

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

**Nowe strategie przeciwwirusowe oparte o hamowanie procesu
wnikania wirusów do wnętrza komórki, na przykładzie SARS-
CoV-2 i wirusa grypy typu A**

mgr inż. Rafał Nowak

Praca doktorska zrealizowana w Zakładzie Wirusologii Molekularnej

Promotor: prof. dr hab. Elżbieta Kierzek

Promotor pomocniczy: dr Paweł Zmora

Poznań 2025

Składam serdeczne podziękowania

prof. dr hab. Elżbiecie Kierzek

za kierownictwo naukowe, cenne uwagi merytoryczne i ogromną życzliwość;

dr. Pawłowi Zmorze

za opiekę naukową oraz pomoc w realizacji i pisaniu niniejszej rozprawy;

oraz wszystkim osobom,

które przyczyniły się do powstania tej pracy.

Spis treści

1. Wykaz prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	4
2. Streszczenie	6
3. Summary	8
4. Wprowadzenie	10
4.1 Infekcje dróg oddechowych wywołane przez nowo pojawiające się wirusy	10
4.2 Taksonomia i klasyfikacja wirusów grypy i koronawirusów	15
4.3 Cykle replikacyjne wirusa grypy typu A i SARS-CoV-2	23
4.4 Budowa wirionu wirusa grypy typu A	37
4.5 Budowa wirionu SARS-CoV-2	39
4.6 Hemaglutynina (HA) wirusa grypy typu A	41
4.7 Białko kolca (S) SARS-CoV-2	44
4.8 Białko TMPRSS2	49
4.9 Strategie przeciwwirusowe nakierowane na RNA/DNA	52
5. Cel pracy	57
6. Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	58
6.1 <i>Novel Molecular Consortia of Cannabidiol with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Emerging Coronaviruses' Entry</i>	58
6.2 <i>TMPRSS2-specific antisense oligonucleotides inhibit host cell entry of emerging viruses</i>	61
6.3 <i>Organometallic–Erlotinib Conjugates Active against Lung Cancer Cells and as Emerging Virus Entry Inhibitors</i>	64
7. Dyskusja	67
8. Wnioski	85
9. Wykaz skrótów	86
10. Bibliografia	90
11. Załączniki	106
11.1 Oświadczenia określające wkład w powstanie prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	106
11.2 Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej	112

1. Wykaz prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

1. Pawełczyk A.*, **Nowak R.***, Gazecka M., Jelińska A., Zaprutko L., Zmora P.
Novel Molecular Consortia of Cannabidiol with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Emerging Coronaviruses' Entry.
„Pathogens”. 2023; 12(2): 205.
IF₂₀₂₃ = 3,745; pkt MEiN = 100
2. **Nowak R.**, Gazecka M., Hoffmann M., Kierzek R., Pöhlmann S., Zmora P.
TMPRSS2-specific antisense oligonucleotides inhibit host cell entry of emerging viruses.
„Virology”. 2024; 487: 19-29.
IF₂₀₂₄ = 4,100; pkt MEiN = 100
3. Biegański P.*, Gazecka M.*, **Nowak R.**, Gorski A., Dutkiewicz N., Kawano D.F., Zmora P.*, Kowalski K.*
Organometallic–Erlotinib Conjugates Active against Lung Cancer Cells and as Emerging Virus Entry Inhibitors.
„Organometallics”. 2024; 43(1): 45-57.
IF₂₀₂₄ = 3,129; pkt MEiN = 100

*równorzędni autorzy publikacji

Wykaz prac naukowych niewchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

1. Lorent D.*, **Nowak R.***, Roxo C., Lenartowicz E., Makarewicz A., Zaremba B., Nowak S., Kuszel Ł., Stefaniak J., Kierzek R., Zmora P.
Prevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in Poznań, Poland, after the first wave of the COVID-19 pandemic.
„Vaccines”. 2021; 9(6): 541.
IF₂₀₂₁ = 4,961; pkt MEiN = 140
2. Magner D., **Nowak R.**, Lenartowicz Onyekaa E., Pasternak A., Kierzek R.
A Structural Potential of Rare Trinucleotide Repeat Tracts in RNA.
„International Journal of Molecular Sciences”. 2022; 23(10): 5850.
IF₂₀₂₂ = 4,556; pkt MEiN = 140
3. Lorent D., **Nowak R.**, Luwański D., Pisarska-Krawczyk M., Figlerowicz M., Zmora P.
The longitudinal analysis on the anti-SARS-CoV-2 antibodies among healthcare workers in Poland—before and after BNT126b2 mRNA COVID-19 vaccination.
„Vaccines”. 2022; 10(10): 1576.
IF₂₀₂₂ = 7,8; pkt MEiN = 140
4. Lorent D., **Nowak R.**, Jankowska M., Kuszel Ł., Zmora P.
Differences in BNT126b2 and ChAdOx1 homologous vaccination antibody response among teachers in Poznan, Poland.
„Vaccines”. 2023; 11(1): 118.
IF₂₀₂₃ = 5,2; pkt MEiN = 140
5. Lorent D., **Nowak R.**, Figlerowicz M., Handschuh L., Zmora P.
Anti-SARS-CoV-2 antibodies level and COVID-19 vaccine boosters among healthcare workers with the highest SARS-CoV-2 infection risk – follow up study.
„Vaccines”. 2024; 12(5): 475.
IF₂₀₂₃ = 5,2; pkt MEiN = 140
6. Lorent D.*, **Nowak R.***, Gazecka M., Zmora P.*, Lenartowicz Onyekaa E.*
The effect of the PKR inhibitor, 2-aminopurine, on the replication of influenza A virus, and segment 8 mRNA splicing.
„Open Life Sciences”. 2025; 20(1): 1-11.
IF₂₀₂₅ = 3,200; pkt MEiN = 40

2. Streszczenie

Infekcje dróg oddechowych są jednymi z najczęstszych powodów zgonów na świecie, natomiast do patogenów najczęściej wywołujących wspomniane zakażenia należą między innymi: wirus grypy typu A (IAV, ang. *influenza A virus*) oraz drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-2, ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*). Do zakażenia komórki gospodarza, gdzie zachodzi cykl replikacyjny wirusów, niezbędne jest przyłączenie się wirusa do receptora na powierzchni komórki, a następnie wniknięcie do wnętrza komórki, na przykład na drodze endocytozy, oraz uwolnienie wirusowego materiału genetycznego do cytoplazmy. Wirusy, takie jak SARS-CoV-2 i IAV, wykorzystują czynniki komórkowe gospodarza do wnikania do wnętrza komórek i inicjowania infekcji. Zatem inhibicja wykorzystywanych przez wirusy czynników może posłużyć do opracowania nowych strategii przeciwwirusowych o wysokiej skuteczności, co jest kluczowe dla powstrzymania rozprzestrzeniania się nowo pojawiających się wirusów o potencjale epidemicznym/pandemicznym.

Celem pracy doktorskiej było opracowanie różnych strategii przeciwwirusowych opartych o hamowanie procesu wnikania wirusów do wnętrza komórki, a co za tym idzie: przerwanie cyklu replikacyjnego wirusów. Podstawą niniejszej pracy doktorskiej są trzy oryginalne publikacje naukowe, z których każda przedstawia odmienną, nowatorską metodę blokowania wnikania wirusów do komórki gospodarza.

Pierwsza publikacja, *Novel Molecular Consortia of Cannabidiol with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Emerging Coronaviruses' Entry*. **Pawelczyk A.*, Nowak R.*, et al., „Pathogens”, 2023**, wykazała, że koniugaty kannabidiolu (CBD) z niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (NLPZ) mogą wpływać hamująco na pierwszy etap cyklu replikacyjnego SARS-CoV-2. Koniugaty CBD-Naproxen i CBD-Ibuprofen zmniejszyły zdolność wnikania SARS-CoV-2 do komórek w większym stopniu niż sam CBD, poprzez zakłócanie interakcji białka kolca SARS-CoV-2 z receptorem komórkowym ACE2.

W drugiej publikacji, *TMPRSS2-specific antisense oligonucleotides inhibit host cell entry of emerging viruses*. **Nowak R., et al., „Virology”, 2024**, określono strukturę drugorzędową mRNA *TMPRSS2*, na podstawie której zaprojektowano oligonukleotydy antysensowe (ASO). ASO prowadziły do skutecznego wyciszenia ekspresji genu *TMPRSS2* w komórkach gospodarza. W rezultacie zaobserwowano wyraźny spadek wnikania SARS-CoV-2 do komórek oraz obniżenie replikacji IAV. Wyniki te potwierdziły, że *TMPRSS2* jest

nie tylko niezbędna do skutecznej infekcji, ale również stanowi atrakcyjny cel dla terapii przeciwwirusowej opartej na modyfikacji ekspresji genów.

Trzecia praca, *Organometallic–Erlotinib Conjugates Active against Lung Cancer Cells and as Emerging Virus Entry Inhibitors*, **Biegański P.***, **Gazecka M.*** **Nowak R., et al.**, „**Organometallics**”, **2024**, przedstawia nowatorskie podejście wykorzystujące koniugaty erlotynibu z resztami organometalicznymi. Te hybrydowe związki obniżały skuteczność infekcji SARS-CoV-2 i IAV poprzez pośrednie zahamowanie TMPRSS2-zależnych procesów aktywacyjnych białek powierzchniowych wirusów. Dodatkowo, w ramach niniejszej publikacji zidentyfikowaliśmy nowy, dotąd nieznany czynnik oddziałujący z TMPRSS2, tj. EGFR, będący kolejnym potencjalnym celem dla nowych terapii przeciwwirusowych.

Wyniki uzyskane w ramach mojej pracy doktorskiej wskazują na dużą skuteczność różnych strategii blokowania wnikania wirusów do komórek poprzez zahamowanie funkcji albo aktywności czynników komórkowych. Badania te otwierają nowe perspektywy dla rozwoju terapii przeciwwirusowych o szerokim spektrum działania i ukierunkowanych na wspólne mechanizmy molekularne wykorzystywane przez różne wirusy oddechowe. Zidentyfikowane związki i podejścia terapeutyczne mogą stanowić fundament do dalszych badań przedklinicznych i klinicznych nad nowymi lekami przeciwwirusowymi.

3. Summary

Respiratory infections are among the leading causes of death worldwide, with pathogens such as influenza A virus (IAV) and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) being the most common culprits. For a virus to infect a host cell and begin its replication cycle, it must first bind to a receptor on the cell surface. The virus then enters the cell, often via endocytosis, where it releases its genetic material into the cytoplasm. Viruses, such as SARS-CoV-2 and IAV, rely on host cell factors to facilitate entry and initiate infection. Therefore, inhibiting these host cell factors represents a promising strategy for developing highly effective antiviral therapies, which is crucial for controlling the spread of newly emerging viruses with epidemic or pandemic potential.

The goal of this dissertation was to explore various therapeutic strategies aimed at inhibiting viral entry into host cells, thereby disrupting the replication cycle of newly emerging respiratory viruses. This dissertation is based on three original scientific publications, each presenting a different, innovative method to block viral entry into host cells.

The first publication, *Novel Molecular Consortia of Cannabidiol with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Emerging Coronaviruses' Entry* (**Pawelczyk A.*, Nowak R.*, et al., "Pathogens", 2023**), demonstrated that conjugates of cannabidiol (CBD) with nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) could inhibit the first step in the SARS-CoV-2 replication cycle. The CBD-Naproxen and CBD-Ibuprofen conjugates reduced SARS-CoV-2 entry into cells more than CBD, by disrupting the interaction between the spike protein of SARS-CoV-2 and the ACE2 receptor on the host cell surface.

The second publication, *TMPRSS2-specific antisense oligonucleotides inhibit host cell entry of emerging viruses* (**Nowak R., et al., "Virology", 2024**), identified the secondary structure of *TMPRSS2* mRNA, which served as the basis for designing antisense oligonucleotides (ASOs). These ASOs effectively silenced *TMPRSS2* gene expression in host cells. Consequently, a marked reduction in SARS-CoV-2 entry and IAV replication was observed. These results confirmed that *TMPRSS2* is not only essential for efficient viral infection but also represents a promising target for gene expression-based antiviral therapies.

The third publication, *Organometallic–Erlotinib Conjugates Active against Lung Cancer Cells and as Emerging Virus Entry Inhibitors* (**Biegański P.*, Gazecka M.*, Nowak R., et al., "Organometallics", 2024**), presents a novel approach using erlotinib conjugates with organometallic residues. These hybrid compounds reduced the effectiveness

of SARS-CoV-2 and IAV infections by indirect inhibiting the TMPRSS2-dependent activation of viral surface proteins. In addition, within this publication, we showed a novel TMPRSS2 interactor, i.e. EGFR, which have potential as other novel antiviral..

The findings from this dissertation highlight the high efficacy of various strategies aimed at blocking viral entry into host cells by inhibiting host cell factors function and/or activity. These studies open up new possibilities for the development of broad-spectrum antiviral therapies targeting common molecular mechanisms used by different respiratory viruses. The compounds and therapeutic approaches identified in this research could serve as the foundation for further preclinical and clinical studies on new antiviral drugs.

4. Wprowadzenie

4.1 Infekcje dróg oddechowych wywołane przez nowo pojawiające się wirusy

Infekcje dróg oddechowych są jednymi z najczęstszych powodów śmierci na świecie według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) z 2021 roku. Infekcje dróg oddechowych mogą być powodowane między innymi przez: wirusy grypy typu A, B, C, (IAV, ang. *influenza A virus*; IBV, ang. *influenza B virus*; ICV, ang. *influenza C virus*), adenowirusy, koronawirusy, a także bakterie: *Haemophilus influenza*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* [1]. Jednocześnie patogenem, który wywołuje najwięcej przypadków zachorowań oraz wystąpień symptomów grypopodobnych na świecie, jak i w Polsce, są rinowirusy. Szacuje się, że u przeciętnego człowieka dochodzi do kilku infekcji rinowirusowych rocznie, co przekłada się na miliardy zakażeń na całym świecie [2]. Jednakże, pod względem śmiertelności oraz konsekwencji zdrowotnych to ludzki wirus niedoboru odporności (HIV, ang. *human immunodeficiency virus*), jest jednym z najbardziej niebezpiecznych patogenów na świecie. Pandemia HIV, która rozpoczęła się w latach dwudziestych XX wieku, trwa do dziś. Według danych WHO, około 630 000 osób zmarło z powodu HIV w 2022 roku, a całkowita liczba zgonów od 1981 roku wynosi około 40 milionów. Nieleczona infekcja prowadzi do rozwinięcia zespołu nabytego niedoboru odporności (AIDS, ang. *acquired immune deficiency syndrome*) i stopniowego wyniszczenia układu immunologicznego. Mimo że skuteczna terapia antyretrowirusowa obniżyła śmiertelność, w krajach o ograniczonym dostępie do terapii antyretrowirusowej, HIV/AIDS pozostaje jedną z głównych przyczyn zgonów [3].

Spośród wirusów wywołujących infekcje dróg oddechowych szczególne zagrożenie stanowią te, które mogą wywołać epidemię lub pandemię. Takie wirusy charakteryzują się wysokim poziomem zakaźności (w ujęciu wirusologicznym, które koncentruje się na właściwościach samego wirusa, zakaźność definiuje się jako zdolność czynnika chorobotwórczego lub jego konkretnej cechy do wywołania infekcji u podatnego gospodarza), skuteczną transmisją pomiędzy osobnikami ludzkiej populacji oraz wysokim poziomem zmienności genetycznej [4, 5].

Epidemia to zjawisko znaczącego wzrostu liczby zachorowań na określoną chorobę w danym regionie w krótkim czasie, przekraczające oczekiwaną liczbę przypadków w populacji. Występuje zazwyczaj nagle i ma charakter ograniczony czasowo. Przykładem mogą być sezonowe epidemie grypy. Sezonowe epidemie wywołane przez wirusy oddechowe stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi. Grypa sezonowa co roku

wywołuje chorobę u 5-15% ludzkiej populacji, z czego u 650 tysięcy osób prowadzi do zgonu [6]. Typowy sezon grypowy obejmuje na północnej półkuli okres jesienno-zimowy z cyrkulującymi w populacji IAV i IBV. Według danych opublikowanych przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, w Polsce co roku notuje się kilka milionów zachorowań na grypę lub inne infekcje grypopodobne. Wg danych PZH z 2022 r. odnotowano 88 zgonów w wyniku potwierdzonego zakażenia IAV [21], jednak średnia liczba zgonów związanych z grypą waha się od 6 000 do 15 000 rocznie, uwzględniając te będące powikłaniami po zakażeniu, np. zapaleniem płuc i niewydolnością krążeniową [7].

Pandemią nazywa się epidemię, która obejmuje zasięgiem występowania kilka kontynentów i krajów w tym samym czasie [8]. W przeciwieństwie do epidemii, szacuje się, że pandemie występują co kilkanaście lat. Jedną z najbardziej śmiertelnych pandemii w historii była pandemia IAV, tzw. hiszpanki, która wybuchła w 1918 roku i szacunkowo spowodowała około 550 mln infekcji i 20-100 mln zgonów [9]. Od początku XX wieku wirusy grypy jeszcze kilkakrotnie doprowadziły do wybuchu pandemii: w 1957 roku grypa azjatycka (ponad 500 mln infekcji, 1-2 mln zgonów), w 1968 r. grypa Hong-Kong (około 500 mln infekcji, 0,5-2 mln zgonów), w 1977 r. grypa rosyjska (kilkadziesiąt do kilkuset milionów infekcji, 1-2 mln zgonów) i w 2009 r. grypa świńska (700 mln – 1,8 mld infekcji, 0,1 mln do 0,5 mln zgonów) [10, 11] [Tabela 1].

Pandemia	Podtyp wirusa	Rok wybuchu	Liczba infekcji (szacunki)	Liczba zgonów (szacunki)
Grypa hiszpańska	H1N1	1918	~550 mln	20-100 mln
Grypa azjatycka	H2N2	1957	>500 mln	1-2 mln
Grypa Hong-Kong	H3N2	1968	~500 mln	0,5-2 mln
Grypa rosyjska	H1N1	1977	kilkadziesiąt do kilkuset mln	1-2 mln
Grypa świńska	H1N1	2009	700 mln – 1,8 mld	0,1-0,5 mln

Tabela 1. Największe pandemie grypy w XX i XXI wieku.

Innymi wirusami, które mogą prowadzić do zakaźnych chorób dróg oddechowych, są koronawirusy. Do dzisiaj wyodrębniono kilka koronawirusów powodujących łagodne infekcje dróg oddechowych i z tego powodu określa się je potocznie mianem „przeziębieniowych”. Są to wyizolowane w latach 60. XX wieku ludzkie koronawirusy (HCoV, ang. *human coronavirus*) HCoV-229E, HCoV-OC43 oraz zidentyfikowane w pierwszej dekadzie XXI wieku HCoV-HKU1, HCoV-NL63. Dodatkowe oznaczenia literowe i liczbowe w nazwie mogą wskazywać kraj wyizolowania wirusa, numer próbki laboratoryjnej lub szczepu referencyjnego, np. 229 to numer próbki laboratoryjnej, E to oznaczenie jednej z linii wirusa, OC43 oznacza numerację laboratoryjną szczepu (pierwotnie wyizolowany w Organ Culture 43), NL63 to wyizolowany w Holandii izolat o numerze laboratoryjnym 63. Zasięgiem występowania obejmują cały świat i stanowią 10-30% wszystkich zakażeń dróg oddechowych [12]. Choroba wywołana przez te wirusy zwykle ustępuje samoistnie i nie wymaga specjalistycznego leczenia. Symptomy to głównie: katar, kaszel, ból gardła, gorączka i ogólne osłabienie organizmu. Należy jednak mieć na uwadze, że przebieg zakażenia koronawirusami ‘przeziębieniowymi’ u dzieci, osób starszych oraz osób z osłabionym układem odpornościowym może mieć znacznie cięższy przebieg i w niektórych przypadkach prowadzić nawet do zgonu. Zakażenia tymi wirusami nie zapewniają długotrwałej ochrony organizmu i często się powtarzają [13, 14]. Niektóre koronawirusy mogą również powodować choroby o ciężkim przebiegu. W obecnym stuleciu doprowadziły one do wybuchu epidemii ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS, ang. *severe acute respiratory syndrome*), pandemii COVID-19 (ang. *coronavirus disease 2019*) oraz trwającej do dziś epidemii bliskowschodniego zespołu niewydolności oddechowej (MERS, ang. *middle east respiratory syndrome*). Pierwszy koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-1, ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 1*) pojawił się w 2003 roku i stanowił pierwszy udokumentowany przypadek koronawirusa wywołującego ciężką chorobę u ludzi. Spowodował on 8096 infekcji u ludzi, 774 zgonów, co daje śmiertelność na poziomie 9,5% [15]. Transmisja między ludźmi odbywała się głównie drogą kropelkową. W początkowej fazie infekcji występowały objawy takie jak: gorączka, bóle mięśniowe i złe samopoczucie, następnie pojawiały się objawy zakażenia dolnych dróg oddechowych, jak suchy kaszel i postępujące duszności. W wielu przypadkach u pacjentów następowało rozlane uszkodzenie pęcherzyków płucnych, które prowadziło do powstania zespołu ostrej niewydolności oddechowej (ARDS, ang. *acute respiratory distress syndrome*,) i konieczności stosowania wentylacji mechanicznej. Po 2003 roku nie odnotowano nowych przypadków SARS-CoV-

1 u ludzi. Epidemia wirusa SARS-CoV-1 została opanowana dzięki zastosowaniu skutecznych środków ochronnych, izolacji pacjentów, identyfikacji łańcucha kontaktów oraz ogólnej globalnej koordynacji działań WHO skutkujących przerwaniem łańcucha transmisji. Wzrost temperatury i wilgotności prawdopodobnie wpłynęły na ograniczenie transmisji wirusa. Przyczyniło się to do skutecznej izolacji pacjentów. W genomie SARS-CoV-1 nie doszło także do mutacji zwiększających jego poziom adaptacji do gospodarza ani zakaźności [16].

W 2012 roku na Bliskim Wschodzie został wykryty koronawirus powodujący bliskowschodni zespół niewydolności oddechowej. Koronawirus bliskowschodniego zespołu oddechowego (MERS-CoV, ang. *middle east respiratory syndrome coronavirus*) jest wirusem zoonotycznym, którego rezerwuarem są wielbłądy jednogarbne, a do zakażenia konieczny jest bezpośredni kontakt z chorymi zwierzętami lub produktami od nich pochodzącymi. Śmiertelność MERS-CoV jest bardzo wysoka i wynosi około 36%. Do dziś infekcję wykryto u 2613 osób, a zgon stwierdzono w 943 przypadkach zakażenia. Epidemia nie przekształciła się w pandemię, głównie ze względu na ograniczone geograficznie występowanie populacji gospodarza stanowiącego rezerwuariusz wirusa. Dodatkowo ciężki przebieg choroby ułatwiał izolację chorych oraz ograniczał transmisję wirusa, która jest na niskim poziomie i występuje w większości przypadków jedynie w szpitalach [17].

Jednakże to pandemia COVID-19 jest najbardziej współczesnym przykładem kryzysu w ochronie zdrowia, którego skutki odczuwane są do dzisiaj. Pierwszy przypadek choroby został zidentyfikowany w 2019 r. w Wuhan w Chinach, a infekcja charakteryzowała się wystąpieniem ciężkiego ostrego zespołu oddechowego o nieznanym etiologii. Na podstawie analiz metagenomicznych wykorzystujących sekwencjonowanie nowej generacji zidentyfikowano nowego betakoronawirusa nazwanego początkowo 2019-nCoV. Aktualne nazewnictwo, tj. drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego zostało przyjęte przez Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ICTV) na podstawie wysokiego stopnia homologii genetycznej z SARS-CoV-1. Na podstawie analiz filogenetycznych określono, że SARS-CoV-2 należy do podrodzaju *Sarbecovirus* w obrębie *Betacoronavirus* i wykazuje 79% homologię sekwencji nukleotydowej z SARS-CoV-1 oraz około 50% podobieństwa do MERS-CoV [18]. Analizy wskazały również, że najbliższym krewnym jest koronawirus RaTG13, wykryty u nietoperzy *Rhinolophus affinis* w chińskiej prowincji Junnan, którego sekwencja genomowa pokrywa się w 96,2% z genomem SARS-CoV-2 [19]. Ze względu na globalne rozprzestrzenianie się wirusa, 30 stycznia 2020 r. WHO ogłosiło stan zagrożenia zdrowia publicznego o zasięgu międzynarodowym, a 11 marca

2020 r. ogłoszono pandemię COVID-19 [20]. Od 2019 roku do dziś odnotowano 777 mln laboratoryjnie potwierdzonych przypadków COVID-19 oraz 7 mln zgonów na skutek zakażenia. W Polsce pierwszy przypadek zakażenia SARS-CoV-2 zidentyfikowano 4 marca 2020 roku, oraz potwierdzono laboratoryjnie ponad 6,7 mln zakażeń SARS-CoV-2 oraz ponad 120 tys. zgonów powiązanych z COVID-19 [21]. Jednak przytoczone liczby są prawdopodobnie niedoszacowane. Badania seroepidemiologiczne, których jestem współautorem, przeprowadzone w obszarze metropolitalnym Poznania od 28 lipca do 24 września 2020 roku, po pierwszej fali pandemii, wskazują, że rzeczywista liczba zakażeń mogła być znacznie wyższa niż ta raportowana przez Ministerstwo Zdrowia. Na podstawie uzyskanych danych oraz demografii regionu oszacowano, że w samej aglomeracji poznańskiej faktyczna liczba zakażeń SARS-CoV-2 była sześciokrotnie wyższa niż liczba przypadków oficjalnie zarejestrowanych w statystykach rządowych. Niedoszacowanie liczby przypadków wynikało z ograniczeń w testowaniu jedynie pacjentów wykazujących objawy zakażenia przy jednoczesnym występowaniu dużego odsetka zakażeń bezobjawowych [22].

W metaanalizie z 2021 r. oszacowano, że 35,1% przypadków zakażenia SARS-CoV-2 mogło przebiegać bezobjawowo, chociaż często pojawia się rozbieżność w szacunkach odsetka bezobjawowych zakażeń SARS-CoV-2, która wynika z różnic w definicjach, metodologii badań, charakterystyce badanych populacji oraz strategiach testowania [23]. Osoby zakażone nie poddawały się testom diagnostycznym, co prowadziło do istotnego zaniżenia liczby wykrytych infekcji. Czynniki społeczno-polityczne, takie jak: ograniczony dostęp do testów, niska świadomość społeczna i obawa przed stygmatyzacją, priorytety gospodarcze i polityczne oraz naciski na raportowanie danych, znacząco wpłynęły na niedoszacowanie liczby przypadków zakażeń SARS-CoV-2. Ponadto, niska seroprewalencja w populacji wskazuje, że odporność zbiorowiskowa nie odegrała istotnej roli w ograniczaniu pandemii, co nasilało konieczność wdrożenia masowych szczepień jako kluczowego narzędzia kontroli rozprzestrzeniania się wirusa.

