystąpieniu objawów zakażenia hCMV, a także perspektywy nowego leczenia. Zwykle jako leki I rzutu wykorzystywane są gancyclovir i walgancyclovir, a alternatywnie foscarnet i cidofovir. Leki te często pozwalają na kontrolowanie zakażeń hCMV, jednak istnieją istotne ograniczenia związane z ich stosowaniem. Należy do nich toksyczność i możliwość rozwoju lekooporności, łącznie z opornością krzyżową dotyczącą wszystkich czterech leków, gdyż posiadają wspólny mechanizm działania – hamują wirusową polimerazę DNA. Dlatego ważne jest stworzenie nowych leków o odmiennym mechanizmie działania, niższej toksyczności i lepszych parametrach farmakokinetycznych. Ostatnio zarejestrowano nowy lek – inhibitor kompleksu terminazy – letermowir, który ze względu na różny mechanizm działania jest aktywny wobec szczepów hCMV opornych na inhibitory polimerazy DNA, a także potencjalnie może wykazywać z nimi działanie synergistyczne. Obecnie trwają badania, w tym badania kliniczne, nad nowymi związkami, np.: pochodną cidofowiru, brincidofowirem, konkurencyjnym inhibitorem ATP, maribawirem i analogiem guanozyny, cyklopropawirem oraz nad peptydami przeciwwirusowymi.

1. Wprowadzenie – epidemiologia zakażeń hCMV i schematy profilaktyki zakażeń. 2. Leki zatwierdzone do stosowania w zapobieganiu i leczeniu zakażeń hCMV. 2.1. Analogi nukleozydów: gancyclovir i walgancyclovir. 2.2. Foscarnet. 2.3. Cidofovir. 2.4. Letermowir. 3. Związki o potencjalnym wykorzystaniu w leczeniu zakażeń hCMV. 3.1. Brincidofovir. 3.2. Maribawir. 3.3. Cyklopropawir 3.4. Peptydy przeciwwirusowe. 4. Podsumowanie

Key words: hCMV, nucleoside analogues, ganciclovir, letermovir

Słowa kluczowe: hCMV, analogi nukleozydów, gancyclovir, letermowir

* Corresponding author: hab. n. med. Beata Młynarczyk-Bonikowska, Department of Diagnostics of Sexually Transmitted Diseases, WUM, 82a Koszykowa Str, 02-008 Warsaw; e-mail: beata.mlynarczyk@wum.edu.pl

1. Introduction – epidemiology of hCMV infections and prophylaxis schemes

The human cytomegalovirus (hCMV) classified as human herpesvirus 5 (*Human herpesvirus 5*; HHV-5) belongs to the *Herpesviridae* family and is common in the human population. Based on the seroepidemiological tests, it was found that the infection can be observed in 60–100% of people, depending on the studied population. The rate of seroconversion depends on the geographical region and is particularly high in the developing countries.

The ability to cause latent infection (latency of the virus in macrophages, T lymphocytes and the endocrine gland cells) and persistent infection (constant replication and secretion of viruses without any clinical symptoms) are phenomena so epidemiologically unfavourable that they allow the rapid spread of the virus in the population. The primary infection most often occurs in childhood and in most cases, similarly to the secondary infections appearing among immunocompetent persons, has an asymptomatic or mild, and self-limiting course. Infection with this virus is a significant problem for patients with impaired function of the immune system. This group includes: people with primary immunodeficiencies, people with secondary immunodeficiencies caused by diseases of the immune system: leukemia and other hematological malignancies, infection with human immunodeficiency virus (Human immunodeficiency virus 1 or Human immunodeficiency virus 2; HIV-1, HIV-2), as well as people undergoing immunosuppressive treatment, patients on hemodialysis, and newborns due to the immaturity of the immune system [6, 7, 18, 31, 35, 36].

The currently available, approved and certified diagnostic methods allow for a quick and reliable confirmation of the infection, demonstration of viral replication, monitoring of the course of the infection and result in effective antiviral therapy. However, despite the diagnostic and therapeutic solutions in the form of antiviral drugs, the hCMV is still a significant cause of organ infections (most often: pneumonia, liver, retina, and intestinal diseases) as well as systemic disorder. It is also one of the most important viruses associated with the post-transplantation complications, transplant failure, as well as deaths among recipients of allogeneic hematopoietic cells (allo-HCT) and organs [1, 5, 19, 30, 35, 39].

The risk of a full-blown cytomegalovirus disease among transplant recipients depends on the immune status of the donor and the recipient (more often when the donor is seropositive and the recipient is seronegative), the type of transplant, and immunosuppression [2, 5, 10, 11, 19]. It was shown that dsDNA hCMV is detected in the plasma of 44–65% of patients following

the allogeneic hematopoietic cell transplantation within 180 days after the transplantation [6].

Pharmacological prophylaxis is used to prevent the hCMV disease, which is most often carried out as selective prophylaxis (the pre-emptive therapy). It involves the use of sensitive and specific diagnostic methods to systematically monitor the rate of virus replication (quantitative monitoring of DNA levels, less frequently RNA or pp65 antigenemia) before the occurrence of any clinical symptoms, and to evaluate the eligibility for chemoprophylaxis in order to prevent direct and indirect consequences of the infection. The advantage of this strategy is that it limits the number of people exposed to the toxic effects of antiviral drugs. In contrast, the universal prophylaxis involves the inclusion of pharmacotherapy within 10 days of the transplantation. This is mainly used among patients who are at a very high risk of developing a disease caused by the CMV infection. The use of chemoprophylaxis allows the reduction of morbidity and mortality as a result of cytomegalovirus infection, especially among patients after hematopoietic cell transplantation [2, 5, 12, 19, 20, 39].

In recent years, numerous antiviral drugs, mainly used in the treatment of the HIV infection and viral hepatitis caused by the Hepatitis B virus (HBV) and Hepatitis C virus (HCV), have been developed and registered [22, 23]. Much attention is also devoted to the viral infections among patients with immunosuppression. Currently, intravenous ganciclovir (GCV) and oral L-valyl ester of ganciclovir-valganciclovir (VGCV) are considered in the control of hCMV infections. Alternatively, in the case of resistance to these inhibitors or the occurrence of unacceptable side effects, the second and third choice drugs are used, i.e. foscarnet (PFA) and cidofovir (CDV). In 1998, the drug indicated for the treatment of cytomegalovirus retinitis among patients with AIDS, fomivirsen, was approved. Fomivirsen is an antisense, intravitreal oligonucleotide with a DNA sequence complementary to mRNA, which hybridises with the mRNA fragments to form an mRNA-DNA structure that ultimately prevents the synthesis of viral proteins.

Fomivirsen was used as a second choice drug when the standard therapies were ineffective or contraindicated. In 2002, due to the presence of adverse side effects (anterior uveitis, cataracts, and toxic retinopathy), fomivirsen was withdrawn from the market at the request of the holder of the marketing authorisation [1].

The structural formulas of the drugs approved for use in the prevention and treatment of CMV infections can be found in Fig. 1.

Despite the availability of several formulations that inhibit the hCMV replication, there is still a need for new therapeutics. All of the mentioned drugs are DNA

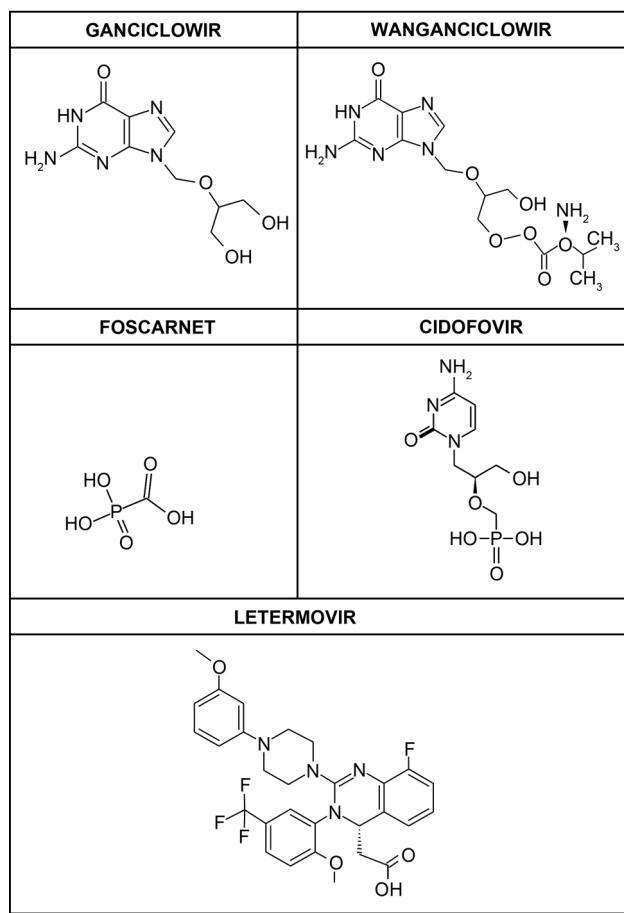


Fig. 1. Drugs approved for use in the prevention and treatment of hCMV infections ganciclovir, vanganciclovir.

polymerase inhibitors. Due to the common mechanism of action, they are not effective in the treatment of patients infected with strains of the virus with a mutation in the *UL54* gene that results in cross-resistance to nucleoside analogues (GCV, VGCV), as well as PFA and CDV [1, 5, 14, 30]. In November 2017, letermovir (Prevymis; Merck Sharp & Dohme Ltd.) joined the list of anti-megaloviral drugs, and several other preparations are tested *in vitro* and in clinical studies [21, 30].

2. Drugs approved for use in the prevention and treatment of hCMV infections

2.1. Nucleoside analogues: ganciclovir and valganciclovir

Ganciclovir (GCV) is a synthetic, acyclic analogue of guanosine. After entering the cell, it is transformed into a biologically active phosphate derivative. This process is possible with the participation of the *UL97* protein kinase. The next two phosphorylations take place with the participation of cellular kinases. The active drug form, ganciclovir triphosphate (GCV-TP), is a substrate

for the viral DNA polymerase. Therefore, the antiviral effect results from the inhibition of the viral DNA synthesis in the mechanism of the competitive incorporation of the deoxyguanosine triphosphate into the DNA chain [14, 16, 19]. Ganciclovir is structurally similar to acyclovir; however, the introduction of an additional hydroxyl group has expanded the drug activity; in addition to alphaherpesviruses (Human herpesvirus 1 and Human herpesvirus 2 i.e. herpes simplex virus 1 and 2; HSV-1 and HSV-2, and Human herpesvirus 3 i.e. Varicella zoster virus; VZV), ganciclovir inhibits the replication of the Epstein-Barr virus (*Human herpesvirus 4*; EBV), the cytomegalovirus (CMV), the human herpesviruses 6, 7 and 8 (HHV-6, HHV-7, HHV-8), and the hepatitis type B virus (HBV). Ganciclovir is used parenterally. When administered intravenously, it reaches the maximum concentration after 5 hours. It penetrates well into tissues and the central nervous system. Until 2004, it was also available in the form of an oral drug, but due to the low bioavailability (5%) it was replaced with valganciclovir [5, 14, 19, 20, 33]. The most important and very common side effect of the drug is neutropenia. Among 20–30% of people taking ganciclovir, there is an occurrence of bone marrow suppression, renal hepatic dysfunction and liver dysfunction. The neurotoxic effects of the drug have also been described [5, 11, 14, 18, 33]. Since 1994, ganciclovir has been the drug of choice for the treatment of the cytomegalovirus infection [3]. This pharmaceutical is part of a chemotherapy protocol in stem cell and organ recipients. It has been shown that in cells infected with hCMV ganciclovir reaches a concentration up to 100 times higher than in non-infected cells, and its use in the early stage of infection increases its effectiveness. The drug does not inhibit the latent form of the virus; therefore, 20–30% of patients experience relapses [14]. Long-term exposure to GCV and the use of suboptimal doses may contribute to the selection of resistant strains. The scale of the drug resistance is not precisely understood. It was demonstrated that the problem of resistance to ganciclovir may affect 1.5–10% of organ transplant recipients and 0–14.5% of hematopoietic cells recipients [16, 32]. The risk of drug resistance is higher in the case of high-level immunosuppression and long-term GCV administration [4, 5]. Resistance is most often associated with the *UL97* gene mutation (the most common mutations: M460V/I, H520Q, C592G, A549V, L595S, C603W, L595E, L595W), which encodes a kinase necessary for the phosphorylation of the drug. The amino acid substitutions and small deletions do not have a significant effect on the virus's ability to replicate. Mutations in the *UL54* gene encoding DNA polymerase are less common; changes in this area may result in resistance to cidofovir and/or foscarnet, and cross-resistance to ganciclovir, foscarnet and cidofovir.