Pandemia COVID-19 miała szerokie i długoterminowe konsekwencje dla gospodarki i społeczeństwa. Globalny PKB spadł o 3,1% co było największym kryzysem ekonomicznym od czasów II wojny światowej [24]. Wprowadzenie pakietów fiskalnych stymulujących gospodarkę doprowadziło do wzrostu długu publicznego. Kryzys pandemiczny doprowadził także do gwałtownego wzrostu bezrobocia, szczególnie w pierwszej połowie 2020 roku. Międzynarodowa Organizacja Pracy (ILO, ang. *International Labour Organisation*) oszacowała, że na skutek pandemii na całym

świecie utracono 33 miliony miejsc pracy. Pandemia miała również istotny wpływ na kluczowe sektory gospodarki. Przychody branży lotniczej spadły o 65% w 2020 roku [25], liczba międzynarodowych podróży turystycznych zmniejszyła się o 74% [26]. Pandemia COVID-19 wywarła też znaczący wpływ na zdrowie psychiczne populacji. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) oszacowała, że częstość występowania depresji i zaburzeń lękowych wzrosła o 25% w skali globalnej. W Polsce w 2021 roku aż 42% ankietowanych deklaroowało pogorszenie zdrowia psychicznego w czasie pandemii [27]. Jednocześnie w wielu krajach zaobserwowano wzrost liczby prób samobójczych, zwłaszcza wśród młodzieży – w tej grupie ich liczba wzrosła o 10-30% [28]. Jednocześnie pandemia wpłynęła również na edukację oraz strukturę demograficzną. Niektóre z długofalowych skutków będą odczuwalne przez kolejne dekady. Pandemia COVID-19 pozostawiła trwały ślad zarówno w strukturach gospodarczych i społecznych i zmieniła sposób funkcjonowania współczesnego świata [29]. 5 maja 2023 r. WHO ogłosiła zniesienie stanu zagrożenia zdrowia publicznego o zasięgu międzynarodowym [30].

4.2 Taksonomia i klasyfikacja wirusów grypy i koronawirusów

Taksonomia oparta na filogenetyce klasyfikuje wirusy grypy jako jednoniciowe wirusy RNA o ujemnej polarności należące do rodziny Orthomyxoviridae. Wirusy grypy mogą należeć do czterech rodzajów: IAV, IBV, ICV i wirus grypy typu D (IDV, ang. *influenza D virus*) [Tabela 2]. Nazewnictwo szczepów wirusa grypy opiera się na kilku następujących po sobie elementach takich jak: podtyp wirusa, pochodzenie geograficzne izolatu wirusa, numer próbki, rok izolacji oraz numer podtypu hemaglutyniny i neuraminidazy, np. wirus grypy A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) oznacza wirusa grypy typu A wyizolowanego w Puerto Rico w 1934 roku, 8 to numer laboratoryjny wirusa, podtyp hemaglutyniny 1 i neuraminidazy 1 [31].

	IAV	IBV	ICV	IDV
Rodzina wirusów	Orthomyxoviridae			
Genom	RNA jednoniciowy, segmentowane (8 segmentów)	RNA jednoniciowy, segmentowane (8 segmentów)	RNA jednoniciowy, segmentowane (7 segmentów)	RNA jednoniciowy, segmentowane (7 segmentów)

Podział na podtypy	Tak, np. H1N1, H3N2	Nie, ale dzieli się na linie Victoria i Yamagata	Nie	Nie
Rezerwuariusz wirusa	Ludzie, ptaki, ssaki (np. świnie, konie, foki, nietoperze)	Ludzie	Ludzie, świnie	Bydło, świnie
Potencjał pandemiczny	Wysoki – wywołuje pandemię	Niski – ograniczona do epidemii sezonowych	Niski – brak epidemii i pandemii	Niski – rzadko infekuje ludzi
Częstość mutacji	Wysoka (zmienność antygenowa)	Średnia, mutuje wolniej niż grypa typu A	Niska	Niska
Chorobotwórczość	Średnia do wysokiej – może powodować ciężką gripę	Średnia – sezonowa grypa	Niska – łagodne infekcje	Niska – nie zakaża ludzi
Sezonowość	Sezonowa, ale także w pandemii	Sezonowa (zimowa)	Występuje sporadycznie	Brak danych
Objawy kliniczne	Gorączka, kaszel, bóle mięśni, zapalenie płuc	Podobne do grypy typu A, zwykle łagodniejsze	Łagodne objawy grypopodobne	Nie zakaża ludzi
Śmiertelność (%)	0,1-2% (wyższa podczas pandemii)	0,1-0,5%	Bardzo niska (<0,1%)	Nie dotyczy ludzi

Grupa ryzyka	Osoby starsze, dzieci, kobiety w ciąży	Dzieci i osoby starsze	Dzieci i osoby z osłabioną odpornością	Zwierzęta gospodarskie (bydło)
Dostępność szczepionki	Tak – co roku aktualizowane	Tak – co roku aktualizowane	Brak szczepionki	Brak szczepionki
Zakaźność (R0)	1,4-2,8	1,1-1,6	<1	Brak danych

Tabela 2. Porównanie cech wirusów IAV, IBV, ICV oraz IVD.

Wirus grypy typu A

Jest najczęściej występującym typem wirusa grypy u ludzi i odpowiada za większość przypadków sezonowej grypy (75% przypadków zakażeń). Głównym rezerwuarem IAV są dzikie ptaki wodne, ale wirus ten może zakażać również ludzi, świnie, konie, foki i inne ssaki. Infekcja IAV prowadzi do choroby układu oddechowego, której objawami są głównie: gorączka, dreszcze, bóle głowy i mięśni, kaszel, ból gardła i wyczerpanie organizmu, uczucie rozbicia. Najbardziej charakterystycznym objawem jest nagły początek choroby z wysoką gorączką i silnym osłabieniem, odróżniający grypę od innych zakażeń wirusowych dróg oddechowych. W ciężkich przypadkach może dojść do zapalenia płuc, niewydolności oddechowej lub powikłań kardiologicznych. Najbardziej narażone na ciężki przebieg choroby i wystąpienie powikłań są: osoby starsze >65 lat, dzieci poniżej 5. roku życia, osoby z chorobami przewlekłymi, np. cukrzycą, przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POCHP), astmą, chorobami serca, kobiety w ciąży i osoby z obniżoną odpornością. Klasyfikacja IAV odbywa się na podstawie białek występujących w błonie wirionu: hemaglutyniny (HA lub H) oraz neuraminidazy (NA lub N). Obecnie opisano 18 podtypów hemaglutyniny (H-H16) oraz 11 podtypów neuraminidazy (N1-N9), przy czym różnice między nimi wynikają z ich struktury molekularnej, właściwości funkcjonalnych oraz powinowactwa do receptorów. Podtypy HA różnią się strukturą kieszeni wiążącej receptor oraz specyficznością wiązania kwasu sialowego. Natomiast poszczególne podtypy NA różnią się aktywnością enzymatyczną, optymalnym pH działania, stabilnością termiczną oraz wrażliwością na inhibitory. Duża różnorodność szczepów IAV wynika między innymi z możliwości utworzenia aż 198 kombinacji segmentów kodujących hemaglutyninę i neuraminidazę. Najczęściej występującymi typami są H1N1 oraz H3N2, które odpowiadają za sezonowe epidemie. Wysoka zmienność IAV i jej infekcyjność wynika z zachodzenia mechanizmu skoku antygenowego (ang. *antigenic shift*) oraz przesunięcia antygenowego (ang. *antigenic drift*) [31]. W wyniku zachodzenia przesunięcia antygenowego, a więc akumulowania się

mutacji w genach kodujących białka wirusa, dochodzi do powstawania nowych wariantów wirusa grypy. Z kolei skok antygenowy to nagła, istotna zmiana w genomie wirusa, prowadząca do powstania nowego podtypu antygenowego. Występuje głównie w przypadku wirusa grypy typu A i wynika z reasortacji segmentów RNA między różnymi szczepami wirusa, co może prowadzić do powstania pandemii.

Dzięki monitorowaniu i analizie filogenetycznej wirusów grypy możliwe jest przewidywanie kierunków ich ewolucji i skuteczniejsze zapobieganie epidemiom. Obecnie WHO prowadzi program monitorowania rozprzestrzeniania się wirusów grypy na świecie o nazwie Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS). Laboratoria referencyjne monitorują pojawianie się i rozprzestrzenianie nowych szczepów wirusa grypy przez analizę właściwości antygenowych i genetycznych, dzięki czemu możliwe jest uaktualnienie składu szczepionek przeciwko grypie [32].

Chociaż wirusy grypy mogą zakażać ludzi, ich naturalnym rezerwuarem są ptaki. Na podstawie przebiegu choroby u zakażonego drobiu wyróżnia się dwa typy wirusa ptasiej grypy (AIV, ang. avian influenza virus) : wysoce zjadliwy (HPAI, ang. *highly pathogenic avian influenza*) (miara zdolności wirusa do zakażenia i wywoływania choroby) oraz nisko zjadliwy (LPAI, ang. *low pathogenic avian influenza*). Zjadliwość wirusa rozumiana jako miara zdolności wirusa do zakażenia i wywoływania choroby.. Większość znanych wirusów ptasiej grypy należy do LPAI i powoduje jedynie łagodne objawy lub przebiega bezobjawowo u ptaków. Z kolei HPAI wywołują ciężkie schorzenia i charakteryzują się wysoką śmiertelnością wśród drobiu. W większości przypadków wirusy HPAI są również bardzo niebezpieczne dla ludzi – prowadzą do ciężkich zakażeń, a nawet śmierci [33]. Podtyp H5N1 AIV w 1997 roku w Hongkongu spowodował masowe zachorowania i padnięcia drobiu i pierwsze udokumentowane przypadki transmisji bezpośredniej z ptaków na ludzi. Podtyp ten charakteryzuje się wysoką śmiertelnością u drobiu (ok. 90-100%) oraz zdolnością do infekowania wielu gatunków ssaków, w tym ludzi. Zakażenie AIV podtypu H5N1 u ludzi prowadzi do ciężkiego zapalenia płuc z wysoką śmiertelnością (ok. 60%), jednak zdolność tego wirusa do transmisji międzyludzkiej pozostaje ograniczona [34]. Z kolei IAV podtyp H7N9 pojawił w Chinach w 2013 roku i od tego czasu był przyczyną kilku epidemii. Jednakże w piątej fali epidemicznej występującej w latach 2016-2017 pojawiły się szczepy wysoce patogenne AIV H7N9. Charakterystyczną cechą tego podtypu jest szczególnie silne powinowactwo do receptorów α -2,6 oraz α -2,3, co może tłumaczyć jego zwiększoną zdolność do infekowania ludzi w porównaniu z innymi wirusami ptasiej grypy [35].

Do identyfikacji podtypów hemaglutyniny (HA) i neuraminidazy (NA) wirusów grypy typu A wykorzystuje się analizę sekwencji genetycznych (testy RT-PCR) oraz testy serologiczne (testy inhibicji hemaglutynacji HI; ang. *hemagglutination inhibition*) oraz testy hamowania neuraminidazy NAI (ang. *neuraminidase inhibition*), które umożliwiają precyzyjne określenie wariantów tych białek powierzchniowych. Test inhibicji hemaglutynacji jest stosowany powszechnie do oceny poziomu przeciwciał przeciwko IAV, takim jak H1N1 i H7N9. Wartości HI wyraża się jako najmniejsze stężenie surowicy, które hamuje hemaglutynację erytrocytów przez wirusa. Wyższe miano HI wskazuje na wyższy poziom przeciwciał neutralizujących. W przypadku H1N1 miano HI wynosi w przedziale 40-320. Wartości te mogą być zmienne w zależności od szczepu. W przypadku pandemicznego szczepu H1N1 z 2009 roku wartości HI często wynosiły od 80 do 160. Z kolei IAV H7N9 charakteryzuje się niskimi wartościami HI, często poniżej 40. Wirusy grypy typu B posiadają jedynie dwie główne linie antygenowe, a wirusy grypy typu C i D nie wykazują znaczącej zmienności w HA i NA. Poszczególne typy wirusów grypy różnią się od siebie budową strukturalną, właściwościami, zdolnościami do zakażenia różnych gatunków zwierząt oraz samym przebiegiem wywoływanej przez nie choroby u ludzi [36] [Tabela 2].

Wirus grypy typu B

IBV pierwszy raz opisano w 1940 roku. IBV przenosi się głównie wśród ludzi, choć infekuje również foki. IBV nie jest klasyfikowane na podtypy H i N, jak ma to miejsce w przypadku wirusów typu IAV. Zamiast tego IBV dzieli się na dwie główne linie filogenetyczne: Victoria i Yamagata. Wynika to z mniejszej zmienności genetycznej wirusów IBV, dlatego podział na linie filogenetyczne jest wystarczający do klasyfikacji różnorodności. Dodatkowo wśród IBV rekombinacja między różnymi szczepami występuje na niskim poziomie, a same wirusy krążą głównie w populacji ludzkiej. Sama struktura białek powierzchniowych HA i NA nie charakteryzuje się taką różnorodnością jak IAV, dlatego klasyfikacja na podtypy nie jest konieczna. Prawdopodobnie po pandemii COVID-19 linia B/Yamagata wymarła, gdyż obecnie nie obserwuje się nowych przypadków zakażeń w globalnych bazach danych sekwencyjnych, np. GISAID, WHO FluNet. Wynika to z kilku czynników. Przed pandemią COVID-19 linia B/Victoria dominowała w globalnym rozprzestrzenianiu się IBV. Powszechne stosowanie masek, dystansu społecznego, ograniczenie podróży oraz zamknięcie szkół i miejsc publicznych znacząco ograniczyły transmisję wirusa grypy. Dodatkowo brak rezerwuaru zwierzęcego IBV mógł doprowadzić do całkowitego

wyeliminowania linii B/Yamagata. Obecnie postuluje się usunięcie komponentu linii B/Yamagata z powstających szczepionek przeciw grypie. Choroba wywoływana przez IBV charakteryzuje się występowaniem gorączki powyżej 38°C, suchym kaszlem, bólem mięśni i stawów, bólem głowy i osłabieniem organizmu. Dzieci i młodzież w wieku 5–19 lat należą do grupy najbardziej narażonych na infekcję wirusem [37]. W przypadku IBV również może zachodzić zjawisko skoku oraz przesunięcia antygenowego. Stosowane w leczeniu grypy leki mogą wykazywać mniejszą skuteczność w leczeniu zakażenia IBV, niż w leczeniu zakażeń wywołanych przez IAV [38][Tabela 2].

Wirus grypy typu C

ICV zwykle wywołuje chorobę o łagodnym przebiegu klinicznym, objawiającą się przede wszystkim infekcją dróg oddechowych oraz gorączką. Występuje głównie u dzieci i młodzieży. Głównym nosicielem ICV jest człowiek, ale wirus może się przenosić na świnię i psy. Według badań ICV potencjalnie może wywoływać epidemie ze względu na zachodzenie mechanizmu reasortacji segmentów. ICV posiada hemaglutynino-esterazę (HEF) będące białkiem powierzchniowym, które pełni rolę wiązania do receptorów na powierzchni komórek gospodarza oraz posiada aktywność neuraminidazy [39][Tabela 2].

Wirus grypy typu D

IDV został odkryty stosunkowo niedawno, bo dopiero w 2011 roku w USA. Infekuje głównie bydło, chociaż może powodować infekcje u ludzi, świń i fretek. Pomimo że infekcja IDV u ludzi jest stosunkowo rzadka, to obecnie 1,3% populacji posiada specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko temu wirusowi, świadczące o przebyciu zakażenia. Podobnie jak ICV, IDV posiada hemaglutynino-esterazę (HEF), które pełni podobne funkcje jak białka hemaglutyniny (HA) i neuraminidazy (NA). Pozwala to na wiązanie się z komórkami gospodarza oraz rozkład kwasu sialowego [40][Tabela 2].

Koronawirusy

W przeciwieństwie do powyżej opisywanych wirusów grypy, koronawirusy posiadają jednoniciowy, niesegmentowany genom RNA o dodatniej polarności. Wirusy te należą do rodziny *Coronaviridae*, rzędu *Nidovirales*. Ze względu na ich pochodzenie ewolucyjne dzielimy je na koronawirusy alfa, beta, gamma i delta [Tabela 3]. Objawy występujące przy zakażeniu koronawirusami zazwyczaj są łagodne [Tabela 4].

Alfakoronawirusy pochodzą głównie od nietoperzy, które stanowią ich naturalny rezerwuuar. HCoV-229E i HCoV-NL63 wyewoluowały z wirusów występujących u nietoperzy owocożernych. Infekują one przede wszystkim ssaki, np. koty, psy i ludzi. Zwykle powodują łagodne infekcje dróg oddechowych. Niektóre szczepy mogą jednak wywoływać poważniejsze choroby u zwierząt, np. wirus zakaźnego zapalenia otrzewnej kotów (ang. *feline infectious peritonitis virus*, FIPV) [41, 42],[Tabela 3].

Betakoronawirusy również wywodzą się od nietoperzy. Niektóre z nich mogą przenosić się przez inne ssaki, takie jak łaskuny (SARS-CoV-1) czy wielbłądy (MERS-CoV), mogą zakażać również ludzi. Betakoronawirusy dzieli się dodatkowo na cztery podgrupy (A, B, C, D). Koronawirusy beta HCoV-OC43 i HCoV-HKU1 są szeroko rozpowszechnione w populacji ludzkiej i są odpowiedzialne za sezonowe, łagodne do umiarkowanych infekcje dróg oddechowych, przypominające przeziębienie. Z kolei wirusy, takie jak SARS-CoV-1, MERS-CoV oraz SARS-CoV-2 charakteryzują się wysokim potencjałem pandemicznym ze względu na zdolność do mutacji i rekombinacji genetycznej. Mają również wyższy współczynnik śmiertelności, a sama infekcja może mieć ciężki przebieg. Ciężkie przypadki infekcji występują głównie u osób starszych i z chorobami współistniejącymi [13][Tabela 3].

Gammakoronawirusy występują głównie u ptaków, będących głównym rezerwuarem. Wywołują zakażenia u drobiu, np. wirus zakaźnego zapalenia oskrzeli drobiu (AIBV, ang. *avian infectious bronchitis virus*), który wywołuje infekcje dróg oddechowych u kurcząt. Niektóre gammakoronawirusy mogą także infekować ssaki morskie, np. koronawirus wieloryba białego SW1 wykryty u białuchy arktycznej. Ich znaczenie epidemiologiczne dla ludzi jest ograniczone, ponieważ nie udokumentowano przypadków infekcji ludzi, ale mogą powodować straty w hodowli zwierząt [41, 42, 44]. Filogenetycznie gammakoronawirusy należą do jednej z trzech głównych, klasycznych linii koronawirusów i charakteryzują się stabilnym genomem o niższej zawartości G+C oraz relatywnie mniejszym potencjałem rekombinacyjnym [45][Tabela 3].

Deltakoronawirusy są szeroko rozpowszechnione wśród ptaków, które są ich naturalnym rezerwuarem. Koronawirusy delta mogą także zakażać niektóre ssaki, np. świński deltakoronawirus (PDCoV, ang. *Porcine deltacoronavirus*). Powoduje on biegunkę i odwodnienie u prosiąt, prowadząc do znacznych strat w hodowli trzody chlewnej. Nie odnotowano przypadków ich transmisji na ludzi, choć teoretycznie mogą one ulec ewolucji i przystosować się do nowych gospodarzy [41, 42, 46]. Deltakoronawirusy zostały wyodrębnione jako czwarty, filogenetycznie odrębny rodzaj koronawirusów,

charakteryzujący się wyższą zawartością G+C oraz zwiększoną zdolnością do homologicznej rekombinacji w porównaniu do gammakoronawirusów [45][Tabela 3].

Cecha	Alfa koronawirusy	Beta koronawirusy	Gamma koronawirusy	Delta koronawirusy
Rodzina wirusów	Coronaviridae			
Genom	RNA jednoniciowy, dodatni	RNA jednoniciowy, dodatni	RNA jednoniciowy, dodatni	RNA jednoniciowy, dodatni
Liczba segmentów RNA	1	1	1	1
Przykładowe szczepy	HCoV-229E, HCoV-NL63	SARS-CoV, SARS-CoV-2, HCoV-OC43, HCoV-HKU1	AIBV	PDCoV
Rezerwuuar wirusa	Nietoperze, ludzie i inne ssaki są tylko gospodarzem	Ludzie, nietoperze, gryzonie	Ptaki, ssaki morskie, np. delfiny i wieloryby	Ptaki, świnie
Potencjał pandemiczny	Niski – infekcje przeziębieniowe	Wysoki – SARS, MERS, COVID-19	Bardzo niski – nie zakaża ludzi	Bardzo niski – brak infekcji ludzi
Częstość mutacji	Średnia	Wysoka	Średnia	Średnia
Śmiertelność (%)	<0,1%	1-35% (zależnie od szczepu, COVID-19 ~1-3%)	Nie dotyczy ludzi	Nie dotyczy ludzi

Liczba przypadków rocznie (globalnie)	Nieznana, częste infekcje	Miliony (np. COVID-19)	Nie dotyczy ludzi	Nie dotyczy ludzi
Grupa ryzyka	Dzieci, osoby starsze	Cała populacja	Ptaki, ssaki morskie	Ptaki, świnie
Zakaźność (R0)	1,2 – 1,5	1,5 – 8,0 (np. COVID-19)	Nie dotyczy	Nie dotyczy
Sezonowość	Cały rok	Cały rok, sezonowe wzrosty	Brak danych	Brak danych

Tabela 3. Ogólna charakterystyka poszczególnych grup koronawirusów.

Rodzaj zakażenia	HCoV-OC43, HCoV-HKU1	SARS-CoV-2	SARS-CoV-1	MERS-CoV
Bezobjawowe	30-50%	30-40%	<5%	<10%
Łagodny przebieg	50-70%	40-55%	60-70%	25-30%
Ciężki przebieg	<1%	10-15%	20-30%	60-70%
Krytyczny stan / ARDS	<0,1%	3-5%	10-15%	20-30%
Śmiertelność	<0,1%	~1-3%	~9,6%	~35%

Tabela 4. Przebieg zakażenia HCoVs w zależności od grupy filogenetycznej [150-157].

4.3 Cykle replikacyjne wirusa grypy typu A i SARS-CoV-2

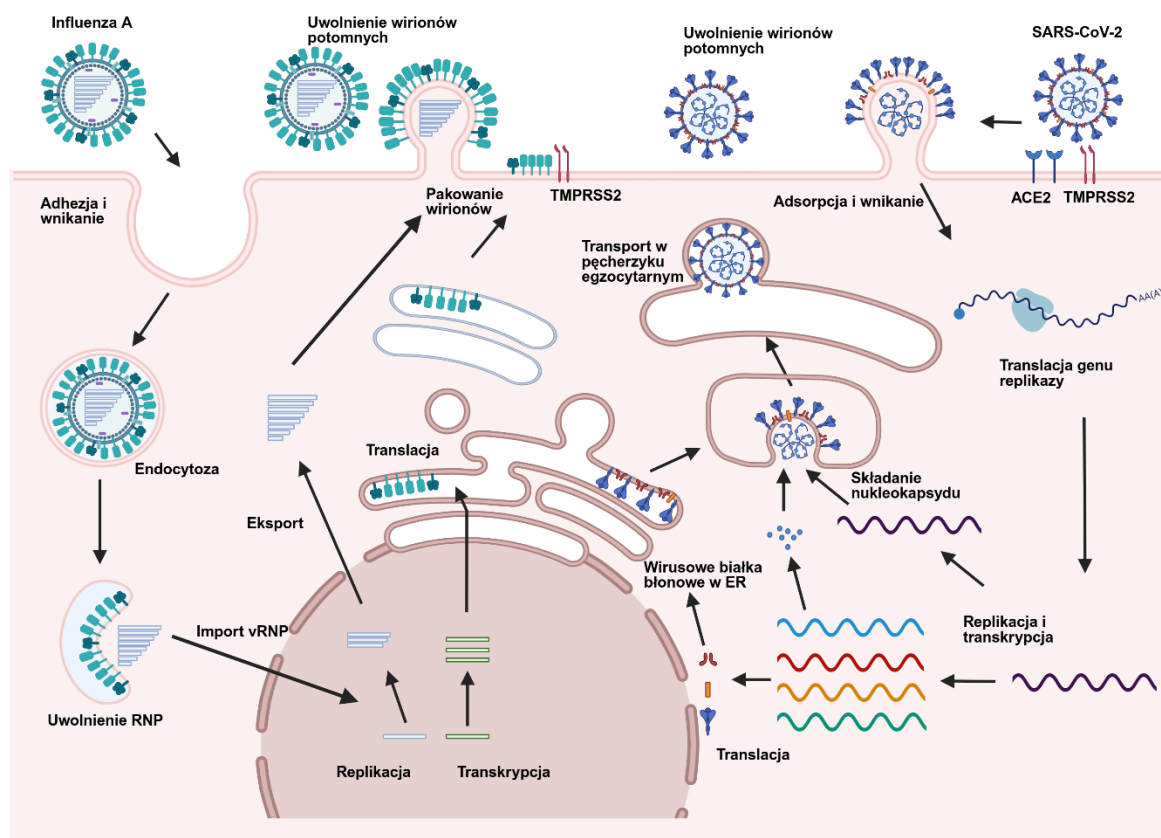
Cykl replikacyjny wirusów jest procesem bardzo złożonym, w którym biorą udział poszczególne białka wirusowe oraz białka komórki gospodarza. Proces ten jest wieloetapowy i dzieli się na **A.** adsorpcję, **B.** wnikanie, **C.** replikację wirusowego materiału genetycznego i jego transkrypcję, **D.** syntezę białek wirusowych, **E.** składanie wirionów oraz ich uwolnienie [Ryc. 1].

A. Każdy cykl replikacyjny rozpoczyna się adsorpcją cząsteczki wirusa, czyli przyłączeniem się wirusa do receptora znajdującego się na powierzchni komórki. W tym procesie biorą udział receptory oraz czynniki komórkowe, które umożliwiają adsorpcję. Receptorami wykorzystywanymi przez wirusy mogą być białka, cukry lub lipidy

na powierzchni komórek. Czynniki komórkowe umożliwiają zatrzymanie cząstek wirusowych na powierzchni komórki oraz ułatwiają oddziaływanie z receptorem. Receptory komórkowe charakteryzują się wysoką swoistością, a występowanie danego receptora na powierzchni komórki może określać podatność na zakażenie. Właściwym receptorem komórkowym dla wirusa grypy jest kwas sialowy (kwas N-acetyloneuraminowy). IAV wykazują specyficzność receptorową zależną od gospodarza: wirusy ptasie preferują kwas sialowy z wiązaniem α -2,3 do galaktozy, natomiast wirusy ludzkie rozpoznają kwas sialowy połączony wiązaniem α -2,6. Specyficzność receptorowa, którą charakteryzują się IAV, ma kluczowe znaczenie dla epidemiologii, transmisji międzygatunkowej oraz ryzyka wystąpienia pandemii. Różnice w preferencyjności wiązania do danego receptora stanowią barierę międzygatunkową, która utrudnia bezpośrednie zakażenie ludzi przez wirusy ptasie. Z tego powodu ich zdolność do rozprzestrzeniania się w populacji ludzkiej jest ograniczona. Inny gatunek zwierzęcia, który może być zakażony wirusami grypy, tj. świnie posiadają oba typy receptorów i mogą pełnić rolę gospodarza pośredniego, co czyni je tzw. „naczyniem mieszającym” (ang. *mixing vessel*). Umożliwia to reasortację genów pomiędzy wirusami ptasimi i ludzkimi, co prowadzi do powstawania nowych wariantów wirusa i stanowi potencjalne źródło przyszłych pandemii.

Oprócz receptorów zidentyfikowano również wiele innych białek odgrywających rolę w procesie wnikania wirusów do komórki, np. epsyna 1 (Epsin-1, EPN1) kluczowa dla endocytozy zależnej od klatryny (CME, ang. *clathrin-mediated endocytosis*); EGFR (ang. *epidermal growth factor receptor*), którego aktywacja może promować internalizację IAV; fosfolipaza D (PLD, ang. *phospholipase D*) zaangażowana w przebudowę błony komórkowej i fuzję błony wirusowej z komórkową; zasializowany zależny od napięcia kanał wapniowy (VGCC, ang. *sialylated voltage-gated calcium channel*) istotny dla endocytozy i fuzji wirusa z błoną komórkową, który modeluje napływ jonów Ca^{2+} ; nukleolina powierzchniowa komórki (NCL, ang. *surface nucleolin*) pełniąca rolę receptora lub koreceptora dla niektórych wirusów, prolidaza (ang. *prolidase*), będąca enzymem wpływającym na szlaki sygnałowe regulujące infekcję wirusową; fibronektyna (FN1, ang. *fibronectin*) stanowiąca białko macierzy uczestniczące w procesach adhezji wirusa.

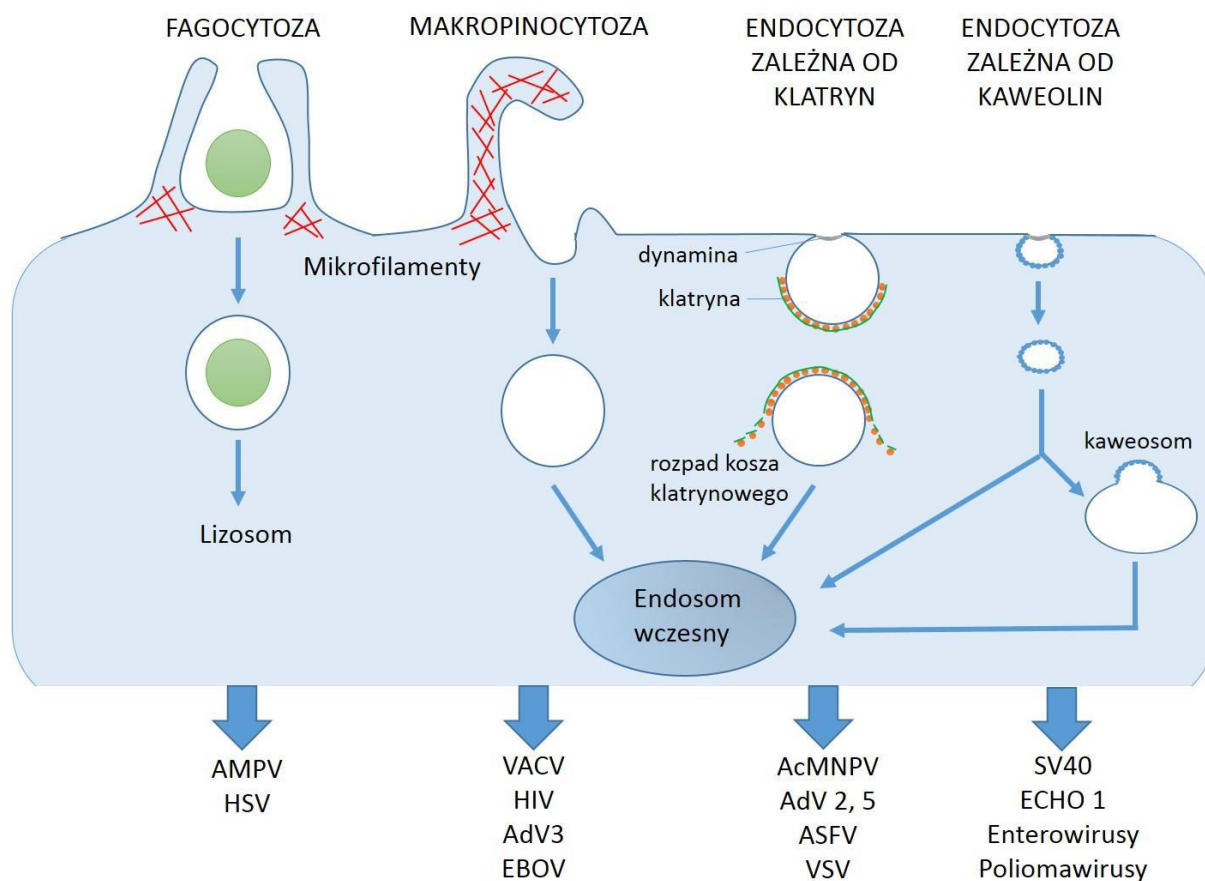
W przypadku SARS-CoV-2 rolę receptora odgrywa druga konwertaza angiotensyny (ACE2, ang. *angiotensin convertase enzyme*) z którym wiąże się białko S wirusa w celu umożliwienia wniknięcia do komórki gospodarza [47, 48, 49, 50, 51, 52].



Rycina 1. Cykl replikacyjny SARS-CoV-2 i wirusa grypy typu A.

B. Dzięki rozpoznaniu odpowiedniego receptora wirusowego na powierzchni komórki, możliwa jest inicjacja kolejnego etapu cyklu replikacyjnego. Adsorpcja wirusa w miejscach skupisk receptorów na powierzchni błony komórkowej prowadzi do zmiany jej struktury oraz inicjuje proces wnikania wirusa do wnętrza komórki. Indukuje to sygnalizację komórkową i powoduje powstanie wgłębienia błony komórkowej, a następnie pęcherzyka endocytarnego. Wirusy wykształciły różnorodne mechanizmy umożliwiające im wnikanie do komórek gospodarza. Proces ten jest kluczowy dla inicjacji zakażenia i może przebiegać na kilka sposobów, w zależności od rodzaju wirusa oraz typu komórki docelowej [Ryc. 2]. Najczęściej wykorzystywanym mechanizmem wnikania wirusów do komórek jest CME. Podczas tego procesu wirus wiąże się z receptorami na powierzchni komórki, następnie tworzy wpuklenia błony komórkowej. Białko klatryny rekrutowane jest na powierzchnię błony w odpowiedzi na sygnały komórkowe i tam tworzy otoczki wokół powstających pęcherzyków transportowych. Wytworzone pęcherzyki endocytarne są transportowane do wnętrza komórki. Przykładami wirusów wykorzystujących ten mechanizm są wirusy grypy i adenowirusy. Alternatywną ścieżką endocytarną jest endocytoza zależna od kaweoliny (CMEV, *ang. caveolin-mediated endocytosis*), w której wirusy wnikają

do komórki poprzez struktury nazywane kaweolami. Jest to mechanizm charakterystyczny np. dla małpiego wirusa 40 (SV40, ang. *simian virus 40*) [53]. W przypadku IAV, proces ten jest charakterystyczny dla komórek śródbłónki i fibroblastów, a jego udział w zakażeniu wirusem grypy jest rzadziej obserwowany niż w klasycznej endocytozie zależnej od klatryny. W niektórych przypadkach może stanowić alternatywną drogę zakażenia, umożliwiając wirusowi uniknięcie konwencjonalnych mechanizmów obronnych komórki, takich jak szlak endosomalno-lizosomalny. Z kolei innym niespecyficznym mechanizmem wnikania jest makropinocytoza (MP, ang. *macropinocytosis*), podczas której komórka pochłania duże ilości płynu zewnątrzkomórkowego wraz z cząsteczkami, które są w nim rozpuszczone. Ten mechanizm wnikania wykorzystują wirus Ebola, wirus krowianki i HIV. W przypadku IAV, mechanizm MP może zachodzić w wyniku stymulacji szlaków sygnalizacyjnych zależnych od kinazy fosfatydyloinozytolu 3 (PI3K) oraz białka Akt. Proces makropinocytozy pozwala na wniknięcie wirusa do wnętrza komórki bez konieczności specyficznej interakcji z receptorami endocytarnymi. Odminnym sposobem wnikania wirusów jest fagocytoza, wykorzystująca makrofagi i neutrofile, które aktywnie pochłaniają duże cząstki takie jak wirusy. Pomimo że jest to mechanizm eliminacji patogenów, niektóre wirusy jak wirus opryszczki pospolitej (HSV, ang. *herpes simplex virus*), są w stanie wykorzystywać go do infekcji komórek. Wnikanie niektórych wirusów, np. SARS-CoV-2, do komórki może odbywać się również przez bezpośrednią fuzję błony wirusa z błoną komórkową. W przypadku nielicznych wirusów, np. pikoronawirusów, możliwe jest wnikanie do wnętrza komórki poprzez formowanie porów w błonie komórkowej, przez które ich RNA jest transportowane do wnętrza komórki [47, 48, 49, 50, 51, 52].



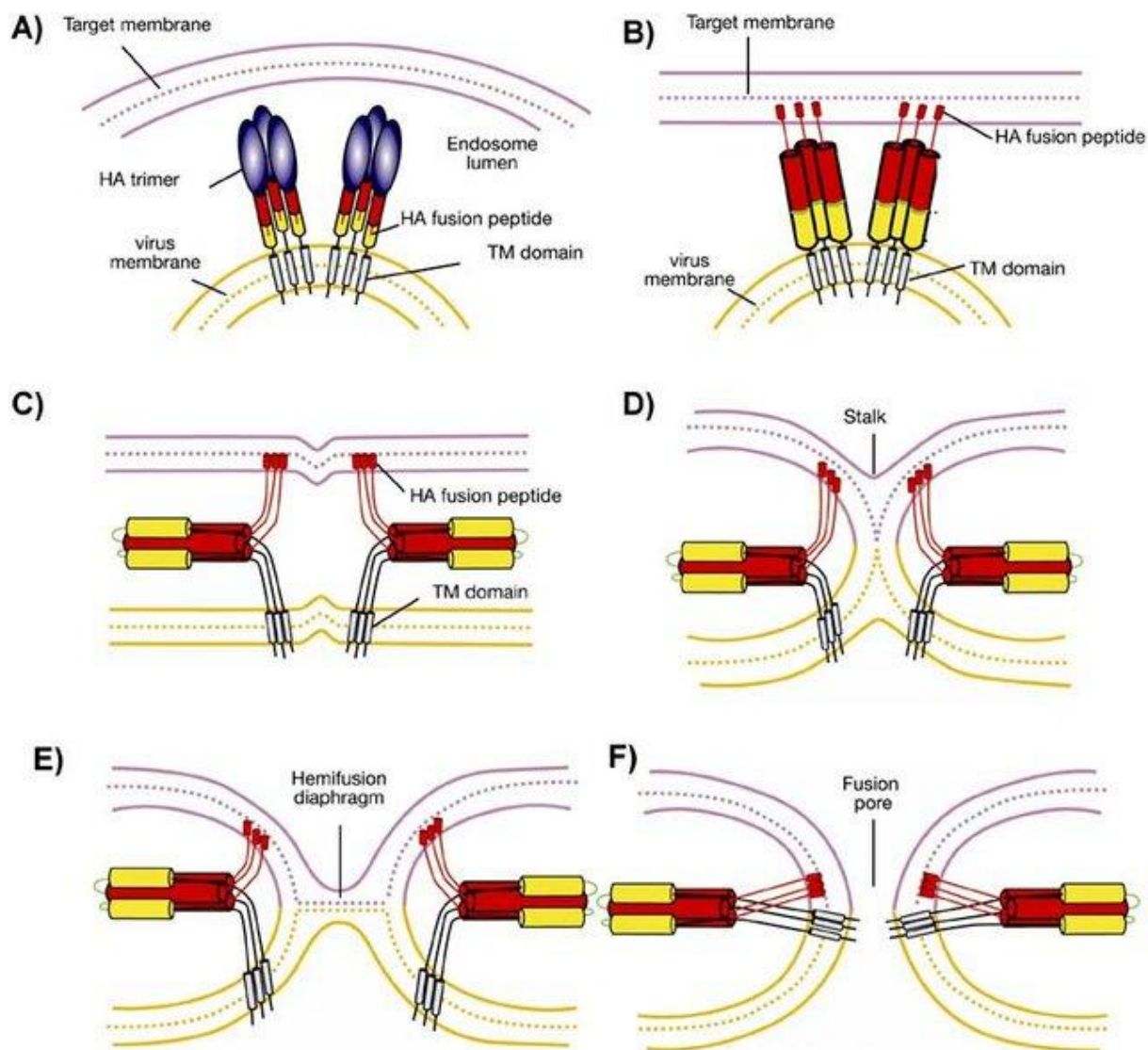
Rycina 2. Schemat wnikania wirusów do komórki [53].

Wnikanie IAV do wnętrza komórki zachodzi na skutek oddziaływania hemaglutyniny (HA) (szczegółowy opis budowy znajduje się w kolejnym rozdziale) znajdującej się na powierzchni błony wirusa z cząsteczką kwasu sialowego, który występuje na powierzchni komórek. W przypadku IAV internalizacja zachodzi głównie na drodze CME chociaż istnieją także alternatywne, rzadziej występujące mechanizmy wnikania wirusa jak: makropinocytoza, CMEV i endocytoza niezależna od klatryny i kaweoliny (ang. *clathrin- and caveolin-independent endocytosis*). Podczas tego procesu wirion przedostaje się do wnętrza komórki osadzony we wnętrzu małych pęcherzyków błonowych, bez udziału klasycznych struktur endocytarnych. Mechanizm ten jest słabo poznany, jednak potencjalnie może on odgrywać rolę w zakażeniu specyficznych typów komórek, gdy inne ścieżki internalizacji są zablokowane lub niewystarczające. Alternatywne mechanizmy internalizacji mogą zwiększać efektywność zakażenia wirusa grypy, umożliwiając mu adaptację do różnych warunków środowiskowych oraz gospodarzy o odmiennych właściwościach biologicznych.

Wirus grypy wnika do komórki wewnątrz endosomu, gdzie następują zmiany konformacyjne w wirusowych kanałach jonowych M2, co prowadzi do zakwaszania środowiska wewnątrz endosomu i skutkuje spadkiem pH do 5,5-5,0. Jest to zasadniczy etap, podczas którego w zakwaszonym środowisku endosomu zachodzą zmiany konformacyjne HA, prowadzące do fuzji błony endosomu oraz wirusa i uwolnienia materiału genetycznego do cytoplazmy [Ryc. 3]. Co ważne, hemaglutynina syntetyzowana jest pierwotnie w formie nieaktywnego prekursora HA0. Dopiero w końcowym etapie dojrzewania wirionów potomnych druga transbłonowa proteaza serynowa typu 2 (ang. *type II transmembrane serine protease 2*, TMPRSS2) lub alternatywnie: TMPRSS4, HAT (TMPRSS11D), MSPL, DESC-1, TMPRSS11A, TMPRSS13 czy też, w innych przypadkach, furyna, rozcina HA0 i przekształca w dwie podjednostki HA1 i HA2. Fragment HA2 zawiera peptyd fuzyjny (FP, ang. *fusion peptide*) pełniący kluczową rolę w mechanizmie łączenia otoczki wirusa z błoną endosomalną komórki gospodarza. Ulega on relokacji do wnętrza trimerycznej struktury hemaglutyniny. Stabilizuje to jej konformację w neutralnym pH, jednocześnie czyniąc metastabilnym i wrażliwym na zmiany konformacyjne pod wpływem zakwaszenia środowiska zachodzącego wewnątrz endosomu. W wyniku przejścia konformacyjnego dochodzi do zmiany struktury krótkich helis α podjednostki HA2, co prowadzi do ich wydłużenia oraz utworzenia długiej trójłańcuchowej helisy (ang. *coiled coil*). Peptyd fuzyjny zostaje wyrzucony w kierunku błony docelowej i zakotwicza się w błonie endosomalnej [Ryc. 3].

Kolejne zmiany konformacyjne powodują zmianę struktury helisy HA2 do struktury pętlowej, co skutkuje zwinięciem kompleksu fuzyjnego. Prowadzi to do zbliżenia błony wirusa i błony endosomalnej, co inicjuje proces fuzji. Początkowym etapem fuzji jest tzw. stan hemifuzji, w którym zewnętrzne warstwy lipidowe (ang. *leaflets*) obu błon zostają połączone, ale wewnętrzne pozostają nienaruszone. Następnie tworzy się por fuzyjny, przez który uwalniany jest genom wirusowy do cytoplazmy komórki gospodarza. Kompleks (-) ssRNA, białka NP (tworzy kompleks rybonukleinoproteinowy vRNP, łączy go z białkiem M1) oraz RdRp (wirusowa polimeraza zależna od RNA) są następnie transportowane do jądra komórkowego. Białka NP, PB1 i PB2 zawierają sygnał lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *nuclear localization signals*), który kieruje kompleksy vRNPs do jądra. Dodatkowo w cytoplazmie kompleksy vRNPs wiążą się z mikrotubulami, co ułatwia ich transport. Importyna α/β (karyoferyna) rozpoznaje sekwencję NLS na NP oraz PB2 i umożliwia transport przez pory jądrowe. Kompleks poru jądrowego (NPC, ang. *nuclear pore complex*) umożliwia następnie przejście kompleksów vRNP do wnętrza jądra w sposób zależny

od gradientu RanGTP [47, 48, 49, 50, 51, 52]. Gradient powstaje na skutek wiązania się białka RAN z GTP powodując powstanie wysokiego stężenia RanGTP. Następnie kompleks jest hydrolizowany przez GTPazę do RanGDP, co powoduje obniżenie stężenia RanGTP w części komórki. Transport odbywa się dzięki różnicy stężeń zachodzącej pomiędzy jądrem a cytoplazmą [54, 55].



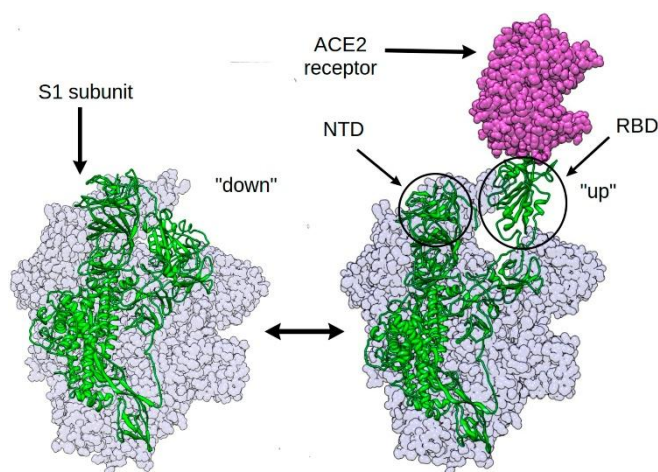
Rycina 3. Schemat fuzji membrany wirusa grypy typu A z błoną komórkową. A) Człeczki hemaglutyniny w konformacji w neutralnym pH podczas kontaktu z docelową błoną. B) Peptyd fuzyjny zakotwicza się w błonie poprzez zmiany pH wewnątrz endosomu. C) Przybliżenie błon następuje wskutek przemieszczenia fragmentu C-końcowego podjednostki HA2. D) Błony znajdują się w stanie przedfuzyjnym pośrednim. E) W stadium hemifuzji lipidy pochodzące od dwóch błon mieszają się, bez wymieszania zawartości pęcherzyków. F) Następuje wymieszanie zawartości i transfer genomu wirusowego do wnętrza komórki poprzez nowopowstałe pory fuzyjne [148].

Proces adsorpcji i wnikania wirusa SARS-CoV-2 rozpoczyna się od oddziaływania białka kolca (S, ang. *spike*) (szczegółowy opis znajduje się w kolejnym rozdziale) z receptorem ACE2 na powierzchni komórki. Dokładniej za proces wiązania odpowiada podjednostka S1 białka kolca, zawierająca domenę RBD (ang. *receptor binding domain*). Z kolei podjednostka S2 białka kolca odpowiada w późniejszym etapie za fuzję błony wirusowej i komórkowej. Podjednostka S2 białka kolca SARS-CoV-2 oraz podjednostka HA2 hemaglutyniny wirusa grypy typu A (IAV) wykazują znaczące analogie strukturalne i funkcjonalne, mimo ewolucyjnie odległego pokrewieństwa tych patogenów. Obie podjednostki pełnią kluczową rolę w procesie fuzji błon wirusowych z błonami komórkowymi gospodarza, co stanowi niezbędny etap w cyklu replikacyjnym obu wirusów. Podjednostki S2, jak i HA2 zawierają charakterystyczny motyw helisy superskręconej (ang. *coiled-coil*), który jest wysoce konserwatywny wśród wirusów dróg oddechowych [56].

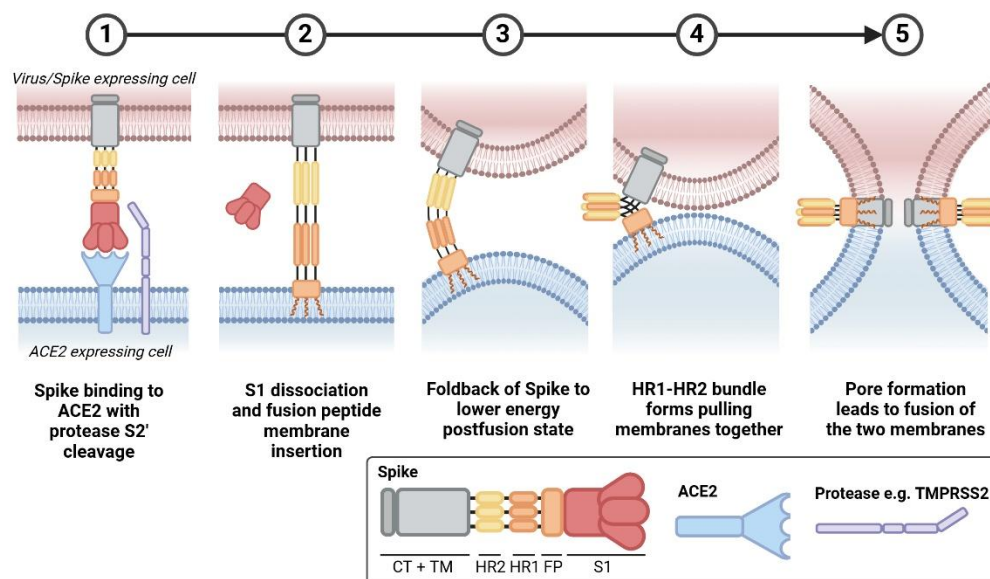
Poza receptorem ACE2 występują jeszcze inne czynniki komórkowe wpływające na proces infekcji. Jest to Neuropilina-1 (NRP1, ang. *neuropilin 1*), która wiąże się z miejscem cięcia furyny i wzmacnia interakcje wirusa z komórką [169], lektyna typu C swoista dla komórek dendrytycznych DC-SIGN i lektyna typu C wątrobowo-limfatyczna L-SIGN, które uczestniczą w procesach adhezji komórkowej poprzez interakcje z cząsteczką adhezji międzykomórkowej 3, ICAM-3 (ang. *intercellular adhesion molecule 3*) oraz działają jako receptory rozpoznające wzorce molekularne patogenów [170]. Początkowo białko S znajduje się w stanie natywnym, w konformacji zamkniętej, w której domeny wiążące receptor (RBD) są częściowo niedostępne dla potencjalnych receptorów komórkowych (Ryc. 4). Mimo tej stabilnej konformacji podstawowej, białko wykazuje istotne fluktuacje konformacyjne, podczas których następuje przejściowe odsłonięcie RBD. Po otwarciu struktury i wystawieniu domeny RBD, SARS-CoV-2 wiąże się do N-końcowej helisy ACE2. W wiązanie to zaangażowane są kluczowe reszty aminokwasowe w RBD: Asn501, Lys417, Glu484, natomiast w ACE2 są to: Asp30, Lys31, Tyr4 tworzące sieć oddziaływań hydrofilowych [143].

Dla fuzji błony komórkowej i błony SARS-CoV-2 kluczowa jest również proteolityczna aktywacja białka kolca, która pozwala na odsłonięcie peptydu fuzyjnego w podjednostce S2, który pełni podobną rolę jak w przypadku IAV. Należy zaznaczyć, że proteolityczna aktywacja białka kolca jest przeprowadzana przez furynę, która dokonuje cięcia w miejscu S1/S2 podczas biosyntezy i dojrzewania wirusa w komórkach produkujących wiriony, czyli przed uwolnieniem wirusa z zakażonej komórki. Po cięciu

podjednostki S1 i S2 pozostają związane niekowalencyjnie. Białko kolca jest zdolne do dalszych zmian konformacyjnych i wiązania z receptorem ACE2 w kolejnej komórce. Po związaniu wirusa z receptorem ACE2 wymagana jest proteolityczna aktywacja białka kolca, która w efekcie odsłania peptyd fuzyjny w podjednostce S2. W takim przypadku znajdująca się na powierzchni komórki TMPRSS2 dokonuje cięcia w miejscu S2', co inicjuje proces fuzji błon. Jeżeli na powierzchni komórki nie występuje TMPRSS2, powstały kompleks wirusa z ACE2 może podlegać endocytozie. Wewnątrz endosomu panuje niskie pH, dzięki czemu następuje aktywacja proteolityczna poprzez cięcie podjednostki S2 tuż przed peptydem fuzyjnym w miejscu S2' zawierającym motyw rozpoznawalny przez proteazę cysteinową, katepsynę L. Cięcie w miejscu S2' uwalnia ograniczenia strukturalne, które pozwalają wyeksponować peptyd fuzyjny i inicjują kaskadę zmian konformacyjnych w podjednostce S2, czemu towarzyszy prawdopodobnie całkowite oddysocjowanie S1. Następnie dochodzi do zmian konformacyjnych w domenach HR1 (HR1, ang. *heptad repeat 1*) i HR2 (HR2, ang. *heptad repeat 2*). Powstaje długa, trójłańcuchowa struktura zwinięta w helisę (*three-stranded coiled coil*) oraz pofałdowany region powtarzalnego HR2. Prowadzi to do powstania struktury pofuzyjnej podjednostki S2, co zbliża do siebie obie błony. Dzięki tym procesom możliwe jest powstanie poru fuzyjnego i wniknięcie wirusowego RNA do cytoplazmy (Ryc. 5) [47, 48, 49, 50, 51, 52, 56].



Rycina 4. Przejście domeny RBD w białku kolca SARS-CoV-2. RBD łańcucha zaznaczonego na zielono przechodzi z konformacji „down” do „up”, co umożliwia wiązanie z ludzkim receptorem ACE2 [143].



Rycina 5. Schemat fuzji membrany wirusowej SARS-CoV-2 z błoną komórkową. 1) Białko S wiąże się do ACE2 i w miejscu S2' następuje cięcie proteolityczne przez TMPRSS2. 2) Domena S1 oddysocjowuje, a peptyd fuzyjny wnika w błonę komórkową gospodarza. 3) Białko S zmienia konformację do stanu postfuzji w wyniku złożenia. 4) Domeny HR1 i HR2 zbliżają do siebie błony. 5) W wyniku fuzji błon dochodzi do powstania pora, co pozwala na wnikięcie materiału genetycznego wirusa do wnętrza komórki [149].

Następnie RNA wirusowe jest transportowane do rybosomów związanych z siateczką śródplazmatyczną (ER) i jest wspomagane przez sekwencje sygnałowe obecne w powstających poliproteinach pp1a i pp1ab. Sekwencje sygnałowe są rozpoznawane przez cząstkę rozpoznającą sygnał SRP (ang. *signal recognition particle*). Kompleks rybosom-mRNA-SRP jest następnie kierowany do receptora SRP w błonie ER, co pozwala na kotranslacyjną insercję powstających białek do błony ER oraz dalszą translację w bliskim sąsiedztwie błon. Tam później formują się kompleksy replikacyjno-transkrypcyjne RTC (ang. *replication-transcription complexes*). Translacja w pobliżu błon ER umożliwia powstanie związanych z błonami organelli replikacyjnych, które chronią wirusowe RNA przed degradacją i ułatwiają jego replikację oraz transkrypcję subgenomowego RNA [47, 48, 49, 50, 51, 52, 56].