In the *in vitro* environment, such strains have an attenuated phenotype, i.e. their virulence is reduced and they multiply more slowly when compared to the wild virus strains. Combinations of mutations in the *UL97* and *UL54* genes multiply the effect of each individual mutation, provide a high level of drug resistance, and can cause an increase in the GCV EC_{50} values up to 15-fold [3, 5, 11, 19, 21, 30, 32].

Valganciclovir is the L-valyl ester salt of ganciclovir (VGCV). When administered orally, it is well absorbed and is converted into ganciclovir by intestinal and liver esterases.

The bioavailability of the drug is 60%, which is about 10 times higher than that of ganciclovir, and the maximum serum concentration is reached after 1–3 hours [5, 12, 14]. Valganciclovir was first approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of the hCMV-induced retinitis among AIDS patients. It is used in the prevention of symptoms of the disease associated with hCMV among organ transplantation patients and prophylactically among recipients of the hematopoietic cells. Similarly to ganciclovir, valganciclovir is excreted by the kidneys and has the same mechanism of action and toxicity profile [12, 14, 33].

2.2. Foscarnet

Foscarnet (phosphonoformic acid; PFA) is an anhydride of phosphonoformic acid and an analogue of pyrophosphate [20, 27]. Foscarnet is a broad-spectrum antiviral agent effective against viruses, which have DNA as their genetic material (HSV, VZV, EBV, HHV-6, HBV) and HIV. It was approved for the treatment of infections caused by the cytomegalovirus in 1991. Its mechanism of action is based on the direct inhibition of DNA polymerase by competitively blocking the pyrophosphate binding site, consequently blocking the deoxyribonucleic acid chain extension. In contrast to the previously described inhibitors, foscarnet does not need to be activated by kinases [4, 27, 30]. Due to the fact that the bioavailability of foscarnet is low, the drug is administered intravenously and over 80% of it is excreted in the urine in an unchanged form. The half-life ($T_{1/2}$) of PFA is 48 hours. Good penetration through the blood-cerebrospinal fluid barrier allows it to be used in the central nervous system infections. Foscarnet is used in the treatment of HIV-infected patients with symptoms of retinitis with etiology of hCMV. It is also utilised in the treatment of infections caused by the aciclovir-resistant HSV strains and hCMV resistant to ganciclovir. Cross-resistance to ganciclovir and foscarnet is detected less often than the resistance to ganciclovir and cidofovir [3, 19, 32]. An important limitation of using the drug is nephrotoxicity, e.g. interstitial nephritis, acute renal tubular necrosis. Other adverse reac-

tions include liver problems, gastrointestinal disorders (nausea, vomiting), leukopenia, and anaemia. Foscarnet has the ability to chelate divalent metal ions, thus causing electrolyte imbalance, mainly calcium, phosphorus, potassium, and magnesium. Due to the accumulation of the drug in the urine some of the patients suffer from the penile glans ulceration [4, 14, 27, 32].

The foscarnet resistance is associated with mutation(s) within the *UL54* gene. The amino acids substitutions in the protein result in limited susceptibility to binding to the drug. Some of these mutations, e.g. N495K, D588E, T700A, V715M, E756D/N/Q and T838A, are resistant only to foscarnet. A number of other amino acid substitutions are responsible for cross-resistance to ganciclovir and cidofovir. Some substitutions or deletions (e.g. Q578, D588N, T700A, V715M, E756D/N/Q, V781I, V787L, L802M, A809V, V812L, and A834) induce a 3–5-fold decrease in the sensitivity to foscarnet. In the hCMV strains resistant to all polymerase inhibitors, the deletion of del 981–982 has been demonstrated [8, 19, 34]. Currently, there is no data on the incidence of the hCMV resistance to foscarnet; however, it is thought that the resistance index associated with modification in *UL54* as a result of long-term treatment with foscarnet is the same as for ganciclovir and cidofovir [5].

2.3. Cidofovir

Cidofovir (CDV) is an analogue of nucleoside monophosphate (cytidine). Due to the presence of phosphate in the molecule it does not require the first stage of intracellular phosphorylation; hence, it also inhibits the replication of viruses that do not have thymidine kinase. The active metabolite is cidofovir diphosphate. Phosphorylation occurs with the participation of cellular kinases (pyrimidine nucleoside monophosphate kinase, pyruvate kinase, creatine kinase, nucleoside diphosphate kinase), whose levels increase in the cells infected with hCMV. CDV is a competitive inhibitor of viral DNA polymerases, thus it inhibits the DNA elongation [4, 30, 20]. The drug is currently used for the treatment of retinitis among patients with AIDS (registered in 1996), for the treatment of infections caused by the aciclovir- and foscarnet-resistant herpes, and hCMV resistant to ganciclovir and foscarnet. It also exhibits antiviral activity against other DNA viruses: VZV, adenoviruses (HAdVs), polyomaviruses, human papillomaviruses (HPVs), as well as orthomyxoviruses belonging to the RNA viruses [4, 14, 32]. The EC_{50} value of cidofovir towards hCMV is between 0.1 and 0.8 μM [30]. In most cases, the resistance to CDV also means resistance to ganciclovir [19]. The serious restrictions concerning the drug usage are nephrotoxicity and low oral bioavailability. The drug is available in the form

of preparations requiring intravenous infusions, which prevents its use in outpatient treatment. The concentration of cidofovir in the kidney cells is 100 times higher than in other tissues, which explains the drug-related proximal tubular injury manifested by proteinuria and glycosuria [18, 30, 32]. For this reason, CDV is the second-line drug used in the treatment of ganciclovir-resistant viral infections [4, 19]. Its use is currently very limited. In many European countries, including Poland, the drug is available for the treatment of individual cases via direct import [16].

2.4. Letermovir

Letermovir (LTV, Prevymsis[®]) is a novel antiviral drug, belonging to a new class of chemical compounds – quinazolines. It has a narrow spectrum of activity, focused on CMV, and a mechanism of action, which is different from the drugs used so far [16, 21]. The target site of letermovir is the terminase complex composed of proteins, gene products of *UL51*, *UL56* and *UL89*. The pUL56 subunit exhibits ATPase activity and is the main site of action of the drug. pUL89 exhibits ATPase and endonuclease activity, and pUL51 has not been well characterised so far. As a terminase complex inhibitor, letermovir inhibits the replication of hCMV at the stage of the viral DNA maturation and its packaging into the capsid. The first stage of this process is catalysed by pUL89 and involves binding of the terminase complex to the *pac* sequence and cleavage of the concatemeric DNA. The viral DNA/terminase complex subsequently binds to the apex of the formed procapsid, through which the DNA of a single unit length, obtained after cleaving the fragment from the DNA chain, moves. The process of genetic translocation requires energy, which is generated by ATPase [5, 11, 30, 32]. A specific indication for administering letermovir is the prevention of hCMV infection and cytomegalovirus disease in adult hCMV-seropositive haematopoietic cell recipients. The drug is available in an oral form (240 mg or 480 mg tablets) and as a concentrate for preparing an infusion solution. The recommended dose is 480 mg administered once a day, orally or intravenously, for a period of one hour up to a hundred days after the transplant [19, 24, 32]. Letermovir is tolerated well and its oral bioavailability is 35%. The drug reaches maximum concentration in the serum approximately 1.5 hours following the oral administration, and its half-life is 10 hours. Letermovir is excreted with bile in an unchanged form [30]. The most commonly reported adverse reactions include nausea, diarrhoea and vomiting, which are found in 7.2%, 2.4% and 1.9% of those taking LTV, respectively. Clinical trials have not demonstrated any haemotoxic or nephrotoxic effects of the drug [11, 23]. Letermovir shows high efficacy against cytomegalovirus.

It is about 1000 times more active than ganciclovir [30]. Phase 3 clinical trials were conducted using the double-blind method and involved 570 CMV-seropositive adult haematopoietic cell recipients, randomly (2:1) assigned the letermovir or placebo therapies. The drug was found to be more effective than placebo in preventing CMV from reactivating for up to 14 weeks after transplantation. Within 24 weeks from the transplantation, symptoms of infection with the virus occurred in 37.5% of patients receiving letermovir and in 61% of those receiving the placebo. Moreover, a lower mortality rate was observed within 24 weeks from the transplantation in patients receiving letermovir (10%) compared to those receiving the placebo (16%) [16, 24, 30]. In hCMV-infected cell culture studies, it was observed that administration of letermovir together with ganciclovir or cidofovir resulted in synergistic effects. The combination of these medications may be an interesting strategy in the prevention and treatment of cytomegalovirus disease [30]. Letermovir is also active against hCMV strains that are resistant to other anti-cytomegaloviral drugs [3, 30]. However, mutations associated with the drug resistance have been described. Most often, they occur in the *UL56* gene, much less frequently in the *UL89* and *UL51* genes [30]. Resistance to letermovir has been evaluated using the results of *in vitro* tests and clinical trials. The substitutions responsible for the resistance were located in codon 25 and in between codons 229–369 of the pUL56 subunit [19, 30]. In the AD169 hCMV strain, the following amino acid substitutions were described: V231L, V236M, L241P, C325Y, R369G, R369M and R369S, which correlated with an increase in the EC₅₀ of the drug by 5, 45, 160, 8796, 4, 13 and 38 times, respectively [30].

Mutations in the *UL56* gene conferring resistance to LMV have minimal or no effect on the efficiency of the virus replication compared to the wild-type hCMV viruses.

Less common are mutations in the conserved region of subunit V of the protein encoded by *UL89* (N320H, N329S, D344E and T350M); individual changes cause low-level resistance to letermovir. However, the coexistence of a D344E substitution in pUL89 with one of the substitutions, such as E237D, F261L, M329T or Q204R, in pUL56 increases the EC₅₀ of the drug. A mutation in the *UL51* (P91S) gene associated with letermovir resistance has also been observed [21, 20]. The first clinical LTV-resistant isolate was obtained from a patient in phase 2b clinical trials. The patient received a suboptimal dose of the drug (60 mg) and the failure of the treatment was associated with the mutation in *UL56*. The presence of the V236M substitution, as well as the C325W, C325F and C325Y substitutions demonstrated in strains isolated from other patients was associated with a high level of resistance to LMV. The results

suggest that mutations associated with letermovir resistance occur relatively easily and quickly, therefore, the drug should be used with caution outside of the indicated scope and most importantly, the treatment should be monitored to check for drug resistance [30].

3. Compounds with potential use in the treatment of hCMV infections

3.1. Brincidofovir

Brincidofovir (BCV; CMX001) is a prodrug containing a synthetic, acyclic monophosphate nucleotide analogue (cidofovir) conjugated to a lipid (3-hexadecyloxy-1-propanol) via a phosphonate group. The structures of brincidofovir and other compounds with potential use in the treatment of CMV infections are shown in Fig. 2.

Following the entry into the cell and cleavage of the lipid chain, the released cidofovir monophosphate is phosphorylated by intracellular kinases to cidofovir diphosphate (CDV-DP). The drug is an alternative substrate for DNA polymerase. The incorporation of cidofovir into the viral DNA blocks the deoxyribonucleic acid chain elongation. Brincidofovir has a broad spectrum of antiviral activity. Cell culture studies

were used to evaluate its activity against various DNA viruses: herpesviruses (VZV, CMV, EBV, HHV-6), polyomaviruses (BK virus, BKV), adenoviruses, and papillomaviruses [15, 16, 37, 38]. Brincidofovir is characterised by a better bioavailability when administered orally in comparison with cidofovir. It achieves an over 100 times higher intracellular concentration than CDV, and its antiherpesvirus activity (HSV, CMV, VZV) is up to 1000 times higher in comparison to cidofovir, as well as ganciclovir and foscarnet.

In vitro tests and studies using animal models have demonstrated a synergistic effect of brincidofovir and acyclovir on inhibiting HSV replication [32].