C. Replikacja materiału genetycznego wirusa jest kluczowym etapem jego cyklu replikacyjnego i różni się w zależności od rodzaju wirusowego genomu. Materiał genetyczny wirusów może stanowić RNA lub DNA. Może ono mieć postać jednonicową (ss) lub dwuniciową (ds), a także być dodatnio (+) lub ujemnie (-) spolaryzowane (tylko w przypadku RNA). Proces replikacji odbywa się w różnych przedziałach komórkowych, takich jak jądro lub cytoplazma, w zależności od charakterystyki wirusa.

Materiał genetyczny IAV ulega replikacji w jądrze komórkowym. Na podstawie wirusowego RNA dochodzi do syntezy mRNA (ang. *messenger RNA*) oraz cRNA (ang. *complementary RNA*) przy udziale wirusowej polimerazy RNA zależnej od RNA (RdRp). Wirusowe mRNA umożliwia następnie syntezę białek wirusowych w cytoplazmie. Natomiast cRNA stanowi matrycę do syntezy potomnego vRNA. Proces replikacji vRNA wymaga udziału białka NP. Polimeraza RdRp złożona jest z trzech białek: PB1 (ang. *polymerase basic 1*), PB2 (ang. *polymerase basic 2*) i PA (ang. *polymerase acidic*). Przed rozpoczęciem syntezy wirusowego mRNA, podjednostka PA, posiadająca właściwości endonukleazy, odcina czapeczkę guanozynową (kap) z mRNA komórkowego i powoduje jego hydrolizę. Następnie białko PB2 wychwytuje kap z 5' końca mRNA (ang. *cap snatching proces*). Z krótkich, losowych fragmentów mRNA oraz kapu powstają 10-15 nukleotydowe startery służące do rozpoczęcia syntezy wirusowego mRNA przez polimerazę wirusową. Ostatecznie podjednostka PB1 syntetyzuje nowe nici RNA (zarówno mRNA, jak i cRNA) poprzez polimeryzację nukleotydów. Zsyntetyzowane cząsteczki wirusowego mRNA posiadają ogon poli(A) na 3' końcu dzięki traktom 5-7 reszt urydynowych w vRNA, oraz kap na końcu 5'.

W jądrze komórkowym wirusowa polimeraza syntetyzuje również pełnej długości, komplementarny RNA (cRNA) o dodatniej polarności. W przeciwieństwie do mRNA, cRNA nie posiada czapeczki 5' ani ogona poli(A). cRNA jest stabilizowany przez białko NP, które zabezpiecza go przed degradacją i umożliwia dalszą syntezę vRNA. Na matrycy cRNA polimeraza RdRp syntetyzuje nowe kopie vRNA (-), które staną się genomem potomnych wirionów. Proces ten wymaga aktywnej obecności NP, które stopniowo wiąże się z nowo syntetyzowanym RNA, stabilizując jego strukturę. Nowe segmenty vRNA asocjują z białkami polimerazy PB1, PB2 i PA, tworząc kompletne kompleksy vRNP. Ostatecznie w jądrze komórkowym dochodzi do powstawania kompleksów RNP, które są kolejno eksportowane do cytoplazmy przy udziale białek wirusowych M1 i NEP (ang. *nuclear export protein, NEP*). Ponieważ NEP zawiera sygnał eksportu jądrowego (ang. *nuclear export signal, NES*), odgrywa kluczową rolę pośredniczącą pomiędzy M1

a eksportyną pierwszą CRM1 (ang. *chromosomal maintenance 1*), która wiąże się z kompleksem vRNP-M1-NEP. Następnie kompleks przemieszcza się przez pory jądrowe, wykorzystując gradient RanGTP. NEP działa jako pośrednik łączący białko macierzy M1 otaczające vRNP z mechanizmem eksportu jądrowego zależnym od CRM1. Dzięki temu NEP umożliwia efektywne usunięcie nowo zsyntetyzowanych genomów wirusa grypy z jądra komórkowego, co jest kluczowe dla składania nowych wirionów i ich uwalniania z komórki. W cytoplazmie następuje dysocjacja kompleksu i uwolnienie vRNP, co następnie umożliwia pakowanie vRNP do nowych wirionów. [54, 55].

SARS-CoV-2 jest wirusem o dodatniej polarności (+ssRNA), dlatego bezpośrednio w cytoplazmie komórki może dochodzić do transkrypcji materiału genetycznego i translacji wirusowych białek przez rybosomy komórkowe. To odróżnia go od IAV, który posiada segmentowany genom RNA o ujemnej polarności (-ssRNA) wymagający transkrypcji na mRNA w jądrze komórkowym. Po wnikięciu do wnętrza komórki w obszarze okołojądrowym formują się struktury błonowe o różnych rozmiarach określane jako organelle replikacyjne. Są one otoczone podwójnymi błonami i prawdopodobnie pochodzą z siateczki śródplazmatycznej. Pełnią funkcję przedziałów izolujących kompleksy replikacyjne wirusa od cząsteczek wrodzonej odpowiedzi immunologicznej gospodarza jak interferony i cytokiny. W pierwszym etapie replikacji materiału genetycznego dochodzi do translacji genu replikazy na matrycy wirusowego RNA (vRNA). Genomowy RNA posiada dwie duże ramki odczytu ORF1a i ORF1b, które kodują dwie poliproteiny pp1a i pp1ab. Powstawanie pp1ab wymaga mechanizmu -1 rybosomalnego przesunięcia ramki odczytu, co prowadzi do translacji dodatkowego fragmentu RNA obejmującego ORF1b. Poliproteiny te podlegają następnie obróbce proteolitycznej, przeprowadzanej przez dwie wirusowe proteazy cysteinowe nsp3 i nsp5. Część nsp3, PLpro odpowiada za rozszczepienie początkowych fragmentów poliproteiny oraz uwolnienie nsp1–nsp4 [57]. Natomiast proteaza Mpro, będąca częścią nsp5 dokonuje dalszej proteolizy, prowadząc do uwolnienia pozostałych białek nsp, w tym kluczowych enzymów replikacyjno-transkrypcyjnych, takich jak: nsp12 (RNA-zależna polimeraza RNA, RdRP), nsp13 (helikaza), nsp14 (egzonukleaza ExoN) czy nsp16 (2'-O-metylotransferaza). W efekcie powstaje 16 białek niestrukturalnych nsp1-16. Z pp1a powstaje 6 białek, natomiast z pp1ab powstaje 10. Ostatecznie, białka te stworzą kompleks replikacji i transkrypcji RTC (ang. *replicase-transcriptase complex*), dzięki któremu możliwa będzie replikacja, transkrypcja oraz modyfikacja wirusowego RNA. Kompleks RTC inicjuje replikację genomowego RNA, a RdRP katalizuje syntezę RNA. Białka wirusowe nsp7 i nsp8 działają natomiast jako kofaktory, współtworząc

aktywny kompleks polimerazy. Na matrycy vRNA polimeraza RdRP syntetyzuje nieć antysensową ssRNA(-), która służy jako matryca do dalszej replikacji genomu.

Na tej samej matrycy vRNA RdRP syntetyzuje również tzw. subgenomowe RNA (ang. *subgenomic RNA*, sgRNA) o ujemnej polarności (-sgRNA) w procesie nieciągłej syntezy (ang. *discontinued RNA synthesis*), będącej unikalnym mechanizmem charakterystycznym dla koronawirusów. Podczas nieciągłej transkrypcji dochodzi do zatrzymania syntezy negatywnej nici subgenomowego RNA (-sgRNA) na sekwencjach regulatorowych transkrypcji (ang. *transcription regulatory sequence body*, TRS-B) i ponownego jej rozpoczęcia w regionie liderowym (ang. *leader transcription regulatory sequence* TRS-L). W tym procesie kompleks RTC umożliwia przeskakiwanie polimerazy (ang. *template switching*), co skutkuje powstaniem zestawu ujemnych nici sgRNA. Te służą jako matryce do syntezy dodatnich nici subgenomowego RNA (+sgRNA), a następnie – jako mRNA subgenomowe (sgmRNA) – do translacji białek strukturalnych, takich jak białko kolca, białko błonowe M, białko otoczki E oraz nukleokapsyd N [58].

D. Translacja białek wirusowych jest kluczowym etapem cyklu replikacyjnego wirusa, ponieważ umożliwia syntezę zarówno białek strukturalnych, jak i niezbędnych enzymów i czynników regulatorowych. Wirusy nie posiadają własnych rybosomów ani maszynerii translacyjnej, dlatego muszą wykorzystywać mechanizmy translacyjne komórki gospodarza. Proces translacji wirusowego mRNA odbywa się na rybosomach komórkowych i różni się w zależności od typu wirusa oraz strategii ekspresji jego genomu.

Synteza białek IAV zachodzi w cytoplazmie. Do syntezy białka NP na rybosomach komórki gospodarza wykorzystywana jest matryca mRNA wirusa. Następnie białko jest transportowane z powrotem do jądra komórkowego, gdzie uczestniczy w pakowaniu nowego wirusowego RNA. Białko NP odgrywa kluczową rolę w stabilizacji genomu wirusa i formowaniu rybonukleoprotein (vRNP), niezbędnych do dalszej replikacji oraz składania nowych wirionów. Translacja białek wirusa grypy HA, M2 i NA zachodzi w retikulum endoplazmatycznym szorstkim. Hemaglutynina początkowo powstaje jako nieaktywna forma prekursora HA0. Następnie białka HA, M2 i NA są transportowane w kierunku części apikalnej błony komórkowej z wykorzystaniem kompleksu białek opłaszczających COPI (ang. *coat protein complex I*) [51, 52]

Glikoproteiny wirusa SARS-CoV-2 są syntezowane na rybosomach znajdujących się na powierzchni retikulum endoplazmatycznego szorstkiego. Powstałe w ten sposób białka strukturalne i niestrukturalne wirusa oraz zreplikowane RNA są transportowane do ERGIC

(ang. *endoplasmatic reticulum-Golgi intermediate*) będącego miejscem pośrednim pomiędzy retikulum a aparatem Golgiego. Białko S jest trimerem zakotwiczonym w błonie ER, a jego prawidłowe fałdowanie i glikozylacja są kluczowe dla późniejszej fuzji z błoną komórkową gospodarza. Białko M kieruje procesem składania wirionów, białko E jest zaangażowane w tworzenie otoczki wirusa oraz uwalnianie wirionów. Te białka również są syntetyzowane w ER i transportowane do przedziału pośredniego ER-Golgi. Natomiast białko N wiąże nowo zsyntetyzowane dodatnie nici genomowego RNA (+gRNA), tworząc nukleokapsyd, który następnie oddziałuje z białkiem M, inicjując składanie wirionów [51, 52].

E. Po syntezie białek wirusowych i replikacji materiału genetycznego, wirusy składają się w pełne wiriony. Wirusy bezosłonkowe spontanicznie tworzą kapsyd wokół nowego genomu. Natomiast wirusy osłonkowe wykorzystują błony komórkowe gospodarza do tworzenia błony wirusowej. Dojrzewanie wirusa często wiąże się z procesami cięcia proteolitycznego, które nadają wirionom pełną zakaźność (ang. *infectivity*), co oznacza zdolność wirusa do infekowania komórek gospodarza. Ostatnim etapem cyklu replikacyjnego wirusa jest wydostanie się nowo utworzonych wirionów z komórki poprzez pączkowanie (ang. *budding*), liżę komórki lub egzocytozę [51, 52].

Podczas ostatniego etapu cyklu replikacyjnego IAV kompleksy vRNP zawierające RdRp są transportowane z jądra komórkowego przez pory jądrowe do cytoplazmy w czym uczestniczą białka M1 i NEP/NS2. Dalej kompleksy vRNP są transportowane w pobliże błony komórkowej dzięki mikrotubulom cytoszkieletu komórkowego, gdzie następuje proces składania wirionów potomnych. Tam gromadzi się 8 kompleksów RNP, które dzięki białku M1 zostają upakowane. Proces pakowania segmentów do wirionów nie został do końca poznany, jest najprawdopodobniej losowy i zależy od sygnałów pakowania obecnych w sekwencji vRNA na końcach 5' i 3'. Podczas pakowania istotną rolę odgrywają wzajemne interakcje pomiędzy segmentami, a jeżeli w sekwencji sygnału pakowania któregoś z segmentów pojawi się mutacja, może to prowadzić do upośledzenia całego procesu. Przypuszczalnie nukleotydy pochodzące z końców 5' i 3' vRNA mogą tworzyć specyficzne struktury drugorzędowe umożliwiające tworzenie par zasad między segmentami [59, 60]. Nowo zsyntetyzowane białka wirusowe gromadzą się w apikalnej części błony komórkowej, gdzie powstaje strefa pączkowania i wypuklenie. Białko M2 bierze udział w formowaniu się pęcherzyka i jego oderwaniu od błony komórkowej. Pełni funkcję kanału jonowego, który umożliwia przepływ protonów do wnętrza wirionu z kwaśnego środowiska endosomu.

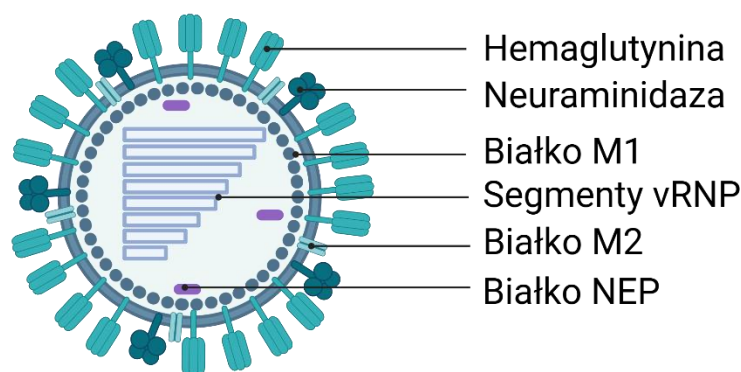
Powoduje to oddysocjowanie kompleksów RNP od pozostałych składników wirionu, co przekłada się na odpłaszczenie materiału genetycznego. Białko NA usuwa również reszty kwasu sialowego z błony komórkowej, co dodatkowo zapobiega agregacji uwolnionych wirusów. Dodatkowo pod wpływem enzymów proteolitycznych obecnych na powierzchni komórki gospodarza jak TMPRSS2, dochodzi do rozszczepienia wiązania peptydowego formy prekursorowej hemaglutyniny, co prowadzi do powstania dwóch podjednostek: HA1 i HA2 i w konsekwencji umożliwia infekowanie kolejnych komórek. Po uwolnieniu nowych wirionów z komórki cykl namnażania IAV może rozpocząć się ponownie [61, 62, 63].

W ostatnim etapie cyklu replikacyjnego SARS-CoV-2 nowe wiriony są pakowane w ERGIC, gdzie następuje organizacja składników wirionu oraz formowanie kompletnej cząsteczki. Białka kolca S, otoczki E, białko błonowe M oraz nukleokapsydu N tworzą dojrzały wirion. Białko N, które jest związane z vRNA, zostaje upakowane do wnętrza wirionu, natomiast białka S, E, M pozostają wbudowane w błonę ER, która stanie się błoną wirusową. Białka E i M biorą udział w składaniu wirionu i uwalnianiu poprzez interakcje z innymi białkami. Kompletne wiriony przechodzą do światła ERGIC w procesie pączkowania, skąd następnie są transportowane do błony plazmatycznej szlakiem sekrecyjnym. Poprzez fuzję pęcherzyków z błoną komórkową, nowe wiriony zostają uwolnione z komórki [51, 52, 57, 58].

4.4 Budowa wirionu wirusa grypy typu A

Wirion wirusa grypy typu A jest otoczony dwuwarstwą lipidową, w której zakotwiczone są białka hemaglutyniny (HA) i neuraminidazy (NA) [Ryc. 6]. Występują one na powierzchni błony w stosunku 4:1. Hemaglutynina jest odpowiedzialna za wiązanie wirusa z receptorem kwasu sialowego na powierzchni komórki gospodarza. Umożliwia adsorpcję wirusa, jego endocytozę oraz bierze udział w fuzji błony wirusowej z błoną endosomalną. Neuraminidaza jest enzymem o aktywności sialidazy, tzn. hydrolizującym reszty kwasu sialowego na powierzchni komórki gospodarza oraz nowych wirionów. Umożliwia również uwalnianie wirionów potomnych. Zbudowana jest z około 450-470 aminokwasów w zależności od podtypu. W osłonce występuje również białko M2 pełniące funkcję kanału jonowego zbudowanego z 97 aminokwasów. Umożliwia ono zakwaszenie wnętrza wirionu, inicjację oddzielenia białka M1 od nukleokapsydu oraz uwolnienie genomu wirusowego do cytoplazmy. Integralną częścią osłonki wirionu są również białka pochodzące z błony komórki gospodarza, w której wirus ulegał replikacji. Należą do nich np. aneksyny, enzymy glikolityczne i białka cytoszkieletu [64].

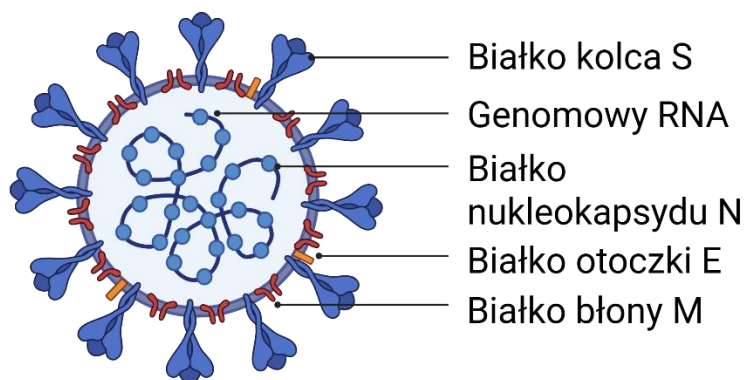
Wirusy grypy wykazują pleomorfizm, tzn. mogą występować w formie sferycznej o średnicy około 100nm, lub formie wydłużonej, filamentarnej długości ponad 300nm. Forma sferyczna wirionu występuje głównie w szczepach laboratoryjnych, natomiast formy filamentarne spotykane są w izolatach pochodzenia klinicznego. Zróżnicowanie kształtu wirionów wynika z budowy osłonki lipidowej, która jest elastyczna i podatna na zmiany [51, 52]. Pod osłonką lipidową znajduje się warstwa białek macierzy M1, każde zbudowane jest z 252 aminokwasów. Białko M1 jest głównym składnikiem wewnętrznej warstwy otoczki wirusowej. Bierze również udział w stabilizacji struktury wirionu oraz jest aktywne podczas pączkowania. Białko macierzy M1 uczestniczy również w transporcie materiału genetycznego wirusa do jądra komórkowego gospodarza. Rdzeń wirusa stanowi 8 kompleksów rybonukleoproteiny (vRNP), które zawierają poszczególne segmenty wirusowego RNA, białka polimerazy PB1, PB2, białko PA oraz nukleoproteinę NP. Poszczególne segmenty wirusowe zostały nazwane i ponumerowane od najdłuższego do najkrótszego vRNA. Wewnątrz wirionu vRNP są upakowane w charakterystyczny sposób „7+1” co oznacza, że siedem vRNA otacza jeden centralnie położony segment. Między segmentami występują oddziaływania umożliwiające im wspólny transport oraz pakowanie do wnętrza wirionu [51, 52]. Segment 1 koduje białko PB2 polimerazy wirusowej, odpowiada za hamowanie odpowiedzi immunologicznej. Segment 2 koduje białko PB1 tworzące kompleks rybonukleoproteinowy i jest podjednostką polimerazy wirusowej. Koduje również PB1-F2 oraz PB1-N40 powstające na drodze zmiany ramki odczytu. Segment 3 posiada informacje na temat białka PA, które jest składnikiem kompleksu rybonukleoproteinowego i wchodzi w skład polimerazy wirusowej. Alternatywnie koduje również PA-X, PA-N155 i PA-N182. Segment 4 koduje hemaglutyninę będącą białkiem powierzchniowym cząstki wirusa. Segment 5 koduje nukleoproteinę NP, która tworzy kompleks RNP. Nukleoproteina wiąże wirusowe RNA i stabilizuje jego strukturę, umożliwiając formowanie kompleksów vRNP. Segment 6 koduje informację na temat budowy glikoproteiny neuroaminidazy. Segment 7 koduje białko M1, czyli białko macierzy, przezbłonowe białko M2 tworzące kanał jonowy oraz alternatywnie M42. Segment 8 koduje białka NS1, NEP (NS2) oraz NS3.. Rozmiary cząsteczek vRNP różnią się długością (od 30nm do 120 nm), a ich średnica wynosi 12nm [65].



Rycina 6. Wirion wirusa grypy typu A

4.5 Budowa wirionu SARS-CoV-2

Wirion SARS-CoV-2 cechuje się kulistą budową i wykazuje umiarkowaną pleomorfie. Częsteczkę wirusa budują białka strukturalne: białka błony (ang. *membrane*, M), białka otoczki (ang. *envelope*, E), białka kolca (ang. *spike*, S; zakotwiczone bezpośrednio w błonie) oraz białko nukleokapsydu (ang. *nucleocapsid*, N), z którym bezpośrednio związany jest wirusowy RNA [Ryc. 7]. Na podstawie badań Cryo-EM określono średni rozmiar cząsteczki wirionu wynoszący od 118 nm do 136 nm, wliczając białka kolca w formie trimerów wystające na 16 nm do 21 nm od powierzchni otoczki.



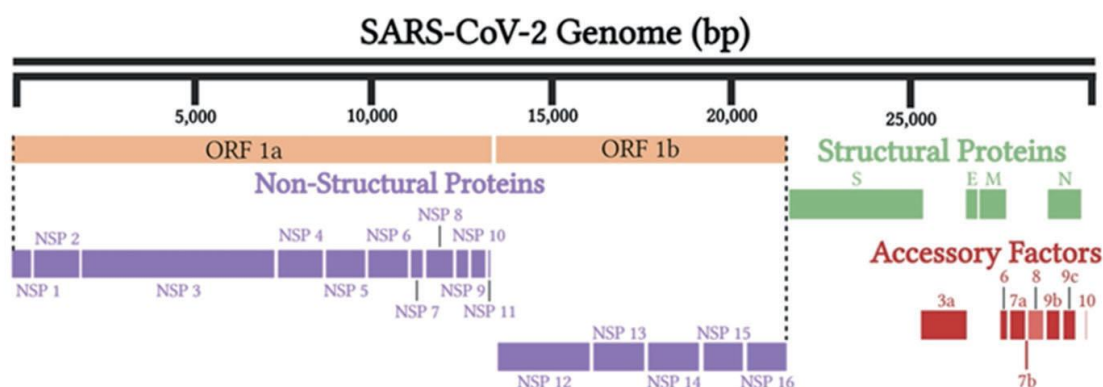
Rycina 7. Wirion SARS-CoV-2

Genomowy RNA SARS-CoV-2 [Ryc. 8] występuje w formie jednoniciowej o dodatniej polarności i wraz z białkiem N tworzy gęsto upakowany rdzeń, który można obserwować w obrazie mikroskopu elektronowego. Białko N o długości 419 aminokwasów wykazuje przede wszystkim funkcje ochronne wirusowego materiału genetycznego, wchodzi w interakcje z innymi białkami strukturalnymi podczas procesu składania wirionu i uczestniczy w cyklu replikacyjnym.

Białko otoczki (E) jest najmniejszym białkiem strukturalnym SARS-CoV-2 i zbudowane jest z 76-109 aminokwasów. Pomimo, iż samo białko jest słabo zbadane, sekwencja nukleotydowa oraz aminokwasowa tego białka jest zachowawcza ewolucyjnie w przypadku różnych wariantów genetycznych wirusa. Wchodzi ono w interakcje z innymi białkami strukturalnymi i razem z białkiem M determinują kształt wirionu, pozwalając wirusowi na uwolnienie materiału genetycznego do wnętrza komórki [66].

Białko błony (M) składa się z około 220-230 aminokwasów i jest białkiem przez błonowym, składającym się z trzech domen, które zakotwiczą je w otocze wirusowej. W zewnętrznej części wirionu znajduje się domena N-końcowa (NTD, ang. *N-terminal domain*), w części przez błonowej występuje domena składająca się z trzech helis (TM, ang. *transmembrane domain*), natomiast w wewnętrznej części wirionu ulokowana jest domena końca karboksylowego (CTD, ang. *C-terminal domain*). Białko M odgrywa kluczową rolę w procesie pączkowania wirusa, reguluje proces formowania się nowych wirionów, oddziałuje z innymi białkami strukturalnymi. Interakcje występujące pomiędzy białkami M umożliwiają tworzenie się struktury, która nadaje wirionom charakterystyczny kształt.

Genom SARS-CoV-2 zawiera około 30 tys. nukleotydów. Posiada czapeczkę (kap) oraz sekwencję liderową na końcu 5' oraz ogon poliA na końcu 3', dzięki czemu jest w stanie prowadzić translację bezpośrednio w cytoplazmie, po wnikięciu do wnętrza komórki. Analizując od końca 5' genom SARS-CoV-2 w dwóch trzecich długości koduje geny polimerazy RNA zależnej od RNA i zawiera otwarte ramki odczytu (ORF, ang. *open reading frame*) 1a oraz 1b. Z kolei jedna trzecia części od końca 3' koduje białka strukturalne N, S, M i E. Pomędzy genami kodującymi białka strukturalne znajdują się dodatkowe geny (ang. *accessory genes*) kodujące białka pomocnicze, które nie są niezbędne do podstawowego cyklu replikacyjnego wirusa, ale pełnią ważne funkcje wspierające jego przetrwanie, unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza i regulację infekcji (Ryc. 8) [51, 52, 57, 58].



Rycina 8. Genom SARS-CoV-2 [146].

4.6 Hemaglutynina (HA) wirusa grypy typu A

Hemaglutynina zbudowana jest z 560 aminokwasów i jest jednym z dwóch głównych białek występujących na powierzchni wirusa grypy typu A, natomiast w przypadku IBV składa się z około 584-585 aminokwasów. Hemaglutynina IBV strukturalnie jest podobna do HA IAV i wykazuje 25-30% homologii sekwencji. Podobnie jak u IAV jednostka prekursorowa IBV H0 jest cięta na dwie podjednostki HA1 i HA2, ale jednocześnie nie klasyfikuje się na oddzielne podtypy, a określa jedynie linie antygenowe. Natomiast ICV i IDV nie posiadają białka hemaglutyniny, posiadają natomiast białko hemaglutyniny-esterazy-fuzyjnej HEF o podobnej homologii, które łączy funkcje kilku białek, jak np. wiązanie do receptora komórkowego (rozpoznaje kwas 9-O-acetylo-neuraminowy zamiast kwasu sialowego), odcinanie receptora oraz uczestniczenie w fuzji błon.

Hemaglutynina odgrywa kluczową rolę w procesie zakażenia komórek gospodarza. Odpowiada za przyłączenie wirusa do komórki oraz za fuzję błon wirusa z błoną endosomu wewnątrz komórki. HA zbudowana jest z trzech identycznych podjednostek, które wspólnie tworzą trimer, formując wypustki na powierzchni wirionu. Poszczególne podjednostki hemaglutyniny są syntetyzowane jako prekursor polipeptydowy HA0 (75 kDa), następnie w efekcie cięcia powstają dwie części HA1(55kDa) oraz HA2 (25 kDa) połączone mostkiem dwusiarczkowym [76]. Podjednostka HA1 wystaje na zewnątrz wirusa formując tzw. globularną główkę na szczycie trimera, która zawiera miejsce wiązania się do receptora wirusowego RBS (ang. *receptor binding site*). Miejsce to jest odpowiedzialne za rozpoznawanie kwasu sialowego na powierzchni komórek gospodarza. Część HA2 jest zakotwiczona w otoczce wirusa i zawiera sekwencję FP, odpowiedzialnego za zlewianie się błon wirusa z błoną komórki gospodarza [77].

Struktura hemaglutyniny dzieli się na cztery domeny funkcjonalne. Na końcu dystalnym względem błony wirusa znajduje się domena RBS zlokalizowana w łańcuchu H1. Odpowiada za rozpoznanie i przyłączenie się do IAV specyficznych receptorów na powierzchni komórki gospodarza.. Domena ta posiada specyficzne miejsce wiązania receptora znajdujące się w zagłębieniu otoczonym czterema strukturami: pętle 130-loop, 150-loop, 220-loop oraz helisę 190-helix. Ich rolą jest precyzyjne ułożenie i stabilizacja zagłębienia, aby mogło ono selektywnie wiązać specyficzne receptory, głównie reszty kwasu sialowego. Natomiast dno zagłębienia stanowią cztery reszty aminokwasowe charakteryzujące się wysokim poziomem zachowawczości: Tyr98, His183, Tyr195 i Trp153. Te reszty aminokwasowe są kluczowe dla bezpośredniego rozpoznania i wiązania cząsteczki kwasu sialowego. Kolejno w łańcuchu HA1 znajduje się domena esterazowa (VES, ang. *vestigal esterase subdomain*), która jest nieaktywna i strukturalnie przypomina 9-O-acetylazę występującą w hemaglutynino-esterazie wirusa grypy typu C i D. Uważa się, że białko to jest ewolucyjnym prekursorem HA IAV. Dodatkowo domena ta łączy pozostałe domeny. Następnie, blisko błony wirusa znajduje się domena fuzyjna (FS, ang. *fusion subdomain*), która obejmuje fragmenty podjednostek HA1 oraz HA2. Na N-końcu HA1 znajduje się pięć antyrównoległych pasm β -harmonijki powstałych podczas biosyntezy, po odcięciu peptydu sygnałowego. Kolejno znajduje się pętla 30-loop oplatająca i stabilizująca helisy α znajdujące się w centrum domeny fuzyjnej. Domena fuzyjna znajduje się również na łańcuchu HA2, którego N-koniec jest hydrofobowy i znajduje się wewnątrz struktury trimery. Początkowe 23 aminokwasy HA2 budują peptyd fuzyjny odpowiadający za inicjację fuzji błon. FP jest połączony z jedną nicią β -harmonijki połączonej z krótszą helisą α . Razem tworzą strukturę przypominającą spinę do włosów, a struktury β i α połączone są połączone są 17-aminokwasową pętlą międzyhelikalną, kluczową dla mechanizmu fuzji błon. Domena zakotwicząca w błonie (MAS, ang. *membrane anchor subdomain*) znajduje się jedynie na podjednostce HA2. Głównym elementem tej domeny jest potrójna helisa α (ang. *coiled-coil*) (reszty 185–204), której końce rozchodzą się pod kątem około 60° względem siebie. Sześć ostatnich reszt oraz jedenaście końcowych aminokwasów HA2 znajdujących się po stronie cytoplazmatycznej nie zostało szczegółowo scharakteryzowanych [76,78].

Początkowo białko hemaglutyniny występuje w formie nieaktywnego prekursora HA0, który musi zostać poddany proteolitycznemu cięciu, aby uzyskać formę zdolną do zajęcia zmian konformacyjnych i inicjacji fuzji błon. Ponieważ wirus grypy typu A nie posiada własnych enzymów proteolitycznych, prekursor musi zostać przecięty

przez enzymy komórki gospodarza na wspomniane wcześniej podjednostki HA1 oraz HA2. Dopiero po zajściu tego procesu IAV jest w stanie infekować kolejne komórki. Cięcie po reszcie argininy lub w rzadszych przypadkach lizyny prowadzi do odsłonięcia na końcu N HA2 peptydu fuzyjnego złożonego z kilkunastu aminokwasów. W strukturze prekursora HA0 peptyd fuzyjny zostaje ukryty wewnątrz trimery i nie pełni swojej funkcji. Dopiero aktywacja HA przy niskim pH wewnątrz endosomu jest warunkiem uruchomienia mechanizmu fuzji błon. Po zajściu tego procesu hemaglutynina jest w stanie zmienić swoją konformację i zbliżyć do siebie błony wirusa i endosomu [76, 78]. Rodzaj specyficznej proteazy zdolnej do przecięcia wiązania peptydowego w prekursorze hemaglutyniny HA0 zależy od sekwencji aminokwasowej występującej w miejscu cięcia. Typowe sezonowe szczepy ludzkie wirusa grypy oraz AIV o niskiej zjadliwości, tj. LPAI, charakteryzują się miejscem cięcia w miejscu jednozasadowym zawierającym pojedynczą resztę zasadową, np. argininę. Wirusy te zawierają motyw sekwencyjny P3-P3' w miejscu cięcia Q/E-S/T-R↓G-L-F [43][Tabela 5]. HA tych wirusów może być cięta jedynie przez proteazy trypsynopodobne (ang. *trypsin like proteases*), występujące w określonych tkankach, np. nabłonku oddechowym. Badania wykazały, że to przezbłonowe proteazy serynowe typu II (TTSPs, ang. *Type II Transmembrane Serine Proteases*) są kluczowe dla większości podtypów IAVs, a jedna z nich, tj. TMPRSS2, jest kluczowym enzymem dokonującym aktywacji niemal wszystkich podtypów HA wirusa grypy typu A z jednozasadowym miejscem cięcia w przypadku ludzkich i mysich komórek nabłonkowych dróg oddechowych [74]. Jednocześnie inna proteaza należąca do TTSPs, tj. HAT (ang. *human airway trypsin-like protease*, inaczej T MPRSS11D), również jest zdolna do przecięcia wiązania w jednozasadowym miejscu sekwencji IAV HA [79]. W przypadku niektórych szczepów H3 wirusa grypy, HA może być proteolitycznie aktywowana przez inne proteazy komórkowe, takie jak TMPRSS4. Również inne proteazy serynowe należące do TTSPs, takie jak DESC1, TMPRSS11A i MSPL (znana również jako TMPRSS13), mogą ciąć proteolitycznie hemaglutyninę IAV. [69, 70].

Z kolei wysoce zjadliwe wirusy AIV z podtypów H5 lub H7 charakteryzują się występowaniem wielozasadowego miejsca cięcia hemaglutyniny. W tym przypadku cięcie proteolityczne odbywa się z udziałem furyny występującej w praktycznie wszystkich komórkach organizmu. Cięcie może odbywać się w miejscu R-X-R/K-R↓G-L-F lub R-X-X-R↓G-L-F, gdzie X oznacza aminokwas niezasadowy w miejscu cięcia proteolitycznego, a symbol ↓ wskazuje dokładne miejsce cięcia [Tabela 5]. Skutkuje to zdolnością do replikacji

w wielu narządach i powodowaniem choroby o ciężkim przebiegu. Dlatego też HPAI (np. szczepy H5N1) mogą wywołać pomór drobiu, ze śmiertelnością sięgającą 100% [80].

Wirus	Białko	Miejsce cięcia	Rozpoznawana sekwencja	'Aktywator'	Źródło
SARS-CoV-2	Spike	S1/S2	TNSPRRAR↓SV	Furyna	[138]
SARS-CoV-2	Spike	S2'	KPSKR↓SF	TMPRSS2	[139]
SARS-CoV-1	Spike	S1/S2	TNSRR↓SV	TMPRSS2, Katepsyny	[140]
MERS-CoV	Spike	S1/S2	RSVR↓SV	Furyna	[141]
IAV H1N1	HA0	HA1/2	IPSIQSR↓GL	TMPRSS2, HAT	[142]
IAV H3N2	HA0	HA1/2	KQTR↓GL	TMPRSS2, HAT	[142]
HPAI H5N1	HA0	HA1/2	PQREKRRRR↓GLF	Furyna	[142]

Tabela 5. Sekwencje aminokwasowe miejsc cięcia białek wirusowych przez proteazy komórkowe.

4.7 Białko kolca (S) SARS-CoV-2

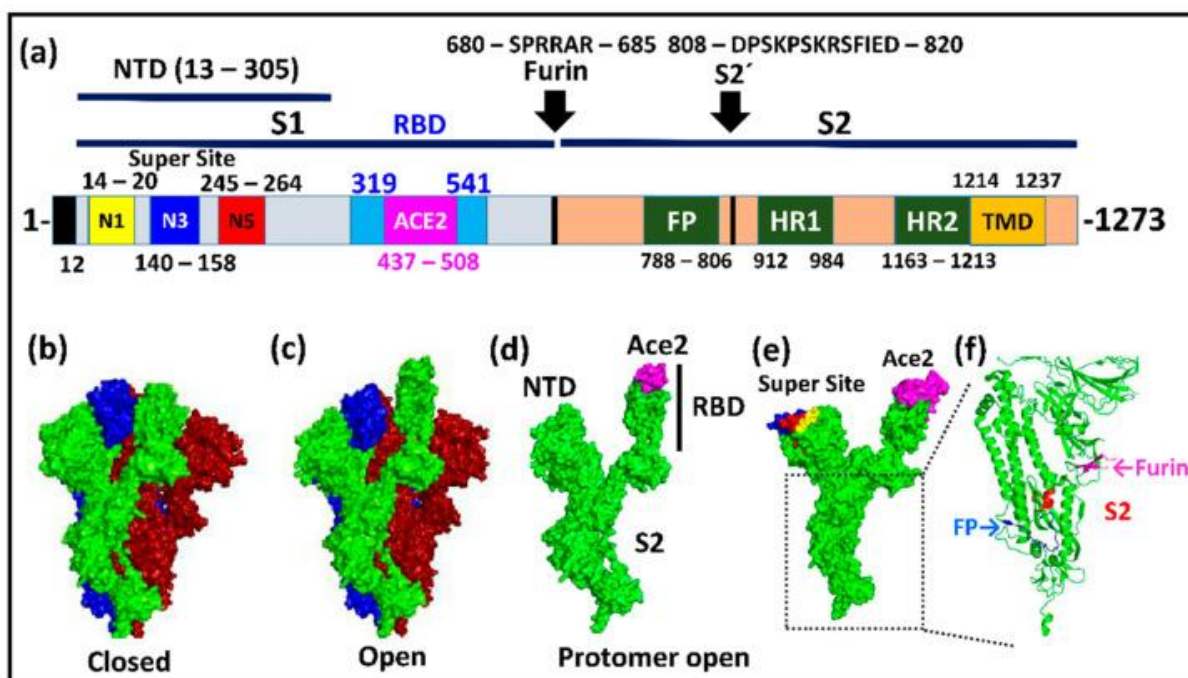
Białka kolca w postaci trimerów, wystające z błony wirusowej, nadają cząsteczce wirusowej charakterystycznego wyglądu korony. Białko S SARS-CoV-2, tak samo jako białka S SARS-CoV i HCoV-NL63, jest białkiem wiążącym z receptorem gospodarza i odpowiadającym za proces wnikania do wnętrza komórki. Odnotowano wysoki poziom podobieństwa strukturalnego oraz sekwencyjnego w porównaniu do białka kolca SARS-CoV-1 (mają bardzo podobną budowę domeny RBD) oraz prawie 76% podobieństwo na poziomie sekwencji aminokwasów. Ze względu na swoje właściwości, białko kolca stanowi główny cel w rozwoju szczepionek, przeciwciał monoklonalnych oraz przeciwciał neutralizujących. Białko kolca jest białkiem przezbłonowym typu I, które występuje w postaci homotrimeru, zbudowanym z 1273 aminokwasów. W jego strukturze można wyróżnić dwie podjednostki: S1 oraz S2 [Ryc. 9].

Podjednostka S1 znajduje się na odcinku N-końcowym, na zewnątrz komórki, tworząc wierzchołek trimeru przypominający głowę (ang. *head region*). Składa się z sekwencji sygnałowej, domeny N-końcowej (NTD, ang. *N terminal domain*) oraz domeny C-końcowej (CTD, ang. *C-terminal domain*) zawierającej domenę wiążącą receptor (RBD, ang. *receptor binding domain*).

Natomiast podjednostka S2 znajduje się bliżej karboksylowego końca -COOH, tworzy trzon białka łączący podjednostkę S1 z resztą wirusa. Zbudowana jest z peptydu fuzyjnego pośredniczącego w fuzji błony, następujących po nim dwóch sekwencji powtórzonych heptapeptydów 1 i 2 (HR1, ang. *heptad repeat 1*, i HR2, ang. *heptad repeat 2*) chroniących centralnie położoną helisę (CH, ang. *central helix*) oraz domenę łącznikową (CD, ang. *connector domain*). Domena CD stanowi część domeny przezbłonowej (TM, ang. *transmembrane domain*), która przechodzi przez błonę wirusa i ją tam zakotwicza. Wewnątrz wirionu występuje jeszcze odcinek uczestniczący w procesach wewnątrz wirionu, jest to krótka endodomena ogona (ang. *short viral endodomain tail*).

Białko kolca jest silnie glikolizowane, co pozwala na utrzymanie domeny RBD w konformacji przedfuzyjnej. Glikozylacja obejmuje przede wszystkim N-glikolizację w miejscach zawierających sekwencję konsensusową Asn-X-Ser/Thr, gdzie X to dowolny aminokwas (oprócz proliny). Zidentyfikowano 22 miejsca, w których dochodzi do N-glikozylacji w białku S, do najważniejszych zalicza się N331 i N343 w pobliżu domeny RBD. Natomiast O-glikozylacja zachodzi w regionie S1/S2, głównie w miejscach Thr678 i Ser686, które są istotne dla stabilizacji konformacji przedfuzyjnej. Struktury cukrowe przyłączane do tych miejsc to głównie kompleksowe N-glikany typu oligomannozowego (Man5-9GlcNAc2), glikany typu hybrydowego z rozgałęzionymi strukturami i sialowane glikany terminalne zawierające kwas sialowy. Heterogenność glikozylacji SARS-CoV-2 wpływa na stabilność konformacyjną białka S oraz jego zdolność do rozpoznawania receptora ACE2, co może przekładać się na zakaźność wirusa [67].

Białka S koronawirusów są przecinane w specyficznych miejscach sekwencji przez proteazy komórkowe gospodarza. Cięcie odbywa się w miejscu S1/S2, pomiędzy aminokwasami 685-686 i zachodzi jeszcze w komórkach produkujących nowe wiriony, oraz w miejscu S2', między aminokwasami 815-816 podczas infekcji po związaniu wirusa z receptorem ACE2, co następnie umożliwia fuzję membran oraz wnikięcie do wnętrza komórki. Miejsce cięcia S2' znajduje się pomiędzy końcem regionu helikalnego a FP w podjednostce S2.



Rycina 9. Organizacja domen białka kolca SARS-CoV-2 i jego cechy strukturalne. A) schematyczne przedstawienie domen białka S: NTD, podjednostki S1 i S2, RBD, miejsca cięcia przez furynę i miejsce S2'. B) i C) trójwymiarowe struktury białka S w konformacji zamkniętej (*closed*) i otwartej (*open*). D) Białko S w konformacji otwartej z zaznaczeniem lokalizacji domeny NTD, S2 i receptora ACE2. E) i F) lokalizacja ważnych funkcjonalnie regionów takich jak miejsce cięcia przez furynę i domena wiążąca receptor RBD [75].

W odróżnieniu od SARS-CoV-1, w przypadku SARS-CoV-2 dochodzi do cięcia proteolitycznego przez furynę, w miejscu poliaminokwasowej sekwencji S1/S2. Kluczowa różnica między wirusami polega na tym, że SARS-CoV-2 posiada unikalny motyw na granicy domen S1/S2, którego nie ma w SARS-CoV-1. Ta sekwencja poliaminokwasowa jest rozpoznawana przez furynę, co umożliwia preaktywację białka S jeszcze w komórkach, w których dochodzi do produkcji cząstek wirusowych.

SARS-CoV-1 nie posiada tego miejsca i wymaga aktywacji przez inne proteazy dopiero podczas infekcji, co stanowi istotną różnicę w mechanizmie wnikanía i patogenezie obu wirusów. Jest to specyficzny układ aminokwasów w białku, który zawiera kilka zasadowych reszt aminokwasowych (arginina, lizyna) i jest celem dla enzymu. Typowa sekwencja furynowa ma postać R-X-[R/K]-R↓ (gdzie "R" to arginina, "K" to lizyna, "X" to dowolny aminokwas, a "↓" oznacza miejsce cięcia przez furynę) [Tabela 5]. Sekwencje te zwykle znajdują się w białkach wirusowych i białkach gospodarza, a cięcie przez furynę aktywuje je, umożliwiając pełnienie funkcji biologicznych. W białku kolca SARS-CoV-2

miejsce cięcia przez furynę ma sekwencję PR₆₈₂RAR↓S₆₈₆V i zawiera dodatkową arginę (R), co sprawia, że furyna skuteczniej rozpoznaje i rozcina białko S. Furyna jest enzymem powiązanym z aparatem Golgiego, który dokonuje cięcia białka kolca w miejscu S1/S2 podczas dojrzewania wirusa i składania cząstek wirusowych lub transportu szlakiem sekrecyjnym, zanim wirion opuści zakażoną komórkę. Ułatwia również proces fuzji otoczki wirusa z błoną komórki gospodarza, ponieważ wcześniejsze rozcięcie białka kolca sprawia, że jest ono gotowe do aktywacji na powierzchni błony komórkowej, jednak nie jest wystarczające do inicjacji fuzji. Ostatecznie obecność dodatkowej argininy w miejscu S1/S2 sprawia, że SARS-CoV-2 jest bardziej zakaźny niż SARS-CoV-1. Podobne miejsca cięcia występują również u mniej patogennych hCoV-HKU1' i hCoV-OC-43 [56].

Cięcie w miejscu S2' białka S SARS-CoV-2 umożliwia odsłonięcie peptydu fuzyjnego w domenie S2 i jest niezbędne dla przebiegu fuzji otoczki wirusa z błoną komórki gospodarza podczas procesu wnikania. Cięcie proteolityczne może zajść w wyniku interakcji S1 z receptorem ACE2, gdy miejsce S2' zostaje odsłonięte. W miejscu S2' dochodzi do cięcia głównie z udziałem proteazy serynowej TMPRSS2 lub też w specyficznych przypadkach w endosomach z udziałem proteazy cysteinowej Katepsyny B lub Katepsyny L. Choć TMPRSS2 jest najlepiej scharakteryzowaną proteazą w kontekście infekcji koronawirusami, badania wykazały, że również inne proteazy z tej rodziny mogą uczestniczyć w proteolitycznej aktywacji białka S. Przezłonowe proteazy serynowe typu II, takie jak TMPRSS4, TMPRSS11A, HAT (ang. *human airway trypsin-like protease*), matryptaza (ang. *matriptase*), hepsyna (ang. *hepsin*) oraz MSPL (ang. *mosaic serine protease large form*, TMPRSS13), także odgrywają rolę w tym procesie. TMPRSS4, której ekspresja zachodzi w komórkach nabłonka jelitowego, ma zdolność aktywacji białka S SARS-CoV-2, co może tłumaczyć objawy żołądkowo-jelitowe u pacjentów z COVID-19 [68]. HAT, obecna w górnych drogach oddechowych, efektywnie tnie białko S MERS-CoV, co może świadczyć o jej udziale w infekcjach dróg oddechowych. TMPRSS11A oraz MSPL również wykazują zdolność do aktywacji białka kolca koronawirusów, co potwierdzono w badaniach *in vitro* [69, 70]. Matryptaza, której ekspresja zachodzi w płucach, jelitach i nerkach, może aktywować białko S SARS-CoV-2, co wskazuje jej potencjalną rolę w zakażeniach tych narządów. Hepsyna, obecna w wątrobie, nerkach i prostaty, może uczestniczyć w aktywacji białka S, choć z mniejszą wydajnością niż TMPRSS2. Różnorodność proteaz serynowych aktywujących białko kolca sugeruje, że wirusy mogą wykorzystywać alternatywne mechanizmy wnikania do komórek gospodarza w zależności od ich występowania w różnych tkankach [71, 72].

Białko kolca SARS-CoV-2 jest strukturą wysoce dynamiczną. W stanie przedfuzyjnym białko S jest metastabilne i jego ułożenie oscyluje pomiędzy dwoma konformacjami, w których domena RBD może występować w stanie otwartym lub zamkniętym. Domena RBD zbudowana jest z rdzeniowego podregionu o bogatej strukturze β -harmonijki oraz wysuniętej pętli białkowej określanej jako motyw wiążący receptor (RBM, ang. *receptor binding motif*). Aby doszło do związania się białka S z receptorem, musi ono przyjąć właściwą konformację. W konformacji zamkniętej trimeru wszystkie domeny RBD są opuszczone i niedostępne dla receptora. Konformacja otwarta umożliwia wiązanie z ACE2 poprzez odchylenie się do góry jednej lub dwóch domen RBD. RBM wchodzi w bezpośrednią interakcję z ACE2 poprzez dopasowanie się kształtem z domeną katalityczną ACE2. Analizy krystalograficzne i cryo-EM wykazały, że kompleks RBD SARS-CoV-2 z ACE2 stabilizowany jest wieloma oddziaływaniami. W wyniku tych badań zidentyfikowano też kilkanaście aminokwasów RBD istotnych dla wiązania (m.in. reszty w RBM, takie jak Gln493, Asn501 czy Lys417) oraz odpowiadające im miejsca wiążące na ACE2. Zmienność tych aminokwasów może powodować większe powinowactwo RBD do ACE2, co wpływa na większy poziom zakaźności szczepów. Przykładem takiej mutacji jest N501Y obecna w wariantach Alfa, Beta i Gamma SARS-CoV-2 [73]. Zmiana konformacji białka S SARS-CoV-2 jest wieloetapowym procesem molekularnym. Związanie się domeny RBD w konformacji otwartej nie wystarczy do wnikięcia wirusa. Białko S musi zostać proteolitycznie aktywowane poprzez proteazy gospodarza.

Aktywacja proteolityczna prowadzi do cięcia w miejscu S2' głównie przez proteazę TMPRSS2 na powierzchni komórki lub katepsyny w endosomach. Dzięki wcześniejszemu cięciu w miejscu S1/S2, podczas przyłączania wirusa do komórki możliwe jest ekspozycja peptydu fuzyjnego oraz jego insercję do błony komórkowej gospodarza. Cięcie w miejscu S1/S2 powoduje rozdzielenie podjednostek S1 i S2, które pozostają niekowalencyjnie związane. Cięcie w miejscu S2' jest krytyczne dla tego procesu i umożliwia proteolityczne odcięcie fragmentu S2 poprzedzającego peptyd fuzyjny. Następnie uwolniony peptyd fuzyjny jest zdolny do wnikięcia w błonę komórki gospodarza [74]. Trzy helisy HR1 prostują się i tworzą długi trójskrętny rdzeń, który wystaje na zewnątrz wirusa i jest połączony z błoną komórki przez peptyd fuzyjny na końcu. Następnie segmenty HR2 każdej podjednostki S2 przeorientowują się i zginają z powrotem w kierunku centrum. Prowadzi to do ułożenia się w rowkach pomiędzy helisami HR1 i utworzenia stabilnego sześciohelikalnego pęczka fuzyjnego.

Ta sekwencja zdarzeń prowadzi do dalszych zmian konformacyjnych podjednostki S2. Trimer tworzący podjednostkę S2 przechodzi z formy prefuzji do formy postfuzji, powodując zbliżenie się błony wirusa z błoną komórki. W wyniku tych zmian tworzy się por fuzyjny, przez który materiał genetyczny wirusa dostaje się do wnętrza komórki [75].

4.8 Białko TMPRSS2

TMPRSS2 jest enzymem proteolitycznym z rodziny przezbłonowych proteaz serynowych typu II. Zbudowany jest z 492 aminokwasów, część N-końcowa zakotwiczona jest w błonie komórkowej, natomiast domena o aktywności proteazy trypsynopodobnej znajduje się na zewnątrz komórki [81]. Poszczególne domeny o określonych funkcjach ułożone są linearnie od N- do C-końca białka. Domena cytoplazmatyczna znajduje się na odcinku N-końcowym znajdującym się wewnątrz komórki. Obejmuje on aminokwasy 1-82, tworząc krótki segment, niezawierający zdefiniowanych strukturalnie domen globularnych [82]. Kolejno w pozycji aminokwasowej 83-106 występuje hydrofobowa domena przezbłonowa kotwicząca białko w błonie komórkowej. Jest to pojedynczy odcinek typu helisy α i nie pełni on bezpośrednio roli w aktywności enzymatycznej. Jednocześnie determinuje lokalizację proteazy na powierzchni komórki. Po zewnętrznej stronie błony znajduje się łącznik zewnątrzkomórkowy, tzw. *stem*, do którego przylegają kolejne domeny. Region trzonowy *stem* tworzą dwie domeny: domena receptora LDL klasy A (LDLRA, 113-148) odpowiadająca za wiązanie jonów wapnia, znajdująca się w miejscu sekwencji, oraz domena SRCR (ang. *scavenger receptor cysteine-rich*) obejmująca aminokwasy w pozycji 149-242. Domena LDLRA jest bogata w cysteiny i reszty kwasowe. Motyw LDLRA w sekwencji TMPRSS2 jest zachowawczy i zawiera reszty wiążące Ca^{2+} oraz trzy mostki siarczkowe pełniąc rolę stabilizującą konformację domeny. Pomimo, że funkcja tej domeny nie jest w pełni poznana, wprowadzone mutacje w jej sekwencji sugerują, że odgrywa rolę w uzyskaniu pełnej aktywności enzymatycznej. Domena SRCR ma wielkość 94 aminokwasów i zawiera 6 zachowawczych cystein tworzących wewnętrzne mostki dwusiarczkowe stabilizujące jej strukturę. Prawdopodobnie domena ta działa jako moduł oddziaływań białko-białko, a badania wskazują, że może modulować aktywność proteolityczną. Eksperymentalne usunięcie tej domeny powoduje zmniejszenie efektywności cięcia substratów [83]. Postuluje się również, że domena SRCR może uczestniczyć w wiązaniu specyficznych ligandów lub substratów na powierzchni komórki, a także w rozpoznaniu i przytrzymywaniu cząsteczek blisko miejsca katalitycznego. SRCR potencjalnie wpływa na zdolność TMPRSS2 do aktywacji wirusów i zwiększa wydajność

cięcia proteolitycznego. Domena proteazowa z rodziny S1 występuje w pozycji aminokwasowej 255-492 znajdującej się w C-końcowej części zewnątrzkomórkowej. Zbudowana jest z 238 aminokwasów, a struktura trójwymiarowa jest homologiczna do pokrewnych proteaz oraz trypsyny. Związane jest to z występowaniem globularnego fałdu z dwoma antyrównoległymi β -baryłkami i kilkoma helisami oraz z kieszenią wiążącą substrat. Sekwencja TMPRSS2 zawiera konserwatywne motywy katalityczne w domenie proteazowej, które są charakterystyczne dla białek z rodziny proteaz serynowych. Istotną rolę w tym motywie odgrywa centrum aktywne tworzone przez triadę katalityczną His296, Asp345 i Ser441. Odpowiada to za aktywność enzymatyczną białka, gdzie histydyna i asparginian powodują aktywację seryny, co następnie umożliwia atak nukleofilowy na wiązanie peptydowe substratu. TMPRSS2 efektywnie przecina wiązania peptydowe występujące w białkach wirusowych, np. w miejscu S1/S2 białka kolca koronawirusa. Wynika to z preferencyjnego rozpoznawania sekwencji w których występuje tuż przed miejscem cięcia zasadowy aminokwas w pozycji P1, np. lizyna lub arginina.