Administered intravenously, the drug has no myelotoxic activity. It is also not nephrotoxic, probably because unlike cidofovir, it is not a substrate for human organic anion transporters (OAT1), located in the proximal convoluted tubule [30, 37]. Brincidofovir showed promising outcomes in preclinical trials; however, the disappointing results of phase 3 clinical trials, which evaluated its efficacy in preventing diseases associated with hCMV infection in seropositive patients with allogeneic hematopoietic cell transplantation, have slowed down its introduction into the clinic. Nevertheless, the initial enthusiasm for the drug has not waned, and the tests using brincidofovir in the prevention of hCMV infection in hematopoietic stem cell (HSC) patients continue, as the control of infection in this group of patients is still severely limited [29, 32]. Currently, recruitment is planned for a randomised, controlled, open, multi-centre clinical trial evaluating tolerance, pharmacokinetics, and anti-adenovirus activity of BCV administered intravenously at different doses (NCT03532035). In addition, an open, randomised, multi-centre parallel study has commenced with a goal of assessing the safety, tolerability and antiviral activity of brincidofovir. Furthermore, evaluation of the effectiveness of this drug compared to the standard care for paediatric patients receiving allogeneic haematopoietic cells and being at risk of adenovirus infection has also taken place (NCT03339401). Adverse effects of the drug include gastrointestinal disorders [16, 25, 30].

3.2. Maribavir

Maribavir (MBV; 1263W94) is a competitive inhibitor of ATP. It binds specifically to the serine/threonine protein kinase UL97, which mediates one of the final stages of viral replication, inhibiting its encapsidation and releasing viruses from infected cells. The drug has been studied *in vitro* for many years and is a subject of clinical trials [4, 16, 30, 32]. Maribavir does not require intracellular phosphorylation. *In vitro* studies have shown that it is over 10 times more active against CMV than ganciclovir. The EC_{50} of the preparation is

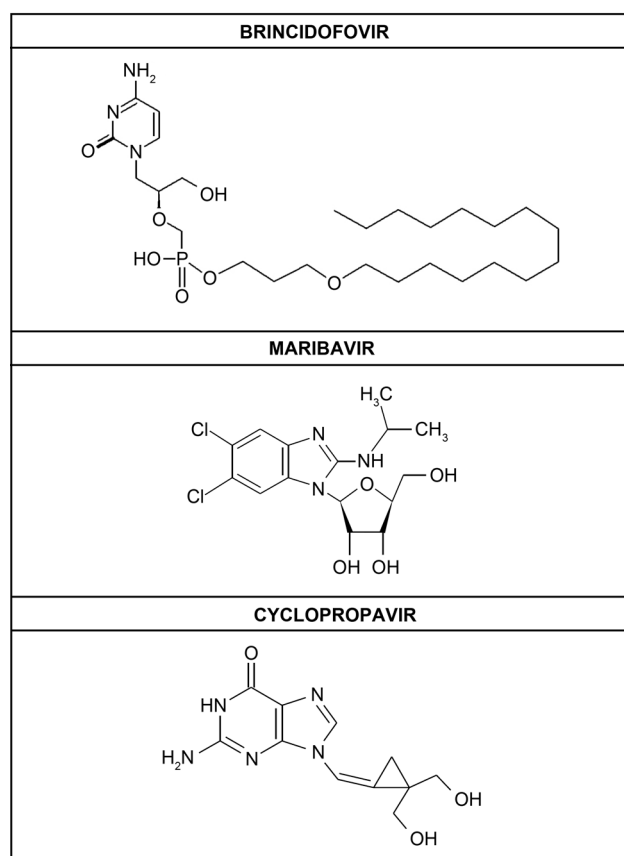


Fig. 2. Compounds showing potential for the use in the treatment of hCMV infections.

approximately 0.3 μM [30]. The antiviral activity of the formulation also applies to CMV strains resistant to ganciclovir and cidofovir. Maribavir is characterised by good bioavailability following oral administration [30, 32]. Results of clinical trials demonstrated that the drug is well tolerated, and its haematotoxicity is lower than that of ganciclovir and valganciclovir. It also displays no nephrotoxicity [16, 30, 32]. A randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial investigated the efficacy of maribavir in the prophylaxis against hCMV in adults after allogeneic stem cell transplantation (allo-HSCT). MBV (100 mg, BID) and placebo were administered for a period of 12 weeks. After 6 months of observation, the incidence of cytomegalovirus disease in the first 6 months following the transplantation was 4% in those taking maribavir and 5% in those taking placebo. These observations resulted in the discontinuation of the phase 2 trial, which tested the effectiveness of the drug in the prevention of hCMV disease in the liver transplant recipients [13, 32]. Despite these disappointing results, it is recognised that maribavir may have other applications in transplant patients; therefore, studies involving this preparation continue. Currently, two groups are being recruited for phase 3 clinical trials, in which the efficacy and safety of maribavir and valganciclovir will be compared in the treatment of cytomegalovirus infection in asymptomatic haematopoietic cell transplant recipients (NCT02927067). The efficacy and safety of using maribavir to treat transplant recipients with infections caused by cytomegalovirus resistant to ganciclovir, valganciclovir, foscarnet or cidofovir will also be evaluated (NCT02931539) [32].

In a cell culture study, it was shown that DNA polymerase inhibitors (cidofovir and foscarnet) in combination with maribavir act synergistically [30]. Similarly, an enhancement of antiviral activity was observed after co-administration of letermovir and maribavir in the cell culture. In contrast, maribavir and ganciclovir show antagonistic activity. This is because the inhibition of UL97 kinase caused by maribavir negatively influences the phosphorylation of ganciclovir [9, 16, 32]. Maribavir also inhibits the EBV replication *in vitro* [1].

In addition to maribavir, other UL97 kinase inhibitors with potential anti-cytomegalovirus activity have been synthesised. Included in them are: indolocarbazoles, quinazolines and benzimidazole analogues; however, so far none of the preparations have been investigated in as much detail as maribavir [3, 4].

3.3. Cyclopropavir

Cyclopropavir (CPV; MBX-400) is a second generation nucleoside analogue of 2-deoxyguanosine (guanosine nucleoside analogue). The first generation drugs are bioisosteric analogues of aciclovir. The new

generation of nucleoside analogues arose as a result of a structural change, i.e. the replacement of the acyclic C-O-C group with methylcyclopropane. Cyclopropavir is structurally most similar to ganciclovir [4]. *In vitro* tests have shown that CPV has approximately 10 times higher (EC_{50} 0.46 μM) anti-cytomegalovirus activity than ganciclovir, probably as a result of the accumulation of the drug in the infected cells at a higher concentration without causing toxicity. CPV has also been demonstrated to be active *in vitro* against other human herpesviruses including VZV, HHV-6A, HHV-6B and HHV-8. Similarly to ganciclovir, cyclopropavir requires phosphorylation to monophosphate by a viral kinase (pUL97), as well as further phosphorylations, in which cellular kinases are involved. The drug inhibits the replication of viral DNA by inhibiting DNA polymerase and/or incorporation into the viral DNA, resulting in the termination of DNA elongation [4, 29]. As with other nucleoside analogues, it appears that valylated cyclopropavir ester may have improved pharmacokinetic properties [7, 17, 29, 40].

Currently, phase 1 trials are being conducted to assess the safety and pharmacokinetics of cyclopropavir administered in healthy volunteers at various doses [4].

3.4. Antiviral peptides

It is believed that peptide drugs may be an alternative for the treatment of viral infections. So far, studies have been concerned with their mechanism of action against viruses causing respiratory infections [41], HBV [28] and HIV (fusion inhibitors: enfuvirtide, sifuvirtide, albuvirtide, and other peptides showing structural similarity to peptides found in the HIV capsid proteins) [18, 23, 26]. Antiviral proteins act as inhibitors, interfering with various stages of virus replication, e.g. they can inhibit viral attachment, cell entry, replication or release from the cell [18]. hCMV attaches to the host cell via heparan sulfate proteoglycans (HSPG). The viral gB and gM/gN glycoproteins interact with negatively charged sulfate residues, resulting in attachment of the hCMV virion to the host cell. This triggers a cascade of signals, which in effect allows the virus to enter the cell. HSPGs are present on most host cells, which explains the fact that hCMV can infect many types of human cells. HS binding peptides can, therefore, effectively inhibit hCMV infection [18].

4. Summary

The history of antiviral chemotherapy began over 50 years ago. From 1962 to May 2019, 99 antiviral drugs were registered. Some of those were withdrawn due to poor antiviral activity, rapid emergence of resistance

or toxicity. A vast majority of approved medications is intended for the treatment of patients infected with HIV and hepatitis B and C viruses (HBV and HCV). Causative antiviral treatment, more or less effective, is also available for infections caused by herpesviruses, among which hCMV requires the most attention. Letermovir was added to the list of anti-cytomegalovirus drugs in 2017, and several other medications are being tested *in vitro* or are in advanced stages of clinical trials. This raises hope for the emergence of new treatment methods, possibly with the use of a combination of chemotherapeutic agents in order to maximise the therapeutic effect and, consequently, to improve the prevention and treatment of symptoms of the hCMV infection in humans.

Acknowledgements

The article was translated by EURO-ALPHABET from Polish into English under agreement 659 / P-DUN / 2018 and funded by the Ministry of Science and Higher Education.

References

1. Biron K.K.: Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res.* **71**, 154–163 (2006)
2. Bocian J., Januszkiewicz-Lewandowska D.: HCMV infections after hematopoietic stem cell transplantation – diagnostic methods and importance of viral DNA level monitoring. *Post. Hig. Med. Dosw.* **69**, 252–263 (2015)
3. Bright P.D., Gompels M., Donati M., Johnston S.: Successful oral treatment of ganciclovir resistant cytomegalovirus with maribavir in the context of primary immunodeficiency: First case report and review. *J. Clin. Virol.* **87**, 12–16 (2017)
4. Britt W.J., Prichard M.N.: New therapies for human cytomegalovirus infections. *Antiviral Res.* **159**, 153–174 (2018)
5. Chaer F.E., Shah D.P., Chemaly R.F.: How I treat resistant cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood*, **128**, 2624–2636 (2016)
6. Chemaly RF, Hill J., Voigt S., Peggs KS.: *In vitro* comparison of currently available and investigational antiviral agents against pathogenic human double-stranded DNA viruses: A systematic literature review. *Antiviral Res.* **163**, 50–58 (2019)
7. Chen H., Li C., Zemlicka J., Gentry B.G., Bowlin T.L., Coena D.M.: Potency and stereoselectivity of cyclopropavir triphosphate action on human cytomegalovirus DNA Polymerase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 4176–4182 (2016)
8. Chou S.: Foscarnet resistance mutations mapping to atypical domains of the cytomegalovirus DNA polymerase gene. *Antiviral Res.* **138**, 57–60 (2017)
9. Chou S., Ercolani R.J., Derakhchan. K.: Antiviral activity of maribavir in combination with other drugs active against human cytomegalovirus. *Antiviral Res.* **157**, 128–133 (2018)
10. Czarnecka P., Czarnecka K., Tronina O., Durlik M.: Cytomegalovirus disease after liver transplant—a description of a treatment-resistant case: a case report and literature review. *Transplant Proc.* **50**, 4015–4020 (2018)
11. Dadwal S.S.: Update on prevention of cytomegalovirus in hematopoietic cell transplantation. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **32**, 63–68 (2019)
12. Dęborska-Materkowska D., Durlik M.: Leczenie zakażenia wirusem cytomegalii po transplantacji nerki. *Forum Nefrologiczne*, **3**, 162–168 (2010)
13. Durlik M.: Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Nefrol. Dial. Pol.* **13**, 157–163 (2009)
14. Dzieciatkowski T., Rola A., Majewska A., Solarz M., Łuczak M.: Leki stosowane w leczeniu zakażeń herpeswirusami u ludzi. *Post. Mikrobiol.* **46**, 211–221 (2007)
15. Foster S.A., Parker S., Lanier R.: The role of brincidofovir in preparation for a potential smallpox outbreak. *Viruses*, **9**, 320 (2017)
16. Frange P., Leruez-Ville M.: Maribavir, brincidofovir and letermovir: efficacy and safety of new antiviral drugs for treating cytomegalovirus infections. *Med. Mal. Infect.* **48**, 495–502 (2018)
17. Gentry B.G., Drach J.C.: Metabolism of cyclopropavir and ganciclovir in Human Cytomegalovirus-infected cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 2329–2333 (2014)
18. Jackson J.W., Hancock T.J., Dogra P., Patel R., Arav-Boger R., Williams A.D., Kennel S.J., Wall J.S., Sparer T.E.: Anticytomegalovirus peptides point to new insights for CMV entry mechanisms and the limitations of *in vitro* screenings. *mSphere*, **13**, e00586–18 (2019)
19. Koval C.E.: Prevention and treatment of cytomegalovirus infections in solid organ transplant recipients. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **32**, 581–559 (2018)
20. Leśnikowski Z.J., Paradowska E., Przepiórkiewicz M., Bogusława-Olejniczak A., Emery V.: Leki przeciwko ludzkiemu wirusowi cytomegalii (hCMV). *Pol. Merkur. Lek.* **XIII**, 242–249 (2002)
21. Ligat G., Cazal R., Hantz S., Alain S.: The human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target: a close-up view. *FEMS Microbiol. Rev.* **42**, 137–145 (2018)
22. Majewska A., Młynarczyk-Bonikowska B., Malejczyk M., Majewski S., Młynarczyk G.: Antiviral medication in sexually transmitted diseases. Part III: Hepatitis B, Hepatitis C. *Mini Rev. Med. Chem.* **17**, 328–337 (2017)
23. Majewska A., Młynarczyk-Bonikowska B., Malejczyk M., Młynarczyk G., Majewski S.: Antiviral medication in sexually transmitted diseases. Part II: HIV. *Mini Rev. Med. Chem.* **15**, 93–103 (2015)
24. Marty F.M., Badshah C. i wsp.: Letermovir prophylaxis for cytomegalovirus in hematopoietic-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* **377**, 2433–2444 (2017)
25. McIntosh M., Hauschild B., Miller V.: Human cytomegalovirus and transplantation: drug development and regulatory issues. *J. Virus Erad.* **2**, 143–148 (2016)
26. Mizuguchi T., Ohashi N., Matsumoto D., Hashimoto C., Nomura W., Yamamoto N., Murakami T., Tamamura H.: Development of anti-HIV peptides based on a viral capsid protein. *Biopolymers*, **108**, DOI: 10.1002/bip.22920 (2017)
27. Młynarczyk-Bonikowska B., Majewska A., Malejczyk M., Młynarczyk G., Majewski S.: Antiviral medication in sexually transmitted diseases. Part I: HSV, HPV. *Mini Rev. Med. Chem.* **3**, 1837–1845 (2013)
28. Ndeboko B., Hantz O., Lemamy G.J., Cova L.: Developments in cell-penetrating peptides as antiviral agents and as vehicles for delivery of peptide nucleic acid targeting hepadnaviral replication pathway. *Biomolecules*, **8**, DOI: 10.3390/biom8030055 (2018)
29. O'Brien M.S., Markovich K.C., Sellese D., DeVita A.V., Sethna P., Gentry B.G.: *In vitro* evaluation of current and novel antivirals in combination against human cytomegalovirus. *Antiviral Res.* **158**, 255–263 (2018)
30. Piret J., Boivin G.: Clinical development of letermovir and maribavir: Overview of human cytomegalovirus drug resistance. *Antiviral Res.* **163**, 91–105 (2019)