TMPRSS2 występuje pierwotnie w formie nieaktywnego zymogenu, którego autoproteoliza zachodzi prawdopodobnie w aparacie Golgiego lub na powierzchni komórek. W procesie mogą brać udział inne proteazy pomocnicze oraz substraty występujące lokalnie w wysokim stężeniu. Cięcie autokatalityczne zachodzi na granicy między domeną SRCR a domeną proteazową w białku. Miejsce cięcia występuje w pozycji R255↓I256, po reszcie Arg255 [83]. W efekcie następuje odłączenie N-terminalnego peptydu proenzymatycznego i powstaje aktywna forma enzymu z N-końcem rozpoczynającym się od Ile256. Uwolniony N-koniec jest zdolny do wzięcia udziału w oddziaływaniach wewnątrz domeny, stabilizując centrum aktywne, analogicznie do trypsyny. W tej domenie występują również liczne mostki dwusiarczkowe. Domena katalityczna jest połączona mostkiem dwusiarczkowym z fragmentem proliny, dlatego po cięciu autokatalitycznym obie części pozostają połączone, a sama proteaza w aktywnej formie pozostaje związana z błoną komórkową. W specyficznych warunkach może dojść do uwolnienia fragmentu katalitycznego do środowiska zewnątrzkomórkowego i powstania formy wydzielonej proteazy [83]. Formy błonowa oraz wydzielona białka TMPRSS2 są enzymatycznie funkcjonalne.

Gen kodujący TMPRSS2 u ludzi umiejscowiony jest w 21 chromosomie, tworzy go 14 eksonów i 13 intronów. W regionie 5' UTR genu *TMPRSS2* znajduje się element odpowiedzi na androgeny (ang. *androgen response element*, ARE), dlatego postuluje się, że transkrypcja może być regulowana przez hormony androgenowe [84]. TMPRSS2 może występować w postaci dwóch izoform, które różnią się długością ogona

cytoplazmatycznego. Alternatywne składanie transkryptu *TMPRSS2* mRNA może prowadzić do powstania izoformy dłuższej o 37 aminokwasów. Izoforma 1 oraz izoforma 2 *TMPRSS2* są produkowane w komórkach, które stanowią cel dla wielu wirusów i odgrywają rolę w ich aktywacji. Zaobserwowano niewielkie różnice w lokalizacji komórkowej oraz mechanizmach aktywacji autokatalitycznej tych izoform, co może mieć wpływ na skuteczność zastosowanych inhibitorów proteaz w potencjalnej terapii [71]. Ekspresja proteazy *TMPRSS2* u ludzi występuje w różnych narządach i tkankach, głównie na powierzchni komórek nabłonkowych dróg oddechowych, komórek przewodu pokarmowego oraz gruczołu krokowego. Zaobserwowano również ekspresję w komórkach wątroby, nerek, trzustki, grasicy i gruczołów ślinowych.

Obecnie badania nad *TMPRSS2* skupiają się na jej roli w infekcjach wirusowych, jednakże pełni ona w organizmie pewne funkcje fizjologiczne, takie jak trawienie konkretnych białek gospodarza. Postuluje się, że *TMPRSS2* może regulować czynność nabłonkowego kanału sodowego ENaC (ang. *epithelial sodium channel*) w płucach poprzez cięcie proteolityczne podjednostek ENaC. Prowadzi to do zwiększenia przepływu jonów i utrzymuje prawidłowy poziom nawodnienia powierzchni dróg oddechowych. Proteaza może też oddziaływać z receptorem aktywowanym proteazą typu 2 (PAR-2), który jest zaangażowany w odpowiedź zapalną. Dzięki aktywności proteolitycznej *TMPRSS2* możliwa jest aktywacja glikoprotein wirusowych poprzez ich specyficzne cięcie, co warunkuje wejście wirusa do komórki. Wirusy wykorzystujące *TMPRSS2* do wnikania to m.in. wirusy grypy typu A, wirusy paragrypy, niektóre metapneumowirusy, a także koronawirusy, np. sezonowy HCoV-229E, MERS-CoV, SARS-CoV-1 oraz SARS-CoV-2. W przypadku koronawirusów *TMPRSS2* dokonuje aktywacji białka kolca. Proteaza dokonuje cięcia proteolitycznego w miejscu S2' białka kolca, co odsłania peptyd fuzyjny i umożliwia wnikanie do komórki. Białko *TMPRSS2* wykazuje również oddziaływania względem innego białka powierzchniowego komórki gospodarza białka ACE2. W tym przypadku ACE2 pełni rolę kofaktora lub stabilizatora *TMPRSS2*. Powoduje ono zwiększenie efektywności proteolizy białek fuzyjnych wirusa poprzez wytworzenie kompleksu z *TMPRSS2*. W obecności ACE2 *TMPRSS2* wydajnie tnie substrat, np. hemaglutyninę wirusa grypy. Natomiast knockdown ACE2 prowadził do osłabienia efektywności procesu proteolizy prowadzonej przez *TMPRSS2*. Interakcja pomiędzy dwoma białkami wymaga aktywnej formy *TMPRSS2* oraz domeny katalitycznej występującej na ACE2, co sugeruje, że wiążą się one w pobliżu miejsca aktywnej proteazy [86].

4.9 Strategie przeciwwirusowe nakierowane na RNA/DNA

W terapii przeciwwirusowej najczęściej stosowane są leki oparte na oddziaływaniu potencjalnych inhibitorów z białkami wirusowymi. Jest to możliwe głównie dzięki intensywnym badaniom krystalograficznym białek wirusowych, pozwalającym poznać ich strukturę trójwymiarową. Jednocześnie dalszy rozwój tej dziedziny był zapewniony przez rozwój technologii cryo-EM oraz modelowania 3D i przewidywania komputerowego [87]. Coraz popularniejszy sposób projektowania strategii przeciwwirusowych stanowi natomiast oddziaływanie na wirusowe bądź komórkowe RNA i DNA.

Zastosowanie różnorodnych strategii antysensowych może doprowadzić do skutecznego hamowania replikacji dowolnego wirusa, pod warunkiem posiadania wiedzy na temat jego sekwencji nukleotydowej. Istotne jest, aby uzyskany efekt hamujący nie wpływał negatywnie na pozostałe procesy zachodzące w komórce [88]. Wykorzystanie istniejących narzędzi molekularnych takich jak oligonukleotydy antysensowe (ASO), małe interferujące RNA (siRNAs), mikro RNA (miRNAs) czy katalityczne kwasy nukleinowe pozwala na skuteczne wyciszenie ekspresji genów, które prowadzi do znaczącego zmniejszenia namnażania się wirusa i ma działanie wirowstatyczne.

Oligonukleotydy antysensowe

Oligonukleotydy antysensowe są syntetycznymi cząsteczkami jednoniciowego DNA lub RNA, komplementarnymi do docelowego mRNA lub vRNA, których hybrydyzacja przebiega według kanonicznego parowania się wiązaniami Watson-Crick. Długość ASO zazwyczaj wynosi około 20 nukleotydów. Dzięki specyficznemu oddziaływaniu z docelową sekwencją możliwa jest inhibicja ekspresji genów. Występuje kilka odmiennych mechanizmów wyciszenia ekspresji, w zależności od składu chemicznego oligonukleotydu oraz miejsca hybrydyzacji [89]. W przypadku powstania duplexu ASO-mRNA, a dokładniej hybrydy DNA-RNA, dochodzi do aktywacji RNAzy H, która prowadzi do degradacji mRNA. Innym mechanizmem jest również zawada steryczna występująca po związaniu ASO z sekwencją docelową, która indukuje zatrzymanie translacji, zakłóca dojrzewanie mRNA poprzez hamowanie splicingu lub destabilizuje pre-mRNA w jądrze, powodując obniżenie ekspresji białka docelowego [91]. Ze względu na dynamiczną strukturę drugorzędową i trzeciorzędową RNA, a także możliwość potencjalnego występowania białek w miejscu wiązania, projektowanie skutecznych ASO jest skomplikowane [90]. Pierwszym lekiem ASO zatwierdzonym w terapii przez FDA

był fomivirsen (vitravene), używany w terapii osób z infekcją cytomegalowirusem (CMV). Jest on 21 nukleotydowym DNA, komplementarnym do sekwencji w regionie kodującym wczesne białko IE2 (ang. *immediate early 2 protein*) wirusa CMV, prowadząc do zablokowania jego translacji i w konsekwencji zapobiegającym namnażaniu się wirusa w organizmie [91]. Natomiast w leczeniu infekcji wirusem HIV wykorzystano aptamery, które w odpowiednich warunkach tworzą struktury przestrzenne G-kwadrupleksów. ISIS5320 oddziaływał na białko Gp120, które jest glikoproteiną znajdującą się na zewnętrznej powierzchni wirionu odpowiadającą za wnikanie wirusa HIV do komórki gospodarza. Powstały z aptameru G-kwadruplex powodował zahamowanie adsorpcji wirusa i fuzję z błoną komórkową [92]. ASO z powodzeniem są również wykorzystywane w inhibicji IAV poprzez celowanie w strukturę drugorzędową genomu IAV. Na podstawie zaproponowanej struktury drugorzędowej ósmego segmentu IAV zaprojektowano modyfikowane 2'-metylo ASO z LNA, które znacząco obniżyło miano IAV [134]. W innym badaniu, ASO nakierowane na segment piąty IAV spowodowały obniżenie się miana wirusa o 90% [135].

Małe interferujące cząsteczki RNA (siRNA)

Mechanizm działania siRNA polega na cięciu przez endonukleazę DICER długiej dwuniciowej cząsteczki RNA do postaci 20-25 nukleotydowych dupleksów RNA zwanych siRNA. Następnie jedna z nici, najczęściej antysensowa, zostaje wbudowana do wyciszającego kompleksu białkowego zwanego RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*). Włączona nić RNA doprowadza kompleks RISC do zlokalizowania komplementarnej sekwencji cząsteczki RNA, którą następnie przyłącza i przecina. Uszkodzona cząsteczka RNA zostaje następnie szybko zdegradowana przez komórkowe nukleazy, podczas gdy kompleks RISC może dalej funkcjonować, degradując kolejne komplementarne cząsteczki [93]. Mechanizm działania wykorzystywany przez małe interferujące cząsteczki RNA (siRNA) jest starym ewolucyjnie procesem, dzięki któremu rośliny i inne organizmy eukariotyczne chroniły się przed wirusami. Mechanizm ten należy do ogółu procesów postranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów i odgrywa bardzo ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórki i całego organizmu. Nieprawidłowy przebieg lub inhibicja tego procesu powoduje szereg niekorzystnych zmian w organizmie. Indukowany RNAi stanowi obronę przed wirusami, a także ochronę genomu przed transpozonomi oraz współuczestniczy w regulacji ontogenezy [94]. Proces indukowanej degradacji mRNA przez siRNA można wykorzystać również do inhibicji replikacji

wirusów, w tym np. wirusów grypy. Ze względu na swoją wysoką specyficzność oraz selektywność w wyciszaniu ekspresji genów, interferencja RNA jest szeroko badana w zwalczaniu infekcji wirusami grypy [95]. Udowodniono, że syntetyczne siRNA mogą specyficznym wyciszyć wirusowe mRNA, tym samym zatrzymując replikację na wielu płaszczyznach. Zespół Qing Ge [96] doprowadził do inhibicji replikacji wirusa grypy w testowanych liniach komórkowych oraz kurzych embrionach, wykorzystując specyficzne siRNA, które indukowały mechanizm interferencji RNA przez bezpośrednią degradację mRNA wirusa oraz niebezpośrednią inhibicję transkrypcji. Zaobserwowano kumulujący się efekt wyciszenia nie tylko dla mRNA białek NP oraz PA, ale także dla ich sekwencji w cRNA oraz vRNA [96]. Przeciwno SARS-CoV-2 opracowano również szereg specyficznych siRNA skierowanych przeciwko konserwatywnym regionom genomu SARS-CoV-2, obejmującym m.in. RdRp, helikazę oraz sekwencję 5'UTR. Najskuteczniejsze cząsteczki wykazywały ponad 90% redukcję replikacji wirusa w warunkach *in vitro*. Zastosowano również nowatorski system enkapsulacji siRNA w liposomowe nanocząstki, które powodowały obniżenie miana wirusa u zakażonych myszy transgenicznych K18-hACE2 [158].

MikroRNA

Inną strategią przeciwwirusową, wykorzystującą interferencję RNA są cząsteczki mikroRNA. Jest to grupa niekodujących cząsteczek RNA o długości 20-25 nukleotydów, które regulują ekspresję genów, sygnalizację wewnątrzkomórkową i środowisko komórkowe. Cząsteczki miRNA łączą się komplementarnie z 3'-UTR sekwencji mRNA, prowadząc do jej degradacji bądź hamując translację, a więc działają jak potranskrypcyjne regulatory ekspresji [97]. Zaobserwowano również występowanie niekanonicznych interakcji miRNA-mRNA, w których brały udział 5'-UTR lub sekwencje kodujące docelowych genów. Dane zgromadzone w bazie miRBase22 wskazują, że obecnie istnieje 2000 opisanych ludzkich miRNA. Przypuszcza się, że mogą regulować ponad 60% ludzkich genów kodujących białka. Różne cząsteczki miRNA mogą istotnie oddziaływać na sieć wzajemnych interakcji pomiędzy gospodarzem a patogenem i przede wszystkim są zaangażowane w odpowiedź przeciwwirusową. Mogą również bezpośrednio oddziaływać na cząsteczki wirusa. Sama infekcja stanowi ważny czynnik wpływający na zróżnicowaną ekspresję miRNA [95]. Wirusy mogą wykorzystywać mechanizmy RNAi dla replikacji własnego materiału genetycznego. Dodatkowo są w stanie kodować własne białka lub cząsteczki RNA, które mogą hamować istniejące szlaki RNAi bądź też prowokować wyciszenie specyficznych genów komórek gospodarza. Oprócz naturalnych mechanizmów

przeciwwirusowych wynikających z mechanizmów RNAi występujących w komórce, indukowana interferencja RNA stanowi atrakcyjne podejście terapeutyczne do walki z ludzkimi wirusami [98]. Zbadano znaczenie miRNA-485 w regulacji odpowiedzi immunologicznej i ograniczeniu replikacji wirusa grypy. Udowodniono, że inhibicja ekspresji miRNA-485 powodowała zmniejszenie się namnażania wirusa grypy podtypu H5N1 w komórkach ssaczych, poprzez brak efektu hamującego odpowiedzi immunologiczną. Dodatkowo cząsteczki miRNA-485 mogą przyłączać się do konserwatywnych rejonów w genie PB1 wirusa grypy i bezpośrednio hamować jego namnażanie [99].

Technologia CRISPR/Cas

Technologia CRISPR/Cas to technika edytowania genomu wykorzystująca system CRISPR (ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) oraz enzym Cas (ang. *CRISPR-associated protein*). Technika ta została pierwszy raz opisana w 2005 roku [100]. Mechanizm działania opiera się o naturalnie występujące mechanizmy odpornościowe obecne w bakteriach i skierowany jest przeciwko bakteriofagom i infekcjom plazmidowym. Dzięki istnieniu tej naturalnej cechy, stanowi potencjalnie wartościowy system do tworzenia terapii przeciwwirusowych.

W zależności od liczby komponentów i mechanizmu działania, system możemy podzielić na klasę 1 i klasę 2. Klasę 1 tworzy wiele podjednostek kompleksów białkowych, natomiast klasa 2 składa się z pojedynczych białek efektorowych i obejmuje nukleazę Cas. Jest ona związana z crRNA, który umożliwia rozszczepienie docelowego komplementarnego DNA lub RNA. Dzięki modyfikacjom sekwencji crRNA, możliwe jest specyficzne dostosowanie celu DNA/RNA i modulowanie systemem.

System CRISPR/Cas jest uniwersalny i jednocześnie wysoce specyficzny, może znaleźć szerokie zastosowanie we współczesnej nauce i medycynie. Stanowi również potencjalne narzędzie w walce z infekcjami wirusowymi. Dzięki wykorzystaniu właściwości nukleaz, możliwe jest celowanie w DNA/RNA nie tylko wirusa, ale również w genom gospodarza w celu pośredniej walki z infekcją [101]. Nukleaza Cas9 jest obecnie szczegółowo scharakteryzowana, jednakże nukleazy Cas13 i Cas12 również zyskują zainteresowanie naukowców ze względu na ich właściwości przeciwwirusowe. Cas9 i Cas 12 mogą oddziaływać z dsDNA czynników komórkowych gospodarza. Natomiast Cas13 może bezpośrednio celować w wirusy RNA.

System CRISPR/Cas13 został wykorzystany do inaktywacji wirusa dengi w ludzkich liniach komórkowych. Częsteczki crRNA nakierowane były na różne regiony genomowego RNA wirusa dengi, powodując delecje i insercje w regionach bliskich NS3, prowadząc do inhibicji wirusa. Sugeruje to, że NS3-crRNA może hamować replikację wirusa dengi bezpośrednio przez region NS3 i pośrednio przez zakłócanie innych mechanizmów replikacji [102]. System CRISPR/Cas9 wykorzystano w hamowaniu replikacji wirusa grypy typu A poprzez nakierowanie na czynniki komórkowe gospodarza zaangażowane w procesie wnikania wirusa do komórki. Wykorzystano całogenomowy test przesiewowy (ang. *genome wide CRISPR knockout GeCKO screen test*) do identyfikacji transportera kwasu sialowego CMP (SLC35A1) wykorzystywanego przez IAV. Badania potwierdziły, że wyciszenie ekspresji genu SLC35A1 spowodowało brak kwasu sialowego na powierzchni komórki, co uniemożliwiło infekcję IAV. Znaczące obniżenie miana wirusów zaobserwowano w przypadku wirusów grypy podtypu H5N1, H1N1 i H3N2 [103].

5. Cel pracy

Infekcje dróg oddechowych należą do jednych z najczęstszych powodów zachorowań i śmierci na świecie, wśród których prym wiodą wirusami grypy typu A oraz SARS-CoV-2. Dodatkowo niedawna pandemia COVID-19 oraz potencjalne przyszłe epidemie/pandemie wywołane nowo pojawiającymi się wirusami, unaocznily konieczność nieustannego poszukiwania nowych, skutecznych strategii przeciwwirusowych. Klasyczne leki przeciwwirusowe, nakierowane na białka wirusowe często tracą skuteczność ze względu na szybkie zmiany genetyczne zachodzące w genomie wirusów. Z tego powodu ważne jest poszukiwanie związków przeciwwirusowych nakierowanych na komórki gospodarza, niezbędnych do prawidłowego przebiegu cyklu replikacyjnego wirusa.

Celem pracy doktorskiej było opracowanie różnych strategii przeciwwirusowych opartych o hamowanie procesu wnikania wirusów do wnętrza komórki na przykładzie wirusa grypy typu A i SARS-CoV-2.

Podstawą niniejszej pracy doktorskiej są trzy oryginalne publikacje naukowe, z których każda przedstawia odmienną, nowatorską metodę hamowania wnikania wirusów do komórki gospodarza:

1. określenie właściwości przeciwwirusowych koniugatów molekularnych kannabidiolu (CBD) i niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) przeciwko nowo pojawiającym się koronawirusom o potencjale pandemicznym oraz wirusowi grypy typu A,
2. opracowanie metody hamowania wnikania SARS-CoV-2 do wnętrza komórki oraz replikacji IAV za pomocą ASO specyficznych dla mRNA TMPRSS2,
3. zbadanie aktywności przeciwwirusowych koniugatów erlotynibu z wybranymi ugrupowaniami organometalicznymi poprzez niebezpośrednią inhibicję aktywności proteolitycznej TMPRSS2.

6. Omówienie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

6.1 *Novel Molecular Consortia of Cannabidiol with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Emerging Coronaviruses' Entry*

Anna Pawełczyk*, **Rafał Nowak***, Monika Gazecka, Anna Jelińska, Lucjusz Zaprutko, Paweł Zmora.

„Pathogens” 2023, 12, 951.

* - autorzy równorzędni

Uzyskiwanie nowych substancji, potencjalnie aktywnych przeciwwirusowo poprzez tworzenie koniugatów leków przeciwwirusowych i przeciwzapalnych stanowi nowe, innowacyjne podejście w nowoczesnej chemii medycznej. Łączenie substancji o znanych właściwościach, zwłaszcza pochodzenia naturalnego o udowodnionym działaniu, jak kannabidiol (CBD), wzbudza szczególne zainteresowanie i może skutkować stworzeniem związków o zupełnie nowych właściwościach i zastosowaniu. Strategia ta może prowadzić do zwiększenia rozpuszczalności, biodostępności oraz stabilności chemicznej i metabolicznej. Takie podejście może również zmniejszyć toksyczność poszczególnych związków wchodzących w skład koniugatu molekularnego, a także ograniczać potencjalne skutki uboczne substancji wykorzystywanych osobno.

CBD jest składnikiem aktywnym *Cannabis sativa*, nieposiadającym właściwości psychoaktywnych, uzyskiwanym z konopi. W terapii COVID-19 udowodniono, że CBD wspomaga redukcję poziomu cytokin i regenerację uszkodzonych tkanek płuc. Ekstrakty zawierające CBD mogą również wpływać na regulację aktywności receptorów komórkowych właściwych dla SARS-CoV-2, np. ACE2. Z kolei niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), np. ibuprofen, ketoprofen i naproksen, znalazły zastosowanie w terapii wielu schorzeń i chorób wirusowych, łagodząc ich objawy. Działają przeciwbólowo, przeciwgorączkowo oraz przeciwzapalnie poprzez hamowanie enzymu cyklooksygenazy COX.

Celem badań było określenie właściwości przeciwwirusowych koniugatów molekularnych CBD i NLPZ przeciwko nowo pojawiającym się koronawirusom o potencjale pandemicznym.

Synteza oraz wstępna charakterystyka konsorcjów molekularnych CBD-NLPZ została przeprowadzona przez zespół dr hab Anny Pawełczyk z Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu.

Zsyntetyzowano trzy konsorcja CBD–NLPZ poprzez chemiczne połączenie cząsteczki CBD z wybranymi NLPZ (ibuprofenem, ketoprofenem i naproksenem) za pomocą wiązania estrowego. Reakcję przeprowadzono metodą estryfikacji Steglicha z użyciem dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) i DMAP jako katalizatora, uzyskując trzy hybrydowe związki: CBD–ibuprofen (CBD-I), CBD–ketoprofen (CBD-K) oraz CBD–naproksen (CBD-N)

Aktywność przeciwwirusowa została określona w warunkach *in vitro*, z wykorzystaniem następujących linii komórkowych: HEK293T, A549 i Vero-TMPRSS2. Szczepem wirusa grypy typu A wykorzystywanym w eksperymentach wirusowych był A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). Wpływ związków na replikację wirusa zbadano, wykorzystując RT-qPCR do określenia liczby kopii RNA IAV. W badaniach nad wnikaniem koronawirusów wykorzystano pseudotypy wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV) zawierające białka S SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2. Dzięki występowaniu w kodzie genetycznym VSV genu reporterowego lucyferazy było możliwe zaobserwowanie obniżenia poziomu luminescencji, który odpowiada poziomowi hamowania wnikania wirusa

Koniugaty molekularne CBD-NLPZ okazały się nietoksyczne dla komórek w badanym zakresie stężeń. Związki CBD-NLPZ wykazywały działanie przeciwwirusowe w stosunku do koronawirusów w większym stopniu niż CBD, natomiast nie zaobserwowano obniżenia poziomu replikacji IAV w komórkach oraz zmian w ekspresji białek wirusowych. W przypadku SARS-CoV-1 zaobserwowano, że CBD-naproksen powodował ponad 10-krotne obniżenie poziomu wnikania wirusa do komórek. Natomiast SARS-CoV-2 okazał się wrażliwy na CBD-ibuprofen i CBD-naproksen. Zaobserwowano ponad 10-krotne obniżenie wnikania wirusa do komórek przy najniższej zastosowanej dawce, co sugeruje wysoki potencjał przeciwwirusowy tego związku. W testach komórkowych CBD-ketoprofen nie wykazał znaczącego efektu obniżania aktywności lucyferazy w żadnym z zastosowanych stężeń. Dodatkowo, żaden z użytych koniugatów CBD-NLPZ nie hamował wnikania wirusa VSV-G, wykorzystywanego jako kontrola. Podsumowując, uzyskane wyniki pokazują, że CBD-ibuprofen i CBD-naproksen mogą potencjalnie stanowić nowe leki przeciwwirusowe. CBD-naproksen stosowany w niskich dawkach może ograniczyć potencjalne skutki uboczne.

Jednocześnie ze względu na opisane wcześniej inhibicję replikacji IAV przez naproksen, zbadane działanie przeciwwirusowe tego konsorcjum molekularnego. Badania wykazały, że CBD-naproksen nie spowodował obniżenia się liczby kopii wirusa,

a więc nie wykazały efektu inhibitorowego replikacji wirusa grypy. Wyniki te wskazują, że połączenie NLPZ z CBD może prowadzić do utraty ich aktywności.

Konieczne jest dalsze badanie otrzymanych związków z wykorzystaniem innych modeli *in vitro* oraz w modelach *in vivo*. Wyniki badań sugerują, że konsorcja molekularne CBD z NLPZ mogą w przyszłości skutecznie zwalczać infekcje SARS-CoV-2, a także łagodzić wywołane procesy zapalne.

6.2 *TMPRSS2-specific antisense oligonucleotides inhibit host cell entry of emerging viruses*

Rafał Nowak, Monika Gazecka, Marus Hoffmann, Ryszard Kierzek, Stefan Pöhlmann, Paweł Zmora.

„Virology”, 2024, 600, 110218.

Nowo pojawiające się wirusy, takie jak wirusy grypy typu A oraz drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-2), stanowią zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Obecnie dostępne są związki przeciwwirusowe skutecznie hamujące namnażanie się wirusa grypy typu A takie jak inhibitory neuraminidazy: oseltamivir, zanamivir i peramivir oraz inhibitor wirusowej polimerazy RNA baloksawir marboxylat. Również w przypadku SARS-CoV-2, Europejska Agencja ds. Leków dopuściła do użytku związki, będące analogami nukleozydów: remdesivir i molnupiravir, oraz inhibitor białka Mpro nirmatrelvir. Leki te hamują aktywność białek wirusowych, jednak ze względu na dużą zmienność genetyczną wirusów, mogą one szybko tracić skuteczność. Szacuje się, iż obecnie wszystkie szczepy IAV wykazują oporność na amantadynę/rymantadynę, związki hamujące aktywność białka M2 IAV, które zostały dopuszczone do użytku jako leki przeciwko grypie pod koniec XX wieku. Również w przypadku inhibitorów neuraminidazy obserwuje się wzrastający odsetek szczepów opornych IAV, co wymusza poszukiwanie nowych, skutecznych związków przeciwwirusowych.