31. Pokorska-Śpiewak M., Niezgoda A., Gołkowska M., Czech-Kowalska J., Gruszczyński D., Dobrzańska A., Styczyński J., Marczyńska M.: Recommendations for the diagnosis and treatment of CMV infections. Polish Society of Epidemiology and Infectious Diseases. *Przegl. Epidemiol.* **70**, 297–310 (2016)
32. Poole C.L., James S.H.: Antiviral therapies for Herpesviruses: current agents and new directions. *Clin. Ther.* **40**, 1282–1298 (2018)
33. Razonable R.R.: Antiviral drugs for viruses other than human immunodeficiency virus. *Mayo Clin. Proc.* **86**, 1009–1026 (2011)
34. Razonable R.R.: Drug-resistant cytomegalovirus: clinical implications of specific mutations. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **23**, 388–394 (2018)
35. Styczyński J.: Who is the patient at risk of CMV recurrence: A review of the current scientific evidence with a focus on hematopoietic cell transplantation. *Infect. Dis. Ther.* **7**, 1–16 (2017)
36. Tan B.H.: Cytomegalovirus treatment. *Curr Treat Options Infect Dis.* **6**, 256–270 (2014)
37. Tippin T.K., Morrison M.E., Brundage T.M., Momméja-Marin H.: Brincidofovir is not a substrate for the human organic anion transporter 1: A mechanistic explanation for the lack of nephrotoxicity observed in clinical studies. *Ther. Drug. Monit.* **38**, 777–786 (2016)
38. Tylden G.D., Hirsch H.H., Rinaldo C.H.: Brincidofovir (CMX001) inhibits BK polyomavirus replication in primary human urothelial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 3306–3316 (2015)
39. Wong D.D., van Zuylen W.J., Craig M.E., Rawlinson W.D.: Systematic review of ganciclovir pharmacodynamics during the prevention of cytomegalovirus infection in adult solid organ transplant recipients. *Rev. Med. Virol.* **29**, e2023, DOI: 10.1002/rmv.2023 (2019)
40. Wu Z., Drach J.C., Prichard M.N., Yanachkova M., Yanachkov I., Bowlin T.L., Zemlicka J.: L-valine ester of cyclopropavir: a new antiviral prodrug. *Antivir. Chem. Chemother.* **20**, 37–46 (2009)
41. Zhao H., Zheng B.J. i wsp.: A novel peptide with potent and broad-spectrum antiviral activities against multiple respiratory viruses. *Sci. Rep.* **6**, DOI: 10.1038/srep22008 (2016)

MOŻLIWOŚCI ZAPOBIEGANIA I LECZENIA ZAKAŻEŃ LUDZKIM WIRUSEM CYTOMEGALII Z UWZGLĘDNIENIEM NOWYCH LEKÓW I ZWIĄZKÓW O POTENCJALNYM ZASTOSOWANIU

Anna Majewska¹, Beata Młynarczyk-Bonikowska^{2*}, Magdalena Malejczyk²,
Sławomir Majewski³, Grażyna Młynarczyk¹

¹ Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, WUM

² Zakład Diagnostyki Chorób Przenoszonych Drogą Płciową, WUM

³ Klinika Dermatologii i Wenerologii, WUM

Wpłynęło w marcu, zaakceptowano w czerwcu 2019 r.

Streszczenie: Ludzki wirus cytomegalii (hCMV) czyli ludzki herpeswirus 5 (HHV-5) jest jednym z najpowszechniej występujących patogenów. Badania seroepidemiologiczne wykazują obecność zakażenia u 60–100% w zależności od badanej populacji. Zdolność do wywołania zakażenia bezobjawowego oraz przechodzenia w fazę latencji sprzyja utrzymywaniu się i rozprzestrzenianiu wirusa w populacji. Zakażenie hCMV jest zwykle bezobjawowe i nie wymaga leczenia, jednak w niektórych przypadkach szczególnie u osób z obniżoną odpornością (np.: biorców przeszczepów, chorych z nowotworami hematologicznymi, nieleczonych osób zakażonych HIV) może mieć ciężki przebieg i stanowić zagrożenie dla zdrowia i życia. W pracy przedstawiono leki obecnie stosowane w terapii lub zapobieganiu wystąpieniu objawów zakażenia hCMV, a także perspektywy nowego leczenia. Zwykle jako leki I rzutu wykorzystywane są gancyklowir i walgancyklowir, a alternatywnie foscarnet i cidofovir. Leki te często pozwalają na kontrolowanie zakażeń hCMV, jednak istnieją istotne ograniczenia związane z ich stosowaniem. Należy do nich toksyczność i możliwość rozwoju lekooporności, łącznie z opornością krzyżową dotyczącą wszystkich czterech leków, gdyż posiadają wspólny mechanizm działania – hamują wirusową polimerazę DNA. Dlatego ważne jest stworzenie nowych leków o odmiennym mechanizmie działania, niższej toksyczności i lepszych parametrach farmakokinetycznych. Ostatnio zarejestrowano nowy lek – inhibitor kompleksu terminazy – letermowir, który ze względu na różny mechanizm działania jest aktywny wobec szczepów hCMV opornych na inhibitory polimerazy DNA, a także potencjalnie może wykazywać z nimi działanie synergistyczne. Obecnie trwają badania, w tym badania kliniczne, nad nowymi związkami, np.: pochodną cidofoviru, brincidofowirem, konkurencyjnym inhibitorem ATP, maribawirem i analogiem guanozyny, cyklopropawirem oraz nad peptydami przeciwwirusowymi.

1. Wprowadzenie – epidemiologia zakażeń hCMV i schematy profilaktyki zakażeń. 2. Leki zatwierdzone do stosowania w zapobieganiu i leczeniu zakażeń hCMV. 2.1. Analogi nukleozydów: gancyklowir i walgancyklowir. 2.2. Foscarnet. 2.3. Cidofovir. 2.4. Letermowir. 3. Związki o potencjalnym wykorzystaniu w leczeniu zakażeń hCMV. 3.1. Brincidofowir. 3.2. Maribawir. 3.3. Cyklopropawir 3.4. Peptydy przeciwwirusowe. 4. Podsumowanie

POSSIBILITIES OF PREVENTION AND TREATMENT OF HUMAN CYTOMEGALOVIRUS INFECTIONS INCLUDING NEW DRUGS AND COMPOUNDS WITH POTENTIAL APPLICATION

Abstract: Human Cytomegalovirus (hCMV) or human herpesvirus 5 (HHV5) is one of the most common pathogens. Studies indicate the presence of infection in 60–100% individuals. The ability to cause asymptomatic, infection and a latency promotes the persistence and spread of the virus. hCMV infection is usually asymptomatic and does not require treatment, but in some cases especially in immunocompromised persons (e.g., transplant recipients, patients with hematological malignancies, untreated HIV infected individuals) symptoms can be serious and life-threatening. The paper presents drugs currently used for treatment or prevention of hCMV infection, as well as the prospect of a new treatment options. Currently ganciclovir or valganciclovir are used as the first-line drugs and foscarnet and cidofovir are used alternatively. These drugs usually allow to control hCMV infections, however, there are important limitations. These include the toxicity and the possibility of the development of resistance, including the cross-resistance to all four drugs because they have a common mechanism of action, inhibition of viral DNA polymerase. Therefore, the creation of new drugs, with different mechanisms of action, lower toxicity and better pharmacokinetic parameters is important. Recently, the new drug, letermovir have been registered. Letermovir acts as hCMV DNA terminase inhibitor and due to the different mechanism of action the drug is active against hCMV strains resistant to DNA polymerase inhibitors, and potentially can act synergistically with them. The other drugs that are in the research stage or clinical studies include: brincidofovir, a cidofovir derivative, maribavir, a competitive inhibitor of ATP, cyclopropavir, a guanosine analog and antiviral peptides.

1. Introduction – epidemiology of hCMV infections and prophylaxis schemes. 2. Drugs approved for use in the prevention and treatment of hCMV infections. 2.1. Nucleoside analogues: ganciclovir and valganciclovir. 2.2. Foscarnet. 2.3. Cidofovir. 2.4. Letermovir. 3. Compounds with potential use in the treatment of hCMV infections. 3.1. Brincidofovir. 3.2. Maribavir. 3.3. Cyclopropavir 3.4. Antiviral peptides. 4. Summary

Słowa kluczowe: hCMV, analogi nukleozydów, gancyklowir, letermowir

Key words: hCMV, nucleoside analogues, ganciclovir, letermovir

* Autor korespondencyjny: dr hab. n. med. Beata Młynarczyk-Bonikowska, Zakład Diagnostyki Chorób Przenoszonych Drogą Płciową, WUM, ul. Koszykowa 82a 02-008 Warszawa; e-mail: beata.mlynarczyk@wum.edu.pl

1. Wprowadzenie – epidemiologia zakażeń ludzkim wirusem cytomegalii i schematy profilaktyki zakażeń

Ludzki wirus cytomegalii (human cytomegalovirus; hCMV) sklasyfikowany jako ludzki herpeswirus 5 (*Human herpesvirus 5*; HHV-5) należy do rodziny *Herpesviridae* i występuje powszechnie w populacji ludzkiej. Na podstawie badań seroepidemiologicznych stwierdzono, że zakażenie dotyczy 60–100% osób zależnie od badanej populacji. Wskaźnik serokonwersji zależy od regionu geograficznego i jest szczególnie wysoki w krajach rozwijających się.

Właściwość wywoływania zakażenia latentnego (latencja wirusa w makrofagach, limfocytach T i komórkach gruczołów wydzielania wewnętrznego) oraz zakażenia przetrwałego (stała replikacja i wydzielanie wirusów bez objawów klinicznych) to zjawiska na tyle niekorzystne epidemiologicznie, że umożliwiają szybkie rozprzestrzenianie się wirusa w populacji. Pierwotne zakażenie występuje najczęściej w wieku dziecięcym i w większości przypadków, podobnie jak zakażenia wtórne u osób immunokompetentnych, ma przebieg bezobjawowy lub łagodny i samoograniczający się. Zakażenie tym wirusem jest istotnym problemem dla chorych z upośledzoną funkcją układu immunologicznego. W grupie tej znajdują się: osoby z pierwotnymi niedoborami odporności, z wtórnymi niedoborami odporności wywołanymi przez chorobę układu odpornościowego: białaczka i inne hematologiczne nowotwory złośliwe, zakażenie ludzkim wirusem niedoboru odporności (*Human immunodeficiency virus 1* lub *Human immunodeficiency virus 2*; HIV-1, HIV-2), także osoby poddane leczeniu immunosupresyjnemu, pacjenci hemodializowani oraz z powodu niedojrzałości układu odpornościowego, noworodki [6, 7, 18, 31, 35, 36].

Współcześnie dostępne, zatwierdzone i certyfikowane, metody diagnostyczne pozwalają na szybkie i wiarygodne potwierdzenie zakażenia, wykazanie replikacji wirusa oraz monitorowanie przebiegu infekcji i skuteczności terapii przeciwwirusowej. Jednak, pomimo możliwości diagnostycznych, a także terapeutycznych w postaci leków przeciwwirusowych, hCMV jest nadal istotną przyczyną zakażeń narządowych (najczęściej: zapalenie płuc, wątroby, siatkówki i jelit) oraz choroby uogólnionej. Jest jednym z najważniejszych wirusów związanych z powikłaniami po przeszczepieniu, niepowodzeniami transplantacji, a także zgonami u biorców allogenicznym komórkom krwiotwórczym (allogeneic hematopoietic cell transplantation; allo-HCT) oraz narządów [1, 5, 19, 30, 35, 39].

Ryzyko wystąpienia pełnoobjawowej choroby cytomegalowirusowej u biorców przeszczepów zależy od statusu immunologicznego dawcy i biorcy (część, kiedy dawca jest seropozytywny, a biorca seronegatywny), rodzaju przeszczepu oraz zastosowanej immu-

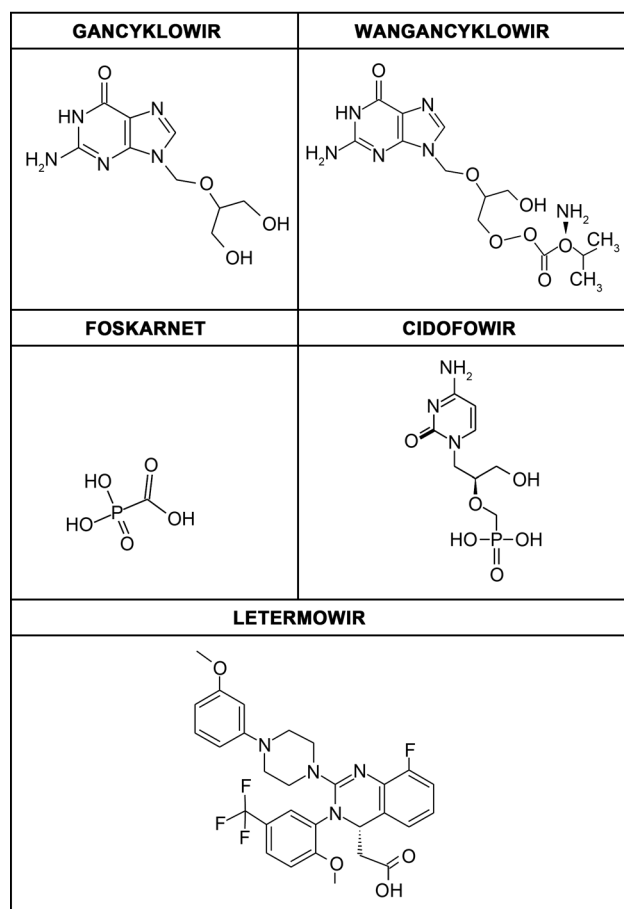
nosupresji [2, 5, 10, 11, 19]. Wykazano, że dsDNA hCMV wykrywany jest w osoczu u 44–65% chorych po allogenicznym przeszczepieniu komórek krwiotwórczych w ciągu 180 dni od przeszczepienia [6].

W zapobieganiu chorobie wywołanej przez hCMV stosuje się profilaktykę farmakologiczną, która najczęściej jest prowadzona, jako profilaktyka wybiórcza (leczenie wyprzedzające tj. pre-emptive therapy). Polega ona na wykorzystaniu czułych i swoistych metod diagnostycznych do systematycznego monitorowania tempa replikacji wirusa (ilościowy monitoring poziomu DNA, rzadziej RNA lub antygenemii pp65) zanim pojawią się objawy kliniczne oraz na kwalifikowaniu do chemioprophylaktyki, aby zapobiegać wystąpieniu bezpośrednich i pośrednich następstw zakażenia. Zaletą tej strategii jest ograniczenie liczby osób narażonych na toksyczne działania leków przeciwwirusowych. Natomiast profilaktyka uniwersalna polega na włączeniu farmakoterapii w ciągu 10 dni od przeszczepienia. Znajduje to zastosowanie głównie u chorych z bardzo dużym ryzykiem rozwoju choroby spowodowanym zakażeniem CMV. Stosowanie chemioprophylaktyki umożliwia redukcję zachorowalności i śmiertelności w wyniku infekcji cytomegalowirusem zwłaszcza u chorych po przeszczepieniu komórek krwiotwórczych [2, 5, 12, 19, 20, 39].

W ostatnich latach opracowano i zarejestrowano liczne leki przeciwwirusowe, które znalazły zastosowanie głównie w leczeniu zakażeń HIV, oraz wirusowych zapaleń wątroby wywołanych przez wirus zapalenia wątroby typu B (*Hepatitis B virus*; HBV) i C (*Hepatitis C virus*; HCV) [22, 23]. Wiele uwagi poświęca się również zakażeniom wirusowym u chorych z immunosupresją. Obecnie, w kontrolowaniu zakażeń hCMV uwzględniany jest podawany dożylnie gancyklowir (GCV) i doustnie L-walilowy ester gancyklowiru – walgancyklowir (VGCV). Alternatywnie, w przypadku oporności na te inhibitory lub wystąpienia nieakceptowanych działań niepożądanych stosuje się leki II i III wyboru, czyli foskarnet (PFA) oraz cidofowir (CDV). W 1998 roku zatwierdzono lek wskazany do leczenia cytomegalowirusowego zapalenia siatkówki u pacjentów z AIDS – fomiwirsen. Podawany dożylnie fomiwirsen jest antysensowym oligonukleotydem o sekwencji DNA komplementarnej do mRNA, który hybryduje z fragmentami mRNA tworząc strukturę mRNA-DNA, co finalnie uniemożliwia syntezę białek wirusowych.

Fomiwirsen stosowano jako lek II wyboru, kiedy terapię standardową były nieskuteczne lub przeciwwskazane. W 2002 r. ze względu na niekorzystne działania niepożądane (zapalenie przedniego odcinka błony naczyniowej, zaćma i retinopatia toksyczna) na wniosek posiadacza pozwolenia na dopuszczenie do obrotu fomiwirsen został wycofany z obrotu [1].

Wzory strukturalne leków zatwierdzonych do stosowania w zapobieganiu i leczeniu zakażeń CMV znajdują się na ryc. 1.



Ryc. 1. Leki zatwierdzone do stosowania w zapobieganiu i leczeniu zakażeń hCMV

Pomimo dostępności kilku preparatów hamujących replikację hCMV nadal zgłaszana jest potrzeba nowych terapeutyków. Wszystkie wymienione leki to inhibitory polimerazy DNA. Ze względu na wspólny mechanizm działania nie są skuteczne w leczeniu chorych zakażonych szczepami wirusa z mutacją w genie *UL54*, która skutkuje opornością krzyżową na analogi nukleozydów (GCV, VGCV) oraz PFA i CDV [1, 5, 14, 30]. W listopadzie 2017 roku do listy leków przeciwcytomegalowirusowych dołączył letermowir (Prevymis; Merck Sharp & Dohme Ltd.), a kilka innych preparatów jest testowanych w badaniach *in vitro* oraz klinicznych [21, 30].

2. Leki zatwierdzone do stosowania w zapobieganiu i leczeniu zakażeń ludzkim wirusem cytomegalii

2.1. Analogi nukleozydów: gancyklowir i walgancyklowir

Gancyklowir (GCV) jest syntetycznym, acyklicznym analogiem guanozyny. Po wnikięciu do komórki ulega przekształceniu w biologicznie aktywną pochodną fosforanową. Proces ten jest możliwy przy udziale kinazy białkowej UL97. Następne dwie fosforylacje zachodzą

z udziałem kinaz komórkowych. Czynna postać leku, trifosforan gancyklowiru (GCV-TP), jest substratem dla wirusowej polimerazy DNA. Działanie przeciwwirusowe wynika, zatem z hamowania syntezy DNA wirusa w mechanizmie kompetycyjnego wbudowywania trifosforanu deoksyguanozyny do łańcucha DNA [14, 16, 19]. Gancyklowir strukturalnie podobny jest do acyklowiru, jednak wprowadzenie dodatkowej grupy hydroksylowej rozszerzyło aktywność leku; oprócz alfa herpeswirusów (*Human herpesvirus 1* i *Human herpesvirus 2* tj. wirus opryszczki zwykłej 1 i 2; HSV-1 i HSV-2, oraz *Human herpesvirus 3* tj. wirus ospy wietrznej i półpaśca; VZV) gancyklowir działa hamująco na replikację wirusa Epsteina i Barr (*Human herpesvirus 4*; EBV), wirusa cytomegalii (CMV), ludzkie herpeswirusy 6, 7 i 8 (*Human herpesvirus 6*; HHV-6, *Human herpesvirus 7*; HHV-7, *Human herpesvirus 8*; HHV-8) oraz wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV). Gancyklowir stosowany jest parenteralnie. Podany dożylnie osiąga maksymalne stężenie po 5 godzinach. Dobrze penetruje do tkanek i ośrodkowego układu nerwowego. Do 2004 r. występował także w formie leku doustnego, jednak z powodu niskiej biodostępności (5%) został zastąpiony walgancyklowirem [5, 14, 19, 20, 33]. Najistotniejszym i bardzo często występującym efektem niepożądanym działania leku jest neutropenia. U 20–30% osób przyjmujących gancyklowir dochodzi do supresji czynności szpiku kostnego, zaburzeń ze strony nerek z krwimoczem i do zaburzenia czynności wątroby. Opisano również działanie neurotoksyczne leku [5, 11, 14, 18, 33]. Gancyklowir od 1994 r. jest lekiem z wyboru w leczeniu zakażenia wirusem cytomegalii [3]. Lek ten jest częścią protokołu chemioterapii u biorców komórek macierzystych i narządów. Wykazano, że w komórkach zakażonych hCMV gancyklowir osiąga stężenie do 100 razy wyższe niż w komórkach niezakażonych, a zastosowanie we wczesnym etapie zakażenia podwyższa jego skuteczność. Lek nie wpływa hamująco na latentną postać wirusa, toteż u 20–30% chorych obserwuje się nawroty choroby [14]. Długotrwała ekspozycja na GCV oraz stosowanie suboptymalnych dawek może przyczyniać się do selekcji szczepów opornych. Nie jest dokładnie wiadomo, jaka jest skala lekooporności. Wykazano, że problem oporności na gancyklowir może dotyczyć 1,5–10% osób z przeszczepionym narządem oraz 0–14,5% biorców komórek krwiotwórczych [16, 32]. Ryzyko lekooporności jest wyższe w przypadku immunosupresji wysokiego stopnia oraz długotrwałego podawania GCV [4, 5]. Oporność związana jest najczęściej z mutacją w obrębie genu *UL97* (najczęstsze mutacje: M460V/I, H520Q, C592G, A549V, L595S, C603W, L595F, L595W), który koduje kinazę, niezbędną do fosforylacji leku. Substytucje aminokwasów i małe delecje, nie mają istotnego wpływu na zdolność replikacji wirusa. Rzadszym zjawiskiem są mutacje

w genie *UL54*, kodującym polimerazę DNA; zmiany w tym rejonie mogą skutkować opornością na cidofovir i/lub foskarnet oraz krzyżową opornością na gancyklowir, foskarnet i cidofovir. W warunkach *in vitro* szczepy takie w posiadają atenuowany fenotyp, czyli ich wirulencja jest obniżona oraz namnażają się wolniej w porównaniu do dzikich szczepów wirusów. Kombinacje mutacji w genach *UL97* i *UL54* zwielfokrotniają efekt każdej pojedynczej mutacji, zapewniają wysoki poziom lekooporności, mogą powodować zwiększenie wartości EC_{50} GCV nawet 15-krotnie [3, 5, 11, 19, 21, 30, 32].