Stosunkowo nowatorskim podejściem jest opracowywanie strategii przeciwwirusowych opartych na hamowaniu interakcji między wirusem i komórką gospodarza. Celem takich terapii mogą być specyficzne czynniki komórkowe – białka odpowiedzialne za procesowanie i właściwy rozwój wirusa, jednocześnie niebędące niezbędnymi dla komórkowego przeżycia. Ponieważ komórki gospodarza są mniej podatne na mutacje niż białka wirusowe, takie podejście terapeutyczne zmniejsza ryzyko wykształcenia się oporności. Takim czynnikiem komórkowym jest TMPRSS2, białko powierzchniowe komórek gospodarza odpowiedzialnych za aktywację proenzymów oraz regulację homeostazy. Proteaza ta odpowiada również za proces cięcia proteolitycznego białek powierzchniowych wirusów oddechowych, w tym hemaglutyniny (HA) wirusa grypy typu A i B oraz białka kolca koronawirusów przebiegniowych, SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 MERS-CoV. Ponieważ inhibitory TMPRSS2 takie jak kamostat, nafamostat i aprotynina posiadają szerokie spektrum oddziaływania i nie są specyficzne jedynie dla TMPRSS2,

skłania to do poszukiwań związków aktywnych o większym poziomie specyficzności, np. *TMPRSS2*-specyficzne oligonukleotydy antysensowe (ASO).

Celem badań było określenie struktury drugorzędowej sekwencji kodującej mRNA *TMPRSS2*, zaprojektowanie na podstawie struktury *TMPRSS2*-specyficznych ASO, oraz określenie ich zdolności do hamowania procesu wnikania wirusów do komórek SARS-CoV-2 oraz replikacji IAV.

Scharakteryzowano strukturę drugorzędową matrycowego RNA (mRNA) sekwencji kodującej *TMPRSS2* *in vitro* z wykorzystaniem metody chemicznego mapowania RNA (RNA SHAPE) i modyfikacji odczynnikami NMIA. Na podstawie zaproponowanej struktury zaprojektowano ASO nacelowane na jednoniciowe sekwencje mRNA *TMPRSS2*. W badaniach komórkowych użyto linii Calu-3, Caco-2 oraz Vero-*TMPRSS2*. Szczepem wirusa grypy typu A, którym posłużono się w eksperymentach wirusowych, był A/Puerto Rico/8/34 (H1N1). W badaniach nad wnikaniem koronawirusów wykorzystano pseudotypy wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV), które zawierają białka S SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2. Wszystkie ASO były 2'-O-metylowanymi RNA, niektóre z nich zawierały dodatkową modyfikację w postaci pojedynczych LNA (ang. *locked nucleic acid*). Liczbę kopii RNA IAV w supernatantach mierzono metodą qRT-PCR. Natomiast wnikanie pseudowirusa SARS-CoV-2 określano dzięki pomiarom aktywności lucyferazy w komórkach. Dodatkowo, z wykorzystaniem metody qRT-PCR mierzono poziom mRNA *TMPRSS2* w komórkach po zastosowaniu ASO, aby potwierdzić skuteczność wyciszenia genu.

Badania wykazały, że struktura drugorzędowa mRNA sekwencji kodującej *TMPRSS2* jest wysoce ustrukturyzowana *in vitro*, z licznymi motywami spinki do włosów oraz wewnętrznymi wybrzuszeniami. Na tej podstawie zaprojektowano dziewięć ASO: RN29, RN33, RN34, RN37, RN39, RN40, RN41, RN43, RN44RN45. *TMPRSS2*-specyficzne oligonukleotydy nie wywołały efektu cytotoksycznego wobec linii komórkowych Vero-*TMPRSS2*, Caco-2, Calu-3. Następnie przetestowano wpływ zaprojektowanych *TMPRSS2* specyficznych ASO na namnażanie się wirusa grypy typu A w komórkach Vero-*TMPRSS2*, Caco-2, Calu-3. Siedem ASO doprowadziło do zahamowania namnażania się wirusa grypy typu A w komórkach Vero-*TMPRSS2*. ASO RN29 spowodował ponad 10-krotne obniżenie ilości wirusa grypy typu A. W przypadku linii komórkowej Caco-2, pięć testowanych ASO spowodowało znaczące 5- do 10-krotne obniżenie się miana wirusa. Z kolei w badanej linii komórkowej Calu-3 wszystkie testowane ASO doprowadziły do istotnego statystycznie zmniejszenia się miana wirusa grypy typu A.

Zbadano również wpływ ASO na wnikanie pseudowirusa SARS-CoV-2 do komórek i wykazano, że 7 z 10 ASO spowodowało znaczące obniżenie poziomu wnikania do komórek VERO-TMPRSS2. W przypadku linii Caco-2 wszystkie testowane ASO spowodowały znaczące statycznie obniżenie poziomu wnikania pseudowirusa do komórek. Dodatkowo, żaden z oligonukleotydów nie hamował wnikania wirusa VSV-G wykorzystywanego jako kontrola, potwierdzając, że obserwowany efekt jest specyficzny dla mechanizmu wnikania SARS-CoV-2.

Ze względu na fakt, że ASO mogą prowadzić do degradacji RNA w procesie *no-go decay*, zbadano również poziom ekspresji TMPRSS2 po zastosowaniu specyficznych ASO. Zaobserwowano, że wszystkie przetestowane ASO powodujące obniżenie się miana wirusa, spowodowały również obniżenie się poziomu ekspresji TMPRSS2. Zaprojektowane ASO przyłączają się do miejsc jednoniciowych w strukturze drugorzędowej mRNA, przez co stanowią przeszkodę dla rybosomów, zatrzymując translację białka. Zatrzymanie rybosomu na nici mRNA stanowi sygnał do rozpoczęcia procesu degradacji tego mRNA w procesie *no-go decay*.

Wyniki badań dowodzą, że specyficzne ASO nakierowane na sekwencję mRNA TMPRSS2 mogą ograniczyć zakażenie wirusami układu oddechowego poprzez mechanizm blokowania wejścia do komórek gospodarza. Potwierdzono zasadność badania TMPRSS2 jako potencjalnego celu terapeutycznego, a zahamowanie ekspresji konkretnego genu gospodarza może mieć szerokie działanie przeciwwirusowe – jednocześnie przeciwko IAV oraz SARS-CoV-2.

6.3 Organometallic–Erlotinib Conjugates Active against Lung Cancer Cells and as Emerging Virus Entry Inhibitors

Przemysław Biegański*, Monika Gazecka*, **Rafał Nowak**, Aleksander Górski, Natalia Dutkiewicz, Danie Fabio Kawano, Paweł Zmora*, Konrad Kowalski*

„Organometallics” 2024, 43, 2505–2519

* - równorzędni współautorzy

Modyfikowanie istniejących leków np. związków przeciwnowotworowych, poprzez dodawanie reszt organometalicznych, stanowi innowację w projektowaniu leków. Także w kontekście tworzenia leków przeciwwirusowych jest to nowatorskie podejście. Tradycyjne strategie przeciwwirusowe koncentrują się na bezpośrednim oddziaływaniu na białka wirusowe. Jednakże ze względu na wysoką zmienność genetyczną wirusów, coraz większe zainteresowanie budzi podejście polegające na hamowaniu białek komórkowych odpowiedzialnych za replikację wirusa. Koronawirusy również wykorzystują szlaki sygnałowe i czynniki gospodarza w swoim cyklu replikacyjnym. Nowoczesne podejście w projektowaniu leków identyfikuje kluczowe białka komórkowe gospodarza, które pośredniczą w replikacji wirusa. Jednym z czynników, który zwraca uwagę badaczy, jest receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR). Jest to przezbłonowy receptor o aktywności tyrozynowej, który reguluje wiele procesów komórkowych, takich jak proliferacja, różnicowanie, migracja oraz odpowiedź na stres komórkowy. Dane pokazują, że EGFR może pośrednio wspierać wnikanie wirusa poprzez regulację dynamiki błony komórkowej, endocytozy lub ułatwianie sygnałów fuzji błonowej. Dodatkowo aktywacja szlaku EGFR może wspierać przeżycie zakażonych komórek, co sprzyja replikacji wirusa. Erlotinib jest drobnocząsteczkowym inhibitorem kinazy tyrozynowej EGFR zatwierdzonym w leczeniu niektórych nowotworów, takich jak niedrobnokomórkowy rak płuca. Erlotinib hamuje aktywację EGFR poprzez wiązanie się z miejscem wiązania ATP w domenie kinazowej, co prowadzi do zablokowania przekazywania sygnałów komórkowych. Erlotinib był również badany jako potencjalny lek przeciwko SARS-CoV-2. Wirtualne badania przesiewowe oraz symulacje dokowania molekularnego wskazywały na potencjalne właściwości inhibitorowe wirusowego białka 3CLpro. Jednakże w testach z wykorzystaniem modeli komórkowych erlotynib nie hamował replikacji wirusa, a jego ograniczoną skuteczność dowiedziono w połączeniu z suntinibem.

Celem badań była synteza szeregu koniugatów erlotynibu z wybranymi ugrupowaniami organometalicznymi, zbadanie ich aktywności przeciwnowotworowej

i właściwości przeciwwirusowych przeciwko IAV oraz SARS-CoV-2, oraz identyfikacja potencjalnego mechanizmu aktywności przeciwwirusowej.

Zespół prof. Konrada Kowalskiego z Katedry Chemii Organicznej Uniwersytetu Łódzkiego przeprowadził syntezę metaloorganicznych koniugatów erlotynibu, w tym koniugatów ferrocenyowych (związki 3, 4, i 8), rutenocenyowych (związki 5 i 6) oraz koniugatów opartych o wykorzystanie renu (związki 9 i 10) z wykorzystaniem reakcji *click chemistry*.

W badaniach komórkowych wykorzystano linie komórkowe HEK293T, MDCK, A549 Calu-3. Zbadano wpływ przeciwwirusowy wybranych związków na proces replikacji wirusa grypy typu A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), następnie ilość wirusa określono z wykorzystaniem testu immunofluorescencji FOCl. Zbadano również wpływ związków na hamowanie wnikania SARS-CoV-2 i SARS-CoV-1 do komórek z wykorzystaniem pseudotypów VSV zawierających białka S SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2 poprzez pomiar poziomu lucyferazy reporterowej w komórkach. Dodatkowo w celu zbadania mechanizmu blokowania, przeprowadzono analizę wpływu związków na proteolityczną aktywację białka S SARS-CoV-2 i hemaglutyniny wirusa grypy. Rezultaty eksperymentów komórkowych poddano analizie z wykorzystaniem techniki Westernblot.

Zsyntetyzowane związki zostały najpierw zbadane pod kątem właściwości cytotoksycznych. Następnie nietoksyczne związki metaloorganiczne 5, 9 i 10 zostały wykorzystane do przetestowania właściwości przeciwwirusowych przeciwko wirusowi grypy typu A, SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2. Jedynie koniugat rutenocenyowy 5 oraz erlotynib spowodowały statystycznie istotne, ponad 10-krotne obniżenie poziomu miana wirusa grypy typu A w testowanych liniach komórkowych. Pozostałe przetestowane związki 9 i 10, będące koniugatami renu, nie wykazały właściwości inhibitorowych IAV. Związek rutenocenyowy 5 i erlotynib spowodowały znaczące obniżenie poziomu wnikania koronawirusów SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2 do ludzkich komórek 293T z receptorami ACE2 i TMPRSS2. Wykazano również, że mechanizm działania polega na zahamowaniu proteolitycznej aktywacji białka kolca S. Związek 5 znacząco ograniczył cięcie białka S niezbędne dla wnikania wirusa do komórki, oddziałując z TMPRSS2 lub wpływając na oddziaływanie S z ACE2. W przypadku cięcia proteolitycznego hemaglutyniny przez TMPRSS2, nie zaobserwowano efektu inhibitorowego testowanych związków. Koniugat rutenocenyowy 5 może wpływać na hamowanie zdolności ACE-2 do wspomagania cięcia proteolitycznego białka kolca przez TMPRSS2. Prawdopodobną rolę w oddziaływaniu koniugatu 5 oraz receptora ACE-2 może być zaangażowany receptor EGFR.

Wyniki wskazują, że modyfikacje organometaliczne klasycznych leków przeciwnowotworowych mogą prowadzić do uzyskania nowych efektów terapeutycznych, w tym właściwości przeciwwirusowych. Rutenocenowy koniugat erlotynibu skutecznie hamuje wnikanie wirusów o potencjale pandemicznym, jak IAV i SARS-CoV-2, do komórki. Jest to również dowód, że dodanie komponentu organometalicznego może nadać znanemu lekowi zupełnie nowe właściwości przeciwwirusowe. Konieczne jest kontynuowanie badań w celu wyjaśnienia molekularnych podstaw zaobserwowanego efektu przeciwwirusowego oraz ocena terapeutyczna związków w modelach *in vivo*.

7. Dyskusja

Dotychczas opracowano wiele skutecznych związków przeciwwirusowych. Jednak ze względu na ciągłe zmiany w materiale genetycznym i ewolucję wirusów, a co za tym idzie pojawianie się nowych wariantów wirusów oraz potencjalne wykształcanie oporności przeciwko stosowanym lekom, proces ten musi być kontynuowany, aby zapewnić dostęp do bardziej skutecznych i uniwersalnych leków.

W ostatnich latach coraz większą uwagę poświęca się strategiom przeciwwirusowym ukierunkowanym na inhibicję aktywności i funkcji białek komórek gospodarza zaangażowanych w proces replikacji wirusów (ang. *host-targeting antivirals*, HTAs), a nie bezpośrednio na wirusa (ang. *virus-targeting antivirals*, VTAs). Strategie oparte o HTAs celują w białka komórki gospodarza, które pełnią krytyczną rolę w cyklu replikacyjnym wirusa, wpływają na regulację procesów immunologicznych lub innych szlaków komórkowych. Natomiast VTAs oddziałują bezpośrednio na cząsteczkę wirusa albo hamują funkcje biologiczne wirusowych białek. Do VTAs stosowanych w leczeniu grypy możemy zaliczyć np. oseltamiwir i zanamiwir. Blokują one miejsce aktywne neuraminidazy IAV, co uniemożliwia odcięcie reszt kwasu sialowego na powierzchni komórki i prowadzi do zablokowania uwalniania się nowopowstałych cząsteczek wirusa z komórki. Z kolei baloksawir marboksyl prowadzi do inhibicji wirusowej endonukleazy biorącej udział w mechanizmie *cap-snatching* podczas syntezy mRNA, uniemożliwiając replikację genomu IAV. Natomiast w terapii COVID-19 dopuszczonych do obrotu przez Europejską Agencję ds. Leków jest kilka leków, np. paxlovid, którego składnikiem jest nirmatrelwir, inhibitor wirusowej proteazy 3CL, hamujący potranslacyjne dojrzewanie białek wirusa. Inne substancje aktywne, takie jak remdesivir i molnupirawir powodują inhibicję wirusowej polimerazy RNA przez terminację łańcucha RNA w wyniku wprowadzania letalnych mutacji do sekwencji [104].

Wśród licznych strategii przeciwwirusowych opierających się o VTAs znajdują się m.in. terapie oparte na kwasach nukleinowych, takie jak oligonukleotydy antysensowne (ASO), małe interferujące RNA (siRNAs), mikro RNA (miRNAs), katalityczne kwasy nukleinowe czy technologia CRISPR/Cas. Dodatkowo do skutecznych strategii przeciwwirusowych zawierających VTAs należą również szczepionki, w tym szczepionki mRNA, których wynalezienie zrewolucjonizowało współczesną medycynę i pozwoliło zakończyć pandemię COVID-19. Szczepionki stanowią obecnie najlepszy sposób zapobiegania infekcjom wirusowym, a zastosowanie technologii mRNA do szybkiego

stworzenia szczepionki przeciwko SARS-CoV-2, uwidocznilo wysoki potencjal tej technologii.

Technologia ASO moze byc z powodzeniem zastosowana w projektowaniu wysoce specyficznych związków przeciwwirusowych. W tym kontekście nalezy przytoczyć liczne wyniki badań grupy prof. Elżbiety Kierzek. W swoich badaniach Pani Profesor z Zespołem stosowali strategię projektowania ASO specyficznych dla określonej struktury drugorzędowej RNA genomu IAV. W badaniach opublikowanych w 2016 roku grupa określiła strukturę drugorzędową ósmego segmentu IAV i na tej podstawie zaprojektowali modyfikowane 2'-metylo ASO z LNA (ang. *locked nucleic acid*). Pięć najskuteczniejszych ASO obniżyło miano IAV od 5 do 25 krotnie przy stężeniu 230 nM ASO [134]. W innym badaniu ASO specyficzne dla struktury drugorzędowej segmentu piątego IAV doprowadziły do obniżenia się miana wirusa o 90% [135]. Natomiast w badaniach opublikowanych w 2020 r. zaprojektowano siRNA specyficzne dla motywów strukturalnych RNA IAV. SiRNA znacząco zahamowały replikację IAV *in vitro*, a maksymalny efekt hamujący został osiągnięty przy stężeniu 8 nM. Najlepiej działające ASO hamowały replikację IAV o około 90%. Dodatkowo wybrane siRNA porównano z ASO celującymi w te same regiony, co pokazało, że skuteczność zależy zarówno od dostępności celu, jak i zastosowanej strategii przeciwwirusowej [136].

Pomimo bardzo obiecujących wyników doświadczeń z ASO specyficznymi dla wirusowego genomu, obecnie VTAs są nakierowane głównie na białka wirusowe, co powinno ograniczać ich potencjalną toksyczność względem organizmu. Wiele istniejących leków VTA charakteryzuje się niskim poziomem występowania efektów ubocznych, np. inhibitory neuraminidazy mogą powodować nudności, nowsze generacje leków przeciw HIV czy HCV również posiadają wysoki profil bezpieczeństwa. Aczkolwiek nawet leki nakierowane na białka wirusowe mogą powodować skutki uboczne, jak np. nukleozydowe inhibitory polimerazy jak remdesiwir i rybawiryna. Mogą one zaburzać działanie enzymów komórkowych takich jak IMP dehydrogenaza, polimerazy DNA i RNA, kinazy nukleozydowe oraz mitochondrialna polimeraza γ , wpływając na metabolizm i replikację kwasów nukleinowych co może powodować uszkodzenie wątroby lub szpiku. Baloksawir nakierowany przeciwko IAV, może powodować wystąpienie reakcji alergicznej. Ponieważ jednak leki VTA nie ingerują bezpośrednio w fizjologię komórek gospodarza, ich zastosowanie niesie ze sobą mniejsze ryzyko toksyczności [107]. Obecnie 90% leków przeciwwirusowych celuje bezpośrednio w białka wirusowe, natomiast jedynie około 10% zatwierdzonych leków jest ncelowanych na białka komórek gospodarza.

Wynika to przede wszystkim z uwarunkowań historycznych. Sukces terapii skojarzonej HIV/AIDS opartej na inhibitorach wirusowej polimerazy, odwrotnej transkryptazy i integrazy zmieniły oblicze epidemii HIV/AIDS, a nowoczesne leki przeciwko HCV umożliwiły normalne funkcjonowanie ponad 95% pacjentów. Liczne sukcesy leków VTA udowodniły, że jest to skuteczna i opłacalna strategia w projektowaniu leków [108]. Dodatkowo organy regulacyjne jak Amerykańska Agencja ds. Leków i Żywności (FDA, ang. *Food and Drug Agency*) i EMA mają ogromne doświadczenie w ocenie klasycznych leków przeciwwirusowych, ponieważ wiedzą jakie parametry należy ocenić. Natomiast charakterystyka nowych związków hamujących białka komórki gospodarza nadal przysparza wielu problemów, a tym samym opóźnia wejście takich produktów na rynek.

Dlatego też bardzo ciekawym rozwiązaniem mogą być koniugaty molekularne związków, które zostały już scharakteryzowane i dopuszczone do obrotu, celujące w białka wirusa. W swojej publikacji *Novel Molecular Consortia of Cannabidiol with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Emerging Coronaviruses' Entry* zbadałem wpływ konsorcjów molekularnych CBD z NLPZ na wnikanie wirusa do komórek. Niektóre koniugaty wykazywały się znaczącym efektem hamującym infekcję SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2, jednocześnie nie wykazując wpływu na replikację IAV. Konsorcja CBD–naproksen oraz CBD–ibuprofen wykazały silne właściwości inhibitorowe wobec wnikania SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2 do komórek, osiągając wartości IC_{50} poniżej 1 $\mu\text{g/mL}$ (ok. $\approx 2 \mu\text{M}$). Związek CBD-N (ang. *cannabidiol-naproxen*) zredukował efektywność wnikania SARS-CoV-1 ponad dziesięciokrotnie ($IC_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$). Podobny efekt zaobserwowano w przypadku SARS-CoV-2, gdzie zarówno CBD-N, jak i CBD-I (ang. *cannabidiol-ibuprofen*) istotnie ograniczały wnikanie wirusa, wykazując aktywność w zakresie submikromolarnym ($IC_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$). Związki CBD-I oraz CBD-N są słabszymi inhibitorami o rząd wielkości od nafamostatu oraz nieznacznie słabszym od kamostatu, gdyż działały w zakresie nanomolarnym, to jednak ich skuteczność pozostaje istotna z perspektywy przeciwwirusowej. Jednocześnie badania wykazały, że w przypadku wirusa grypy, NLPZ tworzące konsorcja z CBD utraciły swoje właściwości przeciwwirusowe, jednocześnie zyskując nowe właściwości przeciwko koronawirusom.

Stąd w projektowaniu nowych strategii przeciwwirusowych należy mieć na uwadze skuteczność różnych grup leków. Leki nakierowane bezpośrednio na konkretne białko wirusa zwykle charakteryzują się wysoką skutecznością działania przeciw danemu wirusowi, jednak dotyczy ona jedynie wirusa docelowego i rzadko są one skuteczne przeciwko innym typom wirusów. Wynika to głównie z faktu występowania unikalnych sekwencji lub struktur

białek, na które nakierowane są VTAs. Z kolei HTAs charakteryzują się szerszym spektrum oddziaływania przeciwwirusowego, choć skuteczność może być mniejsza w porównaniu z wyspecjalizowanymi VTAs. Wspomnieć należy również o inhibitorach syntezy nukleotydów jak brekwinar czy analogi kwasu mykofenolowego hamujące dehydrogenazę monofosforanu inozyny (IMPDH, ang. *inosine monophosphate dehydrogenase*), które wykazują działanie przeciwko wielu wirusom RNA, takim jak wirusy grypy, koronawirusy i wirusy gorączek krwotocznych. W trakcie badań klinicznych znajduje się sialidaza DAS181, która w badaniach z wykorzystaniem modeli zwierzęcych całkowicie chroniła przed zakażeniem różnymi szczepami wirusa grypy, a w badaniach klinicznych powodowała zmniejszenie replikacji wirusa u chorych na grypę [159]. Aplidina (plitidepsin), działająca jako inhibitor eEF1A, enzymu odpowiedzialnego za translację wirusowego mRNA, wykazała silne działanie przeciwwirusowe przeciw SARS-CoV-2 w badaniach przedklinicznych. Natomiast w I fazie badań klinicznych u pacjentów z COVID-19 powodowała spadek ilości wirusa i poprawę stanu zdrowia zakażonych [137]. Poszczególne VTAs posiadają wysoką skuteczność przeciwko konkretnemu wirusowi, natomiast HTAs działają w szerokim spektrum, co zapewnia im potencjał wobec nowo pojawiających się patogenów. Odmienne strategie charakteryzują się również innym poziomem bezpieczeństwa i toksyczności dla gospodarza

Podsumowując, strategie skupiające się na bezpośrednim oddziaływaniu z wirusem wykorzystujące VTAs, zapewniają wysoką skuteczność i specyficzność, dzięki czemu do dziś stanowią podstawowy cel projektowania współczesnych terapii przeciwwirusowych. Jednakże ze względu na wąskie spektrum działania oraz wysoki poziom zmienności genetycznej wirusów, rośnie zainteresowanie strategiami terapeutycznymi ukierunkowanymi na komórki gospodarza wykorzystującymi HTAs, które oddziałują pośrednio na cykl replikacyjny wirusa. Strategia oparta o inhibicję białek gospodarza jest w stanie zapewnić większy poziom odporności przeciwko powstawaniu lekooporności, ponieważ mutacje zachodzą tam znacznie rzadziej. Szersze spektrum działania leków HTA może zapewnić przydatność w przypadku nowo pojawiających się wirusów. Obiecującym kierunkiem projektowania terapeutyków jest również zastosowanie terapii skojarzonej, której liczne dowody naukowe wskazują na występowanie silnego efektu synergistycznego. Z tego powodu to właśnie specyficzne czynniki komórkowe gospodarza, które nie są odpowiedzialne za niezbędne do przeżycia organizmu procesy, stanowią atrakcyjny cel dla interwencji przeciwwirusowej [109].

Wśród HTAs można wyróżnić kilka różnych mechanizmów działania. Jedną z strategii opiera się na hamowaniu wnikania wirusa do komórek, np. poprzez zablokowanie receptorów na powierzchni komórek lub enzymów odpowiedzialnych za wnikanie wirusa do wnętrza komórki gospodarza. Przykładem HTA o takim mechanizmie i jedynym obecnie zatwierdzonym, jest marawirok, będący antagonistą receptora CCR5, który uniemożliwia wnikanie HIV do komórek [105]. W kontekście SARS-CoV-2 i IAV analizuje się potencjał inhibitorów proteazy TMPRSS2: kamostatu i nafamostatu. Są to syntetyczne inhibitory proteaz serynowych, wiążące się kowalencyjnie z resztą serynową w centrum aktywnym TMPRSS2, co uniemożliwia cięcie białka wirusowego i prawidłowy przebieg cyklu replikacyjnego [160]. Oba leki hamują również inne proteazy takie jak matryptaza i HAT [161]. Jednakże wyniki badań pokazują, że inhibitory proteaz o szerokim spektrum działania mogą być mało skuteczne w warunkach *in vivo*, ponieważ wirusy mogą korzystać z obecności alternatywnych proteaz, a niektóre warianty wirusów preferują odmienne ścieżki wejścia do komórki. Z tego powodu potrzebne są inhibitory selektywne, które celowałyby w kluczowe enzymy niezbędne dla cyklu replikacyjnego wirusa [162].

Kolejnym mechanizmem, w którym wykazano przeciwwirusowy potencjał HTAs, jest zakłócanie wewnątrzkomórkowych procesów replikacyjnych wirusa poprzez celowanie w białka komórkowe niezbędne do replikacji genomu. Przykładem jest alisporwir, należąca do grupy cyklosporynowych inhibitorów cyklofiliny. Hamują one skutecznie namnażanie się wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV, ang. *hepatitis C virus*) w warunkach *in vitro* i będący obecnie w fazie testów klinicznych [163]. W badaniach nad SARS-CoV-2 wykorzystywano również związek brekwinar, inhibitor dehydrogenazy dihydroorotanowej, powodujący obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu uracylu. Powodował on inhibicję replikacji wirusa, natomiast obecnie substancja ta pozostaje w fazie II testów klinicznych [164]. W przypadku IAV, badano również inhibitory eksportu jądrowego, np. eksportyny-1/CRM1, które prowadziły do zatrzymania kompleksów rybonukleoproteinowych w jądrze [165]. HTAs mogą również ograniczać nadmierną reakcję zapalną organizmu. Deksametazon i tocilizumab powodują redukcję burzy cytokinowej i stanu zapalnego w płucach, co prowadzi do poprawy funkcjonowania płuc, lepszej wymiany gazowej i obniżenia ryzyka ciężkiego przebiegu choroby [167].