Walgancyklowir jest L-walilowym estrem gancyklowiru (L-valyl ester salt of ganciclovir, VGCV). Podany doustnie jest dobrze wchłaniany i przekształcany do gancyklowiru przy udziale esteraz jelitowych i wątrobowych.

Biodostępność leku wynosi 60%, czyli jest około 10 razy wyższa niż gancyklowiru, a maksymalne stężenie w surowicy osiągane jest po 1–3 godzinach [5, 12, 14]. Walgancyklowir został po raz pierwszy zatwierdzony przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (Food and Drug Administration, FDA) do leczenia zapalenia siatkówki wywołanego przez hCMV u chorych z AIDS. Jest używany w profilaktyce wystąpienia objawów choroby związanej z hCMV u chorych po przeszczepieniu narządów oraz profilaktycznie u biorców komórek krwiotwórczych. Podobnie jak gancyklowir wydalany jest przez nerki i wykazuje taki sam mechanizm działania oraz profil toksyczności [12, 14, 33].

2.2. Foskarnet

Foskarnet (phosphonoformic acid; PFA) jest bezwodnikiem kwasu fosfonomrówkowego i analogiem pirofosforanu [20, 27]. W spektrum działania foskarnetu znajduje się wiele wirusów, których materiałem genetycznym jest DNA (HSV, VZV, EBV, HHV-6, HIV, HBV). Do leczenia zakażeń spowodowanych wirusem cytomegalii został zatwierdzony w 1991 roku. Mechanizm działania polega na bezpośrednim hamowaniu polimerazy DNA poprzez kompetencyjne blokowanie miejsca wiążącego pirofosforan, a w konsekwencji blokowaniu wydłużania łańcucha kwasu dezoksyrybonukleinowego. W odróżnieniu od wcześniej opisanych inhibitorów DNA foskarnet nie wymaga aktywacji z udziałem kinaz [4, 27, 30]. Ponieważ biodostępność foskarnetu jest niska, lek podawany jest dożylnie i w ponad 80% wydalany jest z moczem w postaci nie zmienionej. Czas półtrwania ($T_{1/2}$) PFA wynosi 48 godz. Dobre przenikanie przez barierę krew-płyn mózgowo-rdzeniowy stwarza możliwość zastosowania go w zakażeniach ośrodkowego układu nerwowego. Foskarnet jest stosowany w leczeniu chorych zakażonych HIV z objawami zapalenia siatkówki

o etiologii hCMV. Stosowany jest również do leczenia zakażeń wywołanych przez szczepy HSV odporne na acyklowir oraz hCMV z opornością na gancyklowir. Krzyżowa oporność na gancyklowir i foskarnet stwierdzana jest rzadziej niż oporność na gancyklowir i cidofovir [3, 19, 32]. Istotnym ograniczeniem stosowania leku jest nefrotoksyczność np.: śródmiąższowe zapalenie nerek, ostra martwica cewek nerkowych. Do innych reakcji niepożądanych należą: zaburzenia czynności wątroby, zaburzenia czynności przewodu pokarmowego (mdłości, wymioty), leukopenia, niedokrwistość. Foskarnet ma zdolność chelatowania dwuwartościowych jonów metali, może, więc powodować zaburzenia równowagi elektrolitowej, głównie wapnia, fosforu, potasu i magnezu. Z powodu kumulacji leku w moczu u części chorych występuje owrzodzenie żołądka [4, 14, 27, 32].

Oporność na foskarnet związana jest z mutacjami w obrębie genu *UL54*. Substytucje aminokwasów w białku skutkują ograniczoną podatnością na wiązanie z lekiem. Niektóre z tych mutacji np.: N495K, D588E, T700A, V715M, E756D/N/Q i T838A powodują oporność wyłącznie na foskarnet. Wiele innych substytucji odpowiada za krzyżową oporność na gancyklowir i cidofovir. Niektóre substytucje lub delecje (np.: Q578, D588N, T700A, V715M, E756D/N/Q, V781I, V787L, L802M, A809V, V812L i A834) wywołują 3–5-krotne obniżenie wrażliwości na foskarnet. U szczepów hCMV opornych na wszystkie inhibitory polimerazy wykazano obecność delecji del 981–982 [8, 19, 34]. Obecnie, brak jest danych na temat częstości występowania oporności hCMV na foskarnet, przypuszcza się jednak, że wskaźnik oporności wiązany z modyfikacją w *UL54* w wyniku długotrwałego leczenia foskarnetem jest taki sam jak dla gancyklowiru i cidofoviru [5].

2.3. Cidofovir

Cidofovir (CDV) jest analogiem monofosforanu nukleozydu (cytydyny). Ze względu na obecność fosforanu w cząsteczce nie wymaga pierwszego etapu fosforylacji wewnątrzkomórkowej, hamuje, więc replikację także tych wirusów, które nie posiadają kinazy tymidynowej. Aktywnym metabolitem jest difosforan cidofoviru. Fosforylacja zachodzi z działem kinaz komórkowych (pirymidynowa kinaza monofosforanu nukleozydu, kinaza pirogronianowa, kinaza kreatynowa, kinaza difosforanu nukleozydu), których poziom wzrasta w komórkach zakażonych hCMV. CDV jest konkurencyjnym inhibitorem wirusowych polimeraz DNA, hamuje więc elongację DNA [4, 30, 20]. CDV obecnie stosowany jest do leczenia zapalenia siatkówki w chorych z AIDS (rejestracja w 1996 r.), w leczeniu zakażeń wywołanych przez wirusy opryszczki odporne na acyklowir i foskarnet, oraz hCMV odporne na

gancyklowir i foskarnet. Wykazuje także aktywność przeciwwirusową wobec innych DNA wirusów: VZV, adenowirusów (adenoviruses; HAdVs), poliomawirusów (polyomaviruses), ludzkich wirusów brodawczaka (human papillomaviruses; HPVs) oraz ortomyxowirusów (ortomyxoviruses) należących do RNA wirusów [4, 14, 32]. Wartość EC_{50} cidofoviru względem hCMV wynosi od 0,1 do 0,8 μ M [30]. Oporność na CDV oznacza w większości przypadków oporność na gancyklowir [19]. Poważnymi ograniczeniami stosowania leku są nefrotoksyczność i niska biodostępność po podaniu doustnym, lek dostępny jest w formie preparatów wymagających infuzji dożylnych, co uniemożliwia jego zastosowanie w leczeniu ambulatoryjnym. Koncentracja cidofoviru w komórkach nerek jest 100 razy wyższa niż w innych tkankach, co tłumaczy, związane z lekiem uszkodzenie kanalików proksymalnych objawiające się proteinurią i glikozurią [18, 30, 32]. Z tego powodu CDV jest lekiem drugiego rzutu, wykorzystywanym w terapii zakażeń wirusami opornymi na działanie gancyklowiru [4, 19]. Jego stosowanie jest obecnie bardzo ograniczone. W wielu krajach Europy, także w Polsce dostępny jest do leczenia indywidualnych przypadków w ramach importu docelowego [16].

2.4. Letermowir

Letermowir (LTV, Previmis®) jest nowym lekiem przeciwwirusowym, przedstawicielem nowej klasy związków chemicznych – chinazolinów. Posiada wąskie spektrum działania, ukierunkowane na CMV oraz odmienny, od dotychczas stosowanych leków, mechanizm działania [16, 21]. Miejscem docelowym letermowiru jest kompleks terminazy złożony w białek, produktów genów *UL51*, *UL56* i *UL89*. Podjednostka pUL56 ma aktywność ATPazy i jest głównym miejscem działania leku. pUL89 posiada aktywność ATPazy i endonukleazy, a pUL51, nie została dotychczas dobrze scharakteryzowana. Letermowir jako inhibitor kompleksu terminazy, hamuje replikację hCMV na etapie dojrzewania wirusowego DNA i upakowania go do kapsydu. Pierwszy etap tego procesu katalizowany przez pUL89 i polega na łączeniu kompleksu terminazy z sekwencją *pac* i cięciu konkateryzowanego DNA. Następnie kompleks wirusowa DNA/terminaza wiąże się z wierzchołkiem uformowanego prokapsydu, przez który przemieszcza się DNA o długości jednostkowej uzyskanej po odcięciu fragmentu od łańcucha DNA. Proces translokacji materiału genetycznego wymaga dostarczenia energii, w co zaangażowana jest ATPaza [5, 11, 30, 32]. Szczególnym wskazaniem do podania letermowiru jest profilaktyka zakażenia hCMV i choroby cytomegalowirusowej u dorosłych hCMV-seropozytywnych biorców komórek hematopoetycznych. Lek dostępny jest w postaci doustnej (tabletki 240 mg,

480 mg) oraz koncentratu do sporządzania roztworu do infuzji. Zalecana dawka to 480 mg podawana raz na dobę, doustnie lub dożylnie przez 1 godzinę do 100 dni po przeszczepieniu [19, 24, 32]. Letermowir jest dobrze tolerowany, a jego biodostępność po podaniu doustnym wynosi 35%. Maksymalne stężenie w surowicy lek osiąga ok. 1,5 godz. po aplikacji doustnej, a okres półtrwania wynosi 10 godz. Letermowir w postaci nie zmienionej wydalany jest z żółcią [30]. Najczęściej zgłaszanymi działaniami niepożądanymi, są: nudności, biegunka i wymioty, które stwierdza się u odpowiednio 7,2%, 2,4% i 1,9% osób otrzymujących LTV. W badaniach klinicznych nie wykazano działania hemotoksycznego i nefrotoksycznego leku [11, 23]. Letermowir wykazuje wysoką efektywność przeciwcytomegalowirusową. Jest około 1000 razy bardziej aktywny niż gancyklowir [30]. W III fazie badań klinicznych, prowadzonych metodą podwójnie ślepej próby z udziałem 570 CMV-seropozytywnych dorosłych biorców komórek krwiotwórczych, których losowo (2:1) przypisano do otrzymywania letermowiru i leczenia pozorowanego (placebo) stwierdzono, że lek skuteczniej niż placebo zapobiegał reaktywacji CMV do 14 tygodnia po przeszczepieniu. Objawy zakażenia wirusem po 24 tygodniach od przeszczepienia wystąpiły u 37,5% pacjentów otrzymujących letermowir i u 61% otrzymujących placebo. Zaobserwowano również niższy współczynnik zgonów w ciągu 24 tygodni po przeszczepieniu u chorych przyjmujących letermowir (10%) w stosunku do osób otrzymujących placebo (16%) [16, 24, 30]. W badaniach prowadzonych w hodowlach komórkowych zakażonych hCMV zaobserwowano, że letermowir aplikowany łącznie z gancyklowirem lub cidofowirem wykazuje synergizm addytywny. Kojarzenie tych preparatów może być interesującą strategią w profilaktyce i leczeniu choroby cytomegalowirusowej [30]. Letermowir jest także aktywny wobec szczepów hCMV opornych na inne leki przeciwcytomegalowirusowe [3, 30]. Opisano jednak mutacje związane z opornością na lek. Występują one najczęściej w genie *UL56*, znacznie rzadziej w genach *UL89* i *UL51* [30]. Oporność na letermowir oceniano w testach *in vitro* oraz w badaniach klinicznych. Substytucje odpowiedzialne za oporność zlokalizowano w kodonie 25 oraz kodonach pomiędzy 229–369 podjednostki pUL56 [19, 30]. W szczepie hCMV AD169 opisano substytucje: V231L, V236M, L241P, C325Y, R369G, R369M oraz R369S, które korelowały ze wzrostem wartości EC_{50} leku o odpowiednio 5, 45, 160, 8796, 4, 13 i 38 razy [30].

Mutacje w genie *UL56* nadające oporność na LMV nie wpływają lub mają minimalny wpływ na sprawność replikacji wirusa w porównaniu z wirusami hCMV typu dzikiego.

Rzadszym zjawiskiem są mutacje w konserwatywnym regionie podjednostki V białka kodowanego przez

UL89 (N320H, N329S, D344E i T350M); pojedyncze zmiany wywołują oporność niskiego stopnia na letermowir. Jednak współwystępowanie substytucji D344E w pUL89 z jedną z substytucji np. E237D, F261L, M329T lub Q204R w pUL56 zwiększa wartości EC_{50} leku. Zaobserwowano również związaną z opornością na letermowir mutację w genie *UL51* (P91S) [21, 20]. Pierwszy kliniczny izolat oporny na LTV uzyskano od chorego w fazie IIb badań klinicznych. Pacjent otrzymywał suboptymalną dawkę leku (60 mg), niepowodzenie leczenia związane było z mutacją w *UL56*. Występująca substytucja V236M, podobnie jak C325W, C325F i C325Y wykazane w szczepach wyizolowanych od innych chorych, związana była z wysokim stopniem oporności na LMV. Wyniki badań sugerują, że mutacje związane z opornością na letermowir powstają stosunkowo łatwo i szybko w związku z tym, stosowanie leku poza wskazaniami powinno być ostrożne, a przede wszystkim monitorowane pod kątem oporności na lek [30].

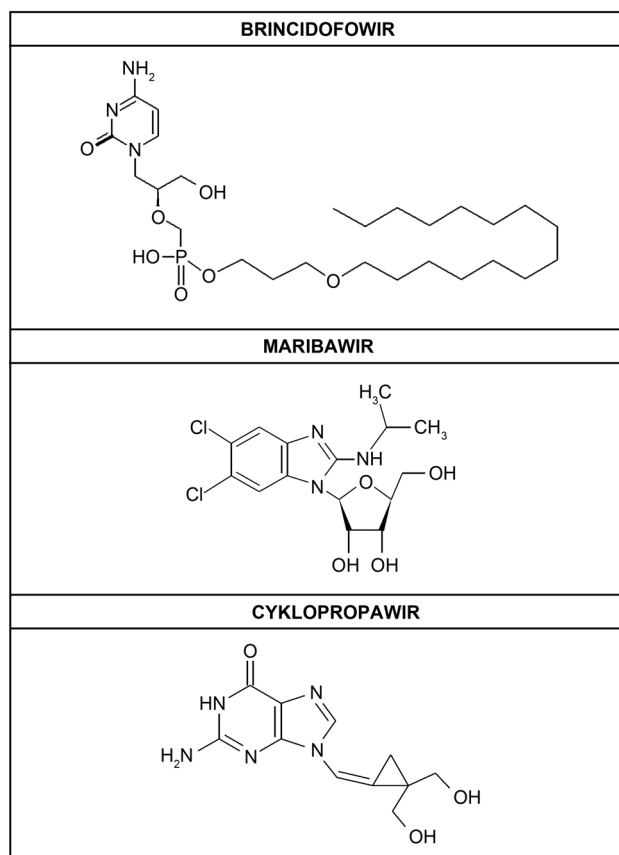
3. Związki o potencjalnym wykorzystaniu w leczeniu zakażeń wirusem cytomegalii

3.1. Brincidofowir

Brincidofowir (BCV; CMX001) jest prolekiem zawierającym syntetyczny, acykliczny monofosforan analogu nukleozydowego (cidofowir) połączony grupą fosfonianową z lipidem (3-heksadecyloksy-1-propanol). Budowa strukturalna brincidofowiru oraz pozostałych związków o potencjalnym wykorzystaniu w leczeniu zakażeń CMV przedstawiono na ryc. 2.

Po wnikięciu do komórki i odszczepieniu łańcucha lipidowego, uwolniony monofosforan cidofowiru fosforylowany jest przez kinazy wewnątrzkomórkowe do difosforanu cidofowiru (CDV-DP). Lek jest alternatywnym substratem polimerazy DNA. Wbudowanie cidofowiru w DNA wirusa blokuje wydłużanie łańcucha dezoksyrybonukleinowego. Brincidofowir wykazuje szerokie spektrum aktywności przeciwwirusowej. W badaniach z użyciem hodowli komórkowych wykazano, jego aktywność względem różnych DNA wirusów: herpeswirusów (VZV, CMV, EBV, HHV-6), poliomawirusów (BK virus; BKV), adenowirusów, papilomawirusów [15, 16, 37, 38]. Brincidofowir charakteryzuje się lepszą, w porównaniu z cidofowirem, biodostępnością po podaniu doustnym. Osiąga ponad 100-krotnie wyższe niż CDV stężenie wewnątrzkomórkowe, a jego aktywność przeciwherpeswirusowa (HSV, CMV, VZV) jest do 1000 razy wyższa w porównaniu z cidofowirem, a także z gancyklowirem i foskarnetem.

W badaniach *in vitro* i wykorzystujących modele zwierzęce wykazano synergistyczne działanie brincidofowiru i acyklowiru w hamowaniu replikacji HSV [32].



Ryc. 2. Związki o potencjalnym wykorzystaniu w leczeniu zakażeń hCMV

Lek po podaniu dożylnym nie wykazuje działania mielotoksycznego. Nie jest również nefrotoksyczny, prawdopodobnie, dlatego, iż w odróżnieniu od cidofowiru nie jest substratem dla ludzkich transporterów anionów organicznych (OAT1), zlokalizowanych w kanaliku krętym I rzędu [30, 37]. Badania przedkliniczne brincidofowiru były bardzo obiecujące, jednak rozczarowujące wyniki III fazy badania klinicznego, w którym oceniano skuteczność w zapobieganiu chorobom związanym z zakażeniem hCMV u seropozytywnych pacjentów z allogenicznym przeszczepieniem komórek krwiotwórczych, spowalniają jego wprowadzenie do leczenia. Początkowy entuzjazm wobec leku jednak nie słabnie, nadal kontynuowane są testy pod kątem stosowania brincidofowiru w profilaktyce zakażeń hCMV u biorców krwiotwórczych komórek macierzystych (hematopoietic stem cell; HSC), bowiem kontrolowanie zakażeń w tej grupie chorych jest nadal poważnie ograniczone [29, 32]. Obecnie zaplanowana jest także rekturacja do randomizowanego, kontrolowanego, otwartego, wielośrodkowego badania klinicznego oceniającego tolerancję, farmakokinetykę oraz aktywność przeciwadenowirusową BCV podawanego dożylnie w różnych dawkach (NCT03532035). Ponadto rozpoczęto otwarte, randomizowane, wielośrodkowe badanie w równoległych grupach, którego

celem jest ocena bezpieczeństwa, tolerancji i aktywności przeciwwirusowej brincidofowiru oraz porównanie efektywności terapii tym lekiem do standardowej opieki realizowanej wobec pacjentów pediatrycznych przyjmujących allogeniczne komórki krwiotwórcze i będących w grupie ryzyka zakażenia adenowirusem (NCT03339401). Do działań niepożądanych leku należą zaburzenia żołądkowo jelitowe [16, 25, 30].

3.2. Maribawir

Maribawir (MBV; 1263W94) jest konkurencyjnym inhibitorem ATP. Wiąże się specyficznie z serynowo-treoninową kinazą białkową UL97, która pośredniczy w jednym z końcowych etapów replikacji wirusa, powodując zahamowanie jego enkapsydacji i uwalnianie wirusów z zainfekowanych komórek. Lek od wielu lat badany jest w warunkach *in vitro* oraz jest przedmiotem badań klinicznych [4, 16, 30, 32]. Maribawir nie wymaga wewnątrzkomórkowej fosforylacji. W badaniach *in vitro* wykazano, że ma on ponad 10-krotnie wyższą aktywność przeciw CMV w porównaniu z gancyklowirem. EC_{50} preparatu wynosi około 0,3 μM [30]. Przeciwwirusowe działanie preparatu dotyczy także szczepów CMV opornych na gancyklowir i cidofovir. Maribawir charakteryzuje się dobrą biodostępnością po podaniu doustnym [30, 32]. W badaniach klinicznych wykazano, że lek jest dobrze tolerowany, jego działanie hematotoksyczne jest niższe niż gancyklowiru oraz walgancyklowiru. Nie wykazuje również działania nefrotoksycznego [16, 30, 32]. W randomizowanym, kontrolowanym placebo badaniu klinicznym z zastosowaniem podwójnie ślepej próby badano skuteczność maribawiru w profilaktyce choroby CMV u dorosłych osób po allogenicznym przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych (allo-HSCT). MBV (w dawce 100 mg, BID) i placebo podawano przez 12 tygodni. Po 6 miesiącach obserwacji wykazano, że częstość występowania choroby cytomegalowirusowej w pierwszym półroczu po przeszczepieniu wynosiła 4% u przyjmujących maribawir i 5% dla przyjmujących placebo. Obserwacje te wpłynęły na przerwanie badań II fazy, tj. testowania skuteczności leku w zapobieganiu chorobie CMV u biorców wątroby [13, 32]. Pomimo tych rozczarowujących wyników uznaje się, że maribawir może mieć inne zastosowanie u chorych po przeszczepieniu, toteż kontynuowane są badania tego preparatu. Obecnie trwa rekrutacja dwóch grup do badań klinicznych III fazy, w którym zostanie dokonane porównanie skuteczności i bezpieczeństwa maribawiru z walgancyklowirem w leczeniu zakażenia wirusem cytomegalii u bezobjawowych biorców przeszczepów komórek krwiotwórczych (NCT02927067) oraz zbadana będzie skuteczność i bezpieczeństwo leczenia maribawirem

biorców przeszczepów z zakażeniami wywoływanymi przez wirusa cytomegalii z opornością na leczenie gancyklowirem, walgancyklowirem, foskarnetem lub cidofowirem (NCT02931539) [32].

W badaniu z wykorzystaniem hodowli komórkowej wykazano, że inhibitory polimerazy DNA (cidofovir i foskarnet) w połączeniu z maribawirem działają synergistycznie [30]. Podobnie, wzmocnienie aktywności przeciwwirusowej zaobserwowano po jednoczesnym podaniu do hodowli komórek letermowiru i maribawiru. Natomiast maribawir i gancyklowir wykazują działanie antagonistyczne. Dzieje się tak dlatego, że inhibicja kinazy UL97 przez maribawir wpływa negatywnie na fosforylację gancyklowiru [9, 16, 32]. Maribawir hamuje również replikację EBV *in vitro* [1].

Oprócz maribawiru, zsyntetyzowano również inne inhibitory kinazy UL97 o potencjalnej aktywności przeciwcytomegalowirusowej. Wśród nich znalazły się: indolokarbazole, chinazoliny i analogi benzimidazolu, jednak żaden z preparatów nie został dotychczas zbadany tak szczegółowo jak maribawir [3, 4].

3.3. Cyklopropawir

Cyklopropawir (CPV; MBX-400) jest nukleozydowym analogiem 2-deoksyguanozyny (guanosine nucleoside analog) II generacji. Leki I generacji to bioizosteryczne analogi acyklowiru. Nowa generacja analogów nukleozydów powstała na skutek zmiany w strukturze, tj. zastąpieniu acyklicznej grupy C-O-C metylocyklopropanem. Cyklopropawir strukturalnie najbardziej zbliżony jest do gancyklowiru [4]. W badaniach *in vitro* wykazano, że CPV posiada ok 10× wyższą (EC_{50} 0,46 μM) aktywność przeciwcytomegalowirusową w porównaniu z gancyklowirem, prawdopodobnie z powodu kumulacji leku o wyższym stężeniu w zakażonej komórce, bez toksycznego wpływu na komórki. Wykazano także, że CPV jest aktywny *in vitro* wobec innych ludzkich herpeswirusów, takich jak: VZV, HHV-6A, HHV-6B i HHV-8. Cyklopropawir, podobnie jak gancyklowir wymaga fosforylacji przez wirusową kinazę (pUL97) do monofosforanu oraz dalszych fosforylacji, w których biorą udział kinazy komórkowe. Lek hamuje replikację wirusowego DNA, poprzez inhibicję polimerazy DNA i/lub wbudowywanie do wirusowego DNA, co powoduje terminację elongacji DNA [4, 29]. Podobnie jak w przypadku innych analogów nukleozydów wydaje się, że walilowy ester cyklopropawiru może posiadać lepsze właściwości farmakokinetyczne [7, 17, 29, 40].

Obecnie trwają badania I fazy oceniające bezpieczeństwo i właściwości farmakokinetyczne cyklopropawiru podawanego w różnych dawkach zdrowym ochotnikom [4].

3.4. Peptydy przeciwwirusowe (AP)

Uważa się, że alternatywnym sposobem leczenia zakażeń wirusowych mogą być leki peptydowe. Jak dotąd badano mechanizm ich działania przeciw wirusom powodującym zakażenia układu oddechowego [41], HBV [28] oraz HIV (inhibitory fuzji: enfuwirtyd, sifuwirtyd, albuwirtyd, a także inne peptydy wykazujące podobieństwo strukturalne do peptydów występujących w białkach budujących kapsyd HIV) [18, 23, 26]. Białka przeciwwirusowe działają hamująco, interferując z różnymi etapami replikacji wirusa, np.: mogą hamować przyłączanie wirusa, wejście do komórki, replikację lub uwolnienie z komórki [18]. hCMV przyłącza się do komórki gospodarza poprzez proteoglikany siarczanu heparanu (HSPG). Wirusowe glikoproteiny gB i gM/gN oddziałują z ujemnie naładowanymi resztami siarczanowymi, powodując przyłączanie wirionu hCMV do komórki gospodarza. Wyzwała to kaskadę sygnałów, w efekcie umożliwiając wejście wirusa do komórki. HSPG obecne są na większości komórek gospodarza, co tłumaczy fakt, że hCMV może zakażać wiele typów ludzkich komórek. Peptydy wiążące HS mogą zatem skutecznie hamować infekcję hCMV [18].

4. Podsumowanie

Historia chemioterapii przeciwwirusowej rozpoczęła się ponad 50 lat temu. Od 1962 r. do maja 2019 r. zarejestrowano 99 leków przeciwwirusowych. Część leków, ze względu na słabą aktywność przeciwwirusową, szybko pojawiającą się oporność lub toksyczność została wycofana z użycia. Zdecydowana większość zatwierdzonych do stosowania preparatów, przeznaczona jest do leczenia chorych zakażonych HIV i wirusami zapalenia wątroby typu B i C (HBV i HCV). Mniej lub bardziej skuteczne przyczynowe leczenie przeciwwirusowe dostępne jest również w przypadku zakażeń wywołanych przez herpeswirusy, z pośród których największej uwagi wymaga hCMV. Do listy dotychczas stosowanych leków przeciwcytomegalowirusowych dołączył w 2017 r. letermowir, kilka innych preparatów testowanych jest *in vitro* lub w zaawansowanych fazach badań klinicznych. Stwarza to nadzieję na powstanie nowych algorytmów leczenia, być może z wykorzystaniem kojarzenia chemioterapeutyków w celu maksymalizacji efektu terapeutycznego, a w konsekwencji poprawy skuteczności zapobiegania i leczenia objawów zakażenia hCMV u ludzi.

Piśmiennictwo

1. Biron K.K.: Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res.* **71**, 154–163 (2006)

2. Bocian J., Januszkiewicz-Lewandowska D.: HCMV infections after hematopoietic stem cell transplantation – diagnostic methods and importance of viral DNA level monitoring. *Post. Hig. Med. Dosw.* **69**, 252–263 (2015)
3. Bright P.D., Gompels M., Donati M., Johnston S.: Successful oral treatment of ganciclovir resistant cytomegalovirus with maribavir in the context of primary immunodeficiency: First case report and review. *J. Clin. Virol.* **87**, 12–16 (2017)
4. Britt W.J., Prichard M.N.: New therapies for human cytomegalovirus infections. *Antiviral Res.* **159**, 153–174 (2018)
5. Chaer F.E., Shah D.P., Chemaly R.F.: How I treat resistant cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood*, **128**, 2624–2636 (2016)
6. Chemaly RF, Hill J., Voigt S., Peggs KS.: *In vitro* comparison of currently available and investigational antiviral agents against pathogenic human double-stranded DNA viruses: A systematic literature review. *Antiviral Res.* **163**, 50–58 (2019)
7. Chen H., Li C., Zemlicka J., Gentry B.G., Bowlin T.L., Coena D.M.: Potency and stereoselectivity of cyclopropavir triphosphate action on human cytomegalovirus DNA Polymerase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 4176–4182 (2016)
8. Chou S.: Foscarnet resistance mutations mapping to atypical domains of the cytomegalovirus DNA polymerase gene. *Antiviral Res.* **138**, 57–60 (2017)
9. Chou S., Ercolani R.J., Derakhchan. K.: Antiviral activity of maribavir in combination with other drugs active against human cytomegalovirus. *Antiviral Res.* **157**, 128–133 (2018)
10. Czarnecka P., Czarnecka K., Tronina O., Durlik M.: Cytomegalovirus disease after liver transplant—a description of a treatment-resistant case: a case report and literature review. *Transplant Proc.* **50**, 4015–4020 (2018)
11. Dadwal S.S.: Update on prevention of cytomegalovirus in hematopoietic cell transplantation. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **32**, 63–68 (2019)
12. Dęborska-Materkowska D., Durlik M.: Leczenie zakażenia wirusem cytomegalii po transplantacji nerki. *Forum Nefrologiczne*, **3**, 162–168 (2010)
13. Durlik M.: Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Nefrol. Dial. Pol.* **13**, 157–163 (2009)
14. Dzieciatkowski T., Rola A., Majewska A., Solarska M., Łuczak M.: Leki stosowane w leczeniu zakażeń herpeswirusami u ludzi. *Post. Mikrobiol.* **46**, 211–221 (2007)
15. Foster S.A., Parker S., Lanier R.: The role of brincidofovir in preparation for a potential smallpox outbreak. *Viruses*, **9**, 320 (2017)
16. Frange P., Leruez-Ville M.: Maribavir, brincidofovir and letermovir: efficacy and safety of new antiviral drugs for treating cytomegalovirus infections. *Med. Mal. Infect.* **48**, 495–502 (2018)
17. Gentry B.G., Drach J.C.: Metabolism of cyclopropavir and ganciclovir in Human Cytomegalovirus-infected cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 2329–2333 (2014)
18. Jackson J.W., Hancock T.J., Dogra P., Patel R., Arav-Boger R., Williams A.D., Kennel S.J., Wall J.S., Sparer T.E.: Anticytomegalovirus peptides point to new insights for CMV entry mechanisms and the limitations of *in vitro* screenings. *mSphere*, **13**, e00586–18 (2019)
19. Koval C.E.: Prevention and treatment of cytomegalovirus infections in solid organ transplant recipients. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **32**, 581–559 (2018)
20. Leśnikowski Z.J., Paradowska E., Przepiórkiewicz M., Bogusława-Olejniczak A., Emery V.: Leki przeciwko ludzkiemu wirusowi cytomegalii (hCMV). *Pol. Merkur. Lek.* **XIII**, 242–249 (2002)
21. Ligat G., Cazal R., Hantz S., Alain S.: The human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target: a close-up view. *FEMS Microbiol. Rev.* **42**, 137–145 (2018)

22. Majewska A., Młynarczyk-Bonikowska B., Malejczyk M., Majewski S., Młynarczyk G.: Antiviral medication in sexually transmitted diseases. Part III: Hepatitis B, Hepatitis C. *Mini Rev. Med. Chem.* **17**, 328–337 (2017)
23. Majewska A., Młynarczyk-Bonikowska B., Malejczyk M., Młynarczyk G., Majewski S.: Antiviral medication in sexually transmitted diseases. Part II: HIV. *Mini Rev. Med. Chem.* **15**, 93–103 (2015)
24. Marty F.M., Badshah C. i wsp.: Letermovir prophylaxis for cytomegalovirus in hematopoietic-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* **377**, 2433–2444 (2017)
25. McIntosh M., Hauschild B., Miller V.: Human cytomegalovirus and transplantation: drug development and regulatory issues. *J. Virus Erad.* **2**, 143–148 (2016)
26. Mizuguchi T., Ohashi N., Matsumoto D., Hashimoto C., Nomura W., Yamamoto N., Murakami T., Tamamura H.: Development of anti-HIV peptides based on a viral capsid protein. *Biopolymers*, **108**, DOI: 10.1002/bip.22920 (2017)
27. Młynarczyk-Bonikowska B., Majewska A., Malejczyk M., Młynarczyk G., Majewski S.: Antiviral medication in sexually transmitted diseases. Part I: HSV, HPV. *Mini Rev. Med. Chem.* **3**, 1837–1845 (2013)
28. Ndeboko B., Hantz O., Lemamy G.J., Cova L.: Developments in cell-penetrating peptides as antiviral agents and as vehicles for delivery of peptide nucleic acid targeting hepadnaviral replication pathway. *Biomolecules*, **8**, DOI: 10.3390/biom8030055 (2018)
29. O'Brien M.S., Markovich K.C., Selleseth D., DeVita A.V., Sethna P., Gentry B.G.: *In vitro* evaluation of current and novel antivirals in combination against human cytomegalovirus. *Antiviral Res.* **158**, 255–263 (2018)
30. Piret J., Boivin G.: Clinical development of letermovir and maribavir: Overview of human cytomegalovirus drug resistance. *Antiviral Res.* **163**, 91–105 (2019)
31. Pokorska-Śpiewak M., Niezgoda A., Gołkowska M., Czech-Kowalska J., Gruszfeld D., Dobrzańska A., Styczyński J., Marczyńska M.: Recommendations for the diagnosis and treatment of CMV infections. Polish Society of Epidemiology and Infectious Diseases. *Przegl. Epidemiol.* **70**, 297–310 (2016)
32. Poole C.L., James S.H.: Antiviral therapies for Herpesviruses: current agents and new directions. *Clin. Ther.* **40**, 1282–1298 (2018)
33. Razonable R.R.: Antiviral drugs for viruses other than human immunodeficiency virus. *Mayo Clin. Proc.* **86**, 1009–1026 (2011)
34. Razonable R.R.: Drug-resistant cytomegalovirus: clinical implications of specific mutations. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **23**, 388–394 (2018)
35. Styczynski J.: Who is the patient at risk of CMV recurrence: A review of the current scientific evidence with a focus on hematopoietic cell transplantation. *Infect. Dis. Ther.* **7**, 1–16 (2017)
36. Tan B.H.: Cytomegalovirus treatment. *Curr Treat Options Infect Dis.* **6**, 256–270 (2014)
37. Tippin T.K., Morrison M.E., Brundage T.M., Momméja-Marin H.: Brincidofovir is not a substrate for the human organic anion transporter 1: A mechanistic explanation for the lack of nephrotoxicity observed in clinical studies. *Ther. Drug. Monit.* **38**, 777–786 (2016)
38. Tylden G.D., Hirsch H.H., Rinaldo C.H.: Brincidofovir (CMX001) inhibits BK polyomavirus replication in primary human urothelial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 3306–3316 (2015)
39. Wong D.D., van Zuylen W.J., Craig M.E., Rawlinson W.D.: Systematic review of ganciclovir pharmacodynamics during the prevention of cytomegalovirus infection in adult solid organ transplant recipients. *Rev. Med. Virol.* **29**, e2023, DOI: 10.1002/rmv.2023 (2019)
40. Wu Z., Drach J.C., Prichard M.N., Yanachkova M., Yanachkov I., Bowlin T.L., Zemlicka J.: L-valine ester of cyclopropavir: a new antiviral prodrug. *Antivir. Chem. Chemother.* **20**, 37–46 (2009)
41. Zhao H., Zheng B.J. i wsp.: A novel peptide with potent and broad-spectrum antiviral activities against multiple respiratory viruses. *Sci. Rep.* **6**, DOI: 10.1038/srep22008 (2016)