Bezpieczeństwo i wpływ HTAs na organizm są bardziej skomplikowane, o czym wspominałem powyżej, ponieważ hamowanie białka lub szlaku komórkowego w organizmie pacjenta może spowodować niekorzystny wpływ na zdrowe komórki. Głównym problemem podczas projektowania nowych HTAs jest więc toksyczność zależna

od celu (ang. *on-target toxicity*), czyli działań niepożądanych leku, które wynikają z jego mechanizmu działania [104]. Z tego względu idealnym celem dla HTAs byłby czynnik komórkowy niezbędny dla cyklu replikacyjnego wirusa, którego zahamowanie aktywności jednocześnie nie wpływa negatywnie na metabolizm komórek gospodarza. Ze względu na fakt, że wirusy wykorzystują podstawowe procesy komórkowe jak synteza białek, metabolizm lipidów czy sygnały odpornościowe, znalezienie odpowiedniego celu komórkowego dla HTAs jest trudne. Przykładowo: chlorochina i hydroksychlorochina wpływające na endosomy i odpowiedź immunologiczną organizmu w badaniach *in vitro* hamowały infekcję SARS-CoV-2, natomiast u pacjentów okazały się nieskuteczne. Powodowały one poważne działania niepożądane jak zaburzenia rytmu serca poprzez wpływ na działanie kanałów jonowych [107]. Wspomniana wcześniej fludaza podczas badań klinicznych powodowała efekty uboczne w postaci wytworzenia przeciwciał neutralizujących substancję aktywną, reakcji immunologicznej i miejscowych uszkodzeń dróg oddechowych. Z tego powodu, przy projektowaniu HTAs bierze się również pod uwagę dawkę i czas ekspozycji. Wpływ na wystąpienie działań niepożądanych HTAs mogą mieć również uwarunkowania genetyczne lub chorobowe pacjentów, np. w wyniku istnienia polimorfizmu genu kodującego cel terapeutyczny, jego zahamowanie może mieć negatywne skutki. Z tych względów regulacje dotyczące HTAs są bardzo wymagające, a korzyści terapeutyczne płynące z zastosowania muszą przeważać nad potencjalnym ryzykiem dla pacjentów [106]. Należy jednak podkreślać, że nie wszystkie HTAs o szerokim spektrum oddziaływania mają poważne skutki niepożądane. Kamostat i nafamostat są od wielu lat stosowane w Japonii w przypadkach leczenia przewlekłego zapalenia trzustki i jako antykoagulant podczas hemodializy. Posiadają również znany profil bezpieczeństwa. Zostały jednak zatwierdzone i wdrożone w leczeniu w Japonii przed wprowadzeniem globalnych standardów badań klinicznych, w tym randomizowanych badań kontrolnych. Ponadto Japonia posiada specyficzny system dopuszczania leków, który czasami pomija III fazę międzynarodowych badań klinicznych [168]. Kamostat hamuje aktywację enzymów trawiennych w trzustce, natomiast nafamostat hamuje działanie trypsyny, trombiny, plazminy i czynnika Xa. Przy czym, tak jak wspominałem powyżej, zarówno kamostat, jak i nafamostat nie są selektywnymi inhibitorami proteaz serynowych i hamują aktywność wszystkich enzymów należących do tej grupy. W moich badaniach z wykorzystaniem TMPRSS2 specyficznych ASO istotny był fakt wysokiej specyficzności zaprojektowanych HTAs, pozwalający uniknąć niepożądanych skutków ubocznych wynikających z oddziaływania na inne czynniki komórkowe.

Odmienny mechanizm działania HTAs komplikuje utartą ścieżkę zatwierdzania leków. Liczne laboratoria badawcze i komercyjne posiadają również gotowe platformy testowania przesiewowego, dostosowane do badania aktywności enzymów wirusowych, co ułatwia znalezienie inhibitora wirusowego w przeciwieństwie do zidentyfikowania nowego kluczowego czynnika komórkowego. Jednocześnie środowisko lekarskie chętnie sięga po leki o znanym mechanizmie działania, natomiast nowatorskie podejścia oparte o HTAs wciąż budzą obawy. Z tych właśnie względów to VTAs wciąż dominują w leczeniu chorób wirusowych [147].

Wśród HTAs wskazać można wiele celów dla terapii przeciwwirusowych, ale TTSPs, w tym TMPRSS2, są najciekawszym obiektem do dalszych badań oraz opracowania i wdrożenia skutecznej terapii przeciwwirusowej. Na podstawie szeregu wcześniejszych badań różnych grup badawczych określić można kluczowe wnioski na temat roli, jaką proteazy serynowe, w szczególności TMPRSS2 i inne pokrewne enzymy, pełnią w aktywacji wirusów. Pomimo że TMPRSS2 jest głównym aktywatorem białka kolca koronawirusów oraz hemaglutyniny IAV, to istnieją inne proteazy serynowe z rodziny TTSP, które również są do tego zdolne. Proteazy takie jak TMPRSS4, TMPRSS11A, DESC1 i MSPL aktywują IAV i koronawirusy, ale mogą działać z różną efektywnością i specyficznością tkankową, np. mogą wymagać specyficznych warunków komórkowych lub aktywować wyłącznie niektóre podtypy wirusa. Z uwagi na istnienie w komórkach oddechowych równoległego systemu aktywacji wirusów, tzn. istnienie więcej niż jednej proteazy zdolnej do aktywowania wirusa, w przypadku zablokowania kluczowej proteazy (jak TMPRSS2) inne mogą przejąć jej funkcję. Jest to istotne z punktu widzenia projektowania skutecznej terapii przeciwwirusowej opartej o inhibicję TMPRSS2. Badania z 2014 roku [70] udowodniły, że niektóre podtypy H1N1 lub H7N9 są zależne od cięcia proteolitycznego dokonywanego przez TMPRSS2, natomiast H3N2 wykazywały mniejszą zależność od tej proteazy. Należy jednak zaznaczyć, że rola innych proteaz z rodziny TTSPs, takich jak TMPRSS4, HAT czy matryptaza, pozostaje nie do końca wyjaśniona i może być kompensacyjna lub specyficzna dla podtypów. W związku z tym pełne zablokowanie aktywacji wirusa grypy za pomocą jedynie inhibitora TMPRSS2 może być niewystarczające w przypadku niektórych szczepów. Inhibitory proteaz, takie jak kamostat i nafamostat, mogą ograniczać replikację wirusów, ale są one niespecyficzne, a ich skuteczność nie została potwierdzona w badaniach klinicznych, np. w leczeniu COVID-19. Skłania to do sformułowania wniosku, że w celu stworzenia skutecznej terapii przeciwwirusowej

potrzebne są bardziej selektywne inhibitory, które dodatkowo lepiej penetrują tkanki oddechowe i są aktywne również wobec izoform TMPRSS2 [71].

Strategia polegająca na inhibicji konkretnych białek gospodarza może potencjalnie wywoływać niepożądane skutki i mieć znaczny wpływ na homeostazę, niosąc ryzyko zaburzeń fizjologicznych. W przypadku TMPRSS2, przez długi czas proteaza ta nie była dokładnie zbadana. Jednak najnowsze doniesienia wskazują, że jest ona odpowiedzialna m.in. za regulację działania kanałów sodowych ENaC znajdujących się w nabłonku oddechowym i nerkach, co wpływa na utrzymanie prawidłowego poziomu płynów [110]. Działanie kanałów sodowych reguluje usuwanie płynów z dróg oddechowych, co może mieć znaczenie w przypadku ostrej niewydolności oddechowej. Pomimo tego faktu, w badaniach z wykorzystaniem transgenicznych myszy pozbawionych ekspresji TMPRSS2 nie zaobserwowano żadnych anomalii rozwojowych ani zaburzeń fizjologicznych. Myszy rozwijały się prawidłowo, a narządy nie wykazywały oznak upośledzenia funkcji. Istotny był również brak wzrostu poziomu ekspresji innych, pokrewnych proteaz [111]. Może to sugerować występowanie zjawiska enzymatycznej redundancji, czyli przejmowania funkcji niektórych proteaz przez inne. Kolejną hipotezą jest brak istotnego znaczenia danego enzymu poza sytuacjami stresowymi organizmu, np. infekcją. W przypadku stosowania zatwierdzonego inhibitora TMPRSS2, jakim jest nafamostat, u części pacjentów odnotowano występowanie hiperkaliemii, czyli podwyższonego poziomu potasu we krwi. Jest to związane z wychwytem sodu przez kanały ENaC i zostało zaobserwowane również u chorych na COVID-19 leczonych nafamostatem [112]. TMPRSS2 uczestniczy prawdopodobnie w trawieniu białek w przewodzie pokarmowym [113]. Odnotowano również związek tej proteazy z rakiem prostaty. TMPRSS2 w męskim układzie rozrodczym jest silnie regulowany przez androgeny, aczkolwiek w przypadku badań na myszach, inhibicja tego enzymu nie wpłynęła widocznie na zmiany w funkcjonowaniu gruczołu krokowego [113].

W efekcie istnienia mechanizmu enzymatycznej redundancji wśród proteaz z rodziny TTSP, a także innych, istnieje ryzyko dostosowania się wirusa do nowych warunków, w których wykorzystywana proteaza zostaje zablokowana. Analizując ekspresję pokrewnych proteaz w wyniku zablokowania TMPRSS2, nie zaobserwowano zwiększenia ich poziomu ekspresji u myszy. Można zatem wysnuć wniosek, że nie występuje prosty mechanizm powodujący kompensację utraconej aktywności przez regulację ekspresji genów homologicznych, np. TMPRSS4, HAT/TMPRSS11D [113]. SARS-CoV-2 w sytuacji braku TMPRSS2 może wykorzystywać do aktywacji TMPRSS4, z kolei proteaza HAT wydzielana

w drogach oddechowych może ciąć hemaglutyninę wirusa grypy. Dzięki presji selekcyjnej, u wirusów może dojść do modyfikacji białek fuzyjnych w celu zmiany preferowanej proteazy. Wirusy grypy ptasiej posiadają wielobazowe miejsce cięcia HA, co umożliwia cięcie przez inną proteazę – furynę, która powszechnie występuje w organizmie. Taka adaptacja powoduje zwiększenie śmiertelności w wyniku zakażenia, ale zmniejsza transmisyjność wariantu, np. AIV H5N1 jest wysoce zjadliwy, ale słabo przenosi się między ludźmi. Wielobazowe miejsce cięcia wykorzystywane przez furynę S1/S2 istnieje także w pierwotnym wariantcie SARS-CoV-2, co zwiększyło zakaźność wirusa. Jednocześnie furyna nie jest w stanie zastąpić TMPRSS2, ponieważ cięcie musi być dokonane również w miejscu S2' przez protezę tripsynopodobną. Prawdopodobnie przy wystąpieniu presji selekcyjnej, np. w wyniku stosowania inhibitorów TMPRSS2, wirus mógłby potencjalnie nabyć zdolności do wykorzystywania innej proteazy, lub też wykorzystywać inny szlak wnikania, np. endosomalny, co można było obserwować w przypadku wariantu Omikron. Z większą skutecznością wnikał on do komórki, wykorzystując drogę endosomalną, jednocześnie wykazując mniejsze powinowactwo w stosunku do TMPRSS2 [114]. Skutkowało to zwiększoną zdolnością do transmisji wirusa, przy lżejszych objawach zakażenia. To dowodzi, że pomimo dużej zdolności wirusów do wykształcania alternatywnych mechanizmów wnikania do komórek, często wiąże się to z obniżeniem wirulencji.

Obecnie prowadzi się również badania nad innymi drobnocząsteczkowymi inhibitorami proteaz serynowych posiadających szerokie spektrum oddziaływania, jak np. aprotynina. Jest to naturalny związek otrzymywany z tkanki płuc bydła, stosuje się go m.in. w kardiochirurgii jako środek przeciwzakrzepowy. Aprotynina hamuje aktywację trombiny będącej receptorem PAR-1, plazminy i czynnika XII, co zmniejsza ryzyko wystąpienia zakrzepów i rozsianego krzepnięcia śródnaczyniowego (DIC). Aktualnie prowadzi się zaawansowane badania kliniczne nad potencjalnym zastosowaniem tego związku jako leku przeciwwirusowego, np. przeciwko SARS-CoV-2 [115]. Aprotynina hamuje cięcie białka kolca przez blokowanie ludzkich proteaz, takich jak np. furyna, TMPRSS2, tripsyna, uniemożliwiając wniknięcie wirusa do komórki. Inhibitor ten oddziałuje również na układ kallikreina-kinina (KKS), który aktywuje się w ciężkim przebiegu COVID-19, oraz ogranicza uwalnianie cytokin zapalnych, np. interferonu-alfa IL-6, ekspresję cząsteczek adhezyjnych na leukocytach oraz aktywność syntazy tlenku azotu (NOS). W trzeciej fazie testów klinicznych przebadano 75 hospitalizowanych pacjentów z COVID-19 i stwierdzono, że wziewne zastosowanie aprotyniny może stanowić skuteczne

i bezpieczne uzupełnienie standardowej terapii. Ponieważ inhibitor działa na wiele proteaz w organizmie, a także wykazuje działanie przeciwzapalne i antykoagulacyjne, może być skuteczny wobec nowo pojawiających się wariantów wirusa. Dodatkowo nie wykazuje poważnych działań niepożądanych, co czyni ten związek kandydatem do dalszych badań, również przeciwko innym wirusom oddechowym [115].

Dla porównania: chlorek bromoheksyny będący mukolitycznym lekiem wykrztuśnym zatwierdzonym przez FDA jest również znanym inhibitorem TMPRSS2, którego IC₅₀ wynosi 0,75 μ M. W jednym z pilotażowych badań bromoheksynę podawano pacjentom z umiarkowanym COVID-19, co skutkowało rzadszym rozwojem niewydolności oddechowej. Udowodniono, że bromoheksyna może redukować infekcję SARS-CoV-2 *in vitro*, osiągając szacunkową wartość IC₅₀ rzędu $\sim$ 1 μ M w warunkach komórkowych, a zatem w podobnym zakresie aktywności jak hybrydy CBD–NLPZ. [116]. Jednakże ze względu na małą próbę badawczą i brak ślepej kontroli, a także ze względu na niejednoznaczne wyniki *in vitro* innych badań, istnieje potrzeba dalszych badań klinicznych, by jednoznacznie ocenić jej skuteczność [117]. Jednak ze względu na dobry profil bezpieczeństwa i minimalne działania niepożądane, może stanowić ona potencjalny środek profilaktyczny przeciwko zakażeniom SARS-CoV-2. Ze względu na właściwości inhibitorowe TMPRSS2, można również spekulować, że bromoheksyna będzie ograniczać także aktywację hemaglutyniny wirusa grypy [118]. Podobnym przykładem zastosowania aktualnie zatwierdzonych i wykorzystywanych leków jest gabeksat mesylanu. Jest on dostępny jako lek wykorzystywany w leczeniu zapalenia trzustki. Badania z 2015 roku [119] wykazały, że zablokowanie TMPRSS2 przez gabeksat mesylatu doprowadziło do znaczącego obniżenia się miana wirusów grypy. Wartość IC₅₀ wynosiła 130 nM. W przypadku SARS-CoV-2 zastosowanie tego inhibitora nie spowodowało obniżenia się poziomu wnikania wirusa do komórek płuc [120].

Innym podejściem do poszukiwania skutecznych związków przeciwwirusowych są badania bibliotek związków aktywnych. W większej skali odbywa się to *in silico*, natomiast w znacznie mniejszej skali związki testuje się z wykorzystaniem linii komórkowych. W badaniu Fraser [121] autorzy poszukiwali nowych kowalencyjnych i niekowalencyjnych inhibitorów TMPRSS2 z wykorzystaniem wirtualnej biblioteki z bazy ZINC zawierającej ponad 200 milionów związków. Do stworzenia modelu struktury TMPRSS2 wykorzystano modelowanie homologiczne na podstawie pokrewnych proteaz jak kallikreiny i matriptazy, a także dostępnych danych na temat struktury krystalograficznej TMPRSS2. Pośród kowalencyjnych inhibitorów zidentyfikowano związek '2805 zawierający grupę estrową,

który wykazał silne hamowanie TMPRSS2 z $IC_{50} = 120$ nM. Następnie stworzono 6 nowych cząsteczek opartych na strukturze estrowej, z których '156 i '157 wykazały inhibicję na poziomie zbliżonym do nafamostatu. Zidentyfikowano również nową klasę inhibitorów niekowalencyjnych, związki '2222 i '2602 wykazywały selektywność wobec TMPRSS2, a IC_{50} wynosiło 23–59 μ M. Nowe estrowe inhibitory oraz niekowalencyjne związki aminowe mogą być rozwijane jako potencjalne związki przeciwwirusowe. Dodatkowo związki amidowe dają możliwość projektowania terapii o wysokim stopniu selektywności do TMPRSS2, w których ryzyko wystąpienia działań niepożądanych jest mniejsze [121].

Interesującym podejściem jest również poszukiwanie związków aktywnych działających na TMPRSS2 spośród opisanych i zatwierdzonych przez FDA związków chemicznych. Metodą wysokoprzepustowego przesiewania (ang. *high-throughput screening*, HTS) przebadano 2560 związków z biblioteki Selleck L1300. Spośród zidentyfikowanych związków 24 związki oceniono jako klinicznie istotne i finalnie wybrano dwa, halofuginon oraz homoharringtoninę. Halofuginon promuje ubikwitynację i degradację TMPRSS2, działając przez aktywację ligazy DCAF1 (ang. *DDB1-Cul4-associated factor 1*) będącej składnikiem ligazy CRL4 E3 (ang. *cullin-RING ligase 4*). Wykazano, że oba leki znacząco obniżyły poziom RNA wirusa SARS-CoV-2 w przypadku komórek Calu-3. Związek halofuginon może stanowić materiał do dalszych badań klinicznych ze względu na niską toksyczność i znaną farmakokinetykę. Dodatkowo autorzy badań zwracają uwagę na możliwość stosowania strategii synergii lekowej i łączenia inhibitorów TMPRSS2 z lekami blokującymi inne proteazy lub replikację wirusa, jak remdesivir [122].

Wiele obecnie projektowanych inhibitorów TMPTSS2 lub innych ludzkich proteaz serynowych to peptydomimetyki (ang. *peptidomimetics*). Są to syntetyczne związki organiczne, których struktura przestrzenna, konformacja lub funkcja biologiczna zostały specyficznie zaprojektowane, aby naśladowały naturalnie występujące białka. Charakteryzują się one zwiększoną stabilnością metaboliczną, biodostępnością i selektywnością wobec docelowych cząsteczek, takich jak enzymy, receptory lub inne białka które oddziałują z peptydami. Shapira [123] zaprojektowali inhibitory proteaz serynowych z rodziny TTSP, ze szczególnym uwzględnieniem TMPRSS2. Zaprojektowane peptydomimetyki były w stanie wytworzyć wiązania kowalencyjne z resztą serynowa Ser441 znajdującą się w centrum aktywnym TMPRSS2, co prowadziło do nieodwracalnej inaktywacji enzymu w mechanizmie o wysokim powinowactwie (ang. *tight-binding inhibition*). Mechanizm ten różni się od klasycznej inhibicji odwracalnej, w której inhibitor znajduje się w dynamicznej równowadze z enzymem. Wysokie powinowactwo

do TMPRSS2 jest efektem oddziaływań, które stabilizują inhibitor w miejscu wiązania dzięki występującym w kieszeni katalitycznej aminokwasom Asp435, Gly462, Gly464, Gln438. W przedstawionym badaniu związek N-0385 powodował największy poziom obniżenia aktywności TMPRSS2, gdzie IC₅₀ wyniosło 1.9 nM. Skutecznie zahamował on replikację SARS-CoV-2 oraz wariantów alarmowych VOCs (ang. *variants of concern*; Alpha, Beta, Gamma, Delta) w badaniu *in vitro* z wykorzystaniem ludzkich komórek Calu-3 oraz organoidów okrężnicy. Testowany związek N-0385 stanowi potencjalnie skuteczny lek przeciwwirusowy o szerokim spektrum działania. Jego zastosowanie mogłoby stanowić również formę terapii wspomagającej szczepienia. Mógłby również być uznawany za środek przeznaczony dla osób niezaszczepionych z grup ryzyka bądź w przypadku występowania kontaktów wysokiego ryzyka [123].

W swojej pracy Mahoney i wsp. [124] zaprojektowali peptydomimetyczne inhibitory TMPRSS2 zawierające ketobenzotiazolowy C-koniec. Z biblioteki związków wybrano cztery związki wykazujące niskie wartości IC₅₀ 250-340 pM względem TMPRSS2. Co istotne związki te wykazywały również selektywność w stosunku do innych proteaz, takich jak aktywator czynnika wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor activator*, HGFA), hepsyna i matrypaza. Według autorów publikacji najbardziej obiecującym kandydatem do dalszych badań jest związek MM3122, który skutecznie zablokował wnikanie SARS-CoV-2 do komórek Calu-3 przy EC₅₀ wynoszącym 0,43 nM, natomiast jego IC₅₀ wyniosło 340 pM. Bardzo istotny jest również fakt, że MM3122 był aktywny wobec MERS-CoV, co sugeruje, że potencjał przeciwwirusowy tego związku obejmuje również inne wirusy wykorzystujące TMPRSS2 [124]. Inhibitory kowalencyjne jak kamostat i nafamostat są inhibitorami pseudo-odwracalnymi, tzn. acylują one serynę proteazy, ale powstały kompleks może ulec powolnej deacylacji. Natomiast niektóre peptydomimetyki mogą tworzyć bardziej trwałe wiązania, co może prowadzić do długotrwałego zablokowania aktywności TMPRSS2, a więc być korzystne z perspektywy zastosowania profilaktycznego.

Jedną z kluczowych kwestii w procesie projektowania inhibitorów kowalencyjnych jest ich selektywność. Nowoczesne peptydomimetyki ograniczają występowanie niepożądanych efektów ubocznych i stanowią obecnie jedną z najskuteczniejszych strategii hamowania proteaz wirusowych. Dzięki rozpoznaniu sekwencji aminokwasowej enzymu wykazują wysoki poziom powinowactwa oraz nie ulegają tak często mutacjom, a więc ograniczają prawdopodobieństwo wytworzenia odporności przez wirus.

Podsumowując, peptydomimetyki są odporne na degradację poprzez cięcie proteolityczne w środowisku organizmu dzięki zastosowanym modyfikacjom struktury, takim jak deaminacja. Dodatkowo wykazują również właściwości farmakokinetyczne, jak dłuższy okres półtrwania, oraz możliwe jest ich podanie donosowe. Bardzo istotny jest fakt wysokiego poziomu selektywności wobec konkretnej klasy enzymów jak TTSP, co przyczynia się do zmniejszenia wystąpienia potencjalnych efektów ubocznych.

W publikacji *TMPRSS2-specific antisense oligonucleotides inhibit host cell entry of emerging viruses* zaprojektowane TMPRSS2 mRNA specyficzne ASO powodowały wyciszenie ekspresji tej proteazy, a w konsekwencji prowadziły do obniżenia się miana wirusa IAV, a także wnikania SARS-CoV-1/2. Pomimo, iż w publikacji nie podano wyraźnie wartości IC₅₀ dla hamowania replikacji IAV i wnikania koronawirusów, dane sugerują, że nanomolarne stężenia ASO były wystarczające do osiągnięcia silnych efektów przeciwwirusowych. Obecnie niewiele publikacji opisuje wykorzystanie TMPRSS2 specyficznych ASO. Grupa Bottcher-Friebertshauser [132] zaprojektowała oligonukleotydy morfolinowe sprzężone z peptydem (PPMO) w celu zahamowania translacji wirusowego RNA w hodowlach komórkowych. Alternatywny splicing mRNA TMPRSS2 za pomocą PPMO zapobiegł cięciu hemaglutyniny w IAV oraz obniżył miano wirusa o 2 do 3 log₁₀ jednostek (oznacza to, że uzyskano 100- do 1000-krotny spadek ilości wirusa [132]). W innym badaniu z 2023 roku badacze zaprojektowali ASO nakierowane na genom SARS-CoV-2 oraz ACE2 i TMPRSS2 w celu zahamowania infekcji SARS-CoV-2. Niektóre z testowanych ACE2 oraz SARS-CoV-2 specyficznych ASO wykazały ponad 100-krotne lub większe zmniejszenie miana wirusa przy stężeniu 10 μM ASO (inhibicja $\geq 2 \log_{10}$). Natomiast ASO nakierowane na TMPRSS2 nie wykazały właściwości przeciwwirusowych [133], należy jednak zauważyć, że wszystkie zaprojektowane ASO były nacelowane tylko na sekwencje niekodujące, w przeciwieństwie do prowadzonych przeze mnie badań, w których ASO były ukierunkowane tylko na sekwencje kodujące. Należy mieć również na uwadze, iż w przeciwieństwie do wszystkich wyżej wymienionych inhibitorów TMPRSS2, jedynie wykorzystana przeze mnie w niniejszym artykule, strategia oparta o ASO, hamuje ekspresję *TMPRSS2* a nie tylko jej aktywność. Takie rozwiązanie prowadzi do znacznie skuteczniejszego działania przeciwwirusowego przy minimalnych skutkach ubocznych dla organizmu.

Za potencjalny lek przeciwwirusowy uznaje się również erlotynib, stosowany obecnie w onkologii i leczeniu raka płuc. Jest to drobnocząsteczkowy inhibitor kinazy tyrozynowej receptora nabłonkowego czynnika wzrostu (EGFR). Liczne publikacje

wskazują, że wirusy potrafią wykorzystywać szlak sygnałowy EGFR do infekcji komórek poprzez jego aktywację, co sprzyja wnikaniu wirusa, zwiększa replikację lub też może powodować osłabianie naturalnych mechanizmów immunologicznych organizmu. Infekcja SARS-CoV-1 i SARS-CoV-2 prowadzi do zwiększonej aktywacji EGFR w nabłonku płuc i występuje jednocześnie z nasileniem się objawów chorobowych, nadprodukcją śluzu i włóknieniem płuc [127]. Tak więc strategia oparta na hamowaniu aktywności EGFR może okazać się skuteczna w leczeniu infekcji wirusowych lub łagodzeniu ich objawów. W badaniach *in vitro* erlotynib wykazywał właściwości inhibitorowe SARS-CoV-2, powodując zatrzymanie replikacji wirusa w hodowlach komórkowych oraz zmniejszenie wytwarzania cytokin TNF- α . Wynika to przede wszystkim z faktu blokowania EGFR, co powoduje zahamowanie sygnałów wzrostowych dla wirusa oraz reakcji zapalnych, które powodowane są przez infekcję. Dochodzi również do zatrzymania aktywności kinazy adaptorowej 2 związanej z klatryną (AAK1, ang. adaptor-associated kinase 1), która uczestniczy we wnikaniu wirusa do komórki na drodze endocytarnej. Dzięki skojarzeniu erlotynibu z sunitynibem wykazano silny efekt synergistyczny przeciwko SARS-CoV-2 *in vitro*, doprowadzając do zahamowania infekcji. W wyniku zablokowania kilku ścieżek sygnałowych odpowiedzialnych za endocytozę, uzyskano efekt o większym stopniu inhibicji, co potwierdza większą skuteczność terapii opartej o koktajle leków w leczeniu chorób wirusowych. Ze względu na skutki uboczne w postaci wysypki skórnej, biegunki i zmęczenia wynikającego z inhibicji EGFR, erlotynib nie zakwalifikował się do użytku w terapii COVID-19 i nadal pozostaje lekiem onkologicznym. Najnowsze badania wskazują, że inhibicja EGFR może być skuteczną strategią przeciwwirusową, ale wymagane są dalsze badania oceniające skuteczność przeciwwirusową i bezpieczeństwo [130]. Dzięki tworzeniu hybrydowych cząsteczek erlotynibu możliwe jest zwiększenie właściwości przeciwwirusowych oraz selektywności terapeutyku. Modyfikacje strukturalne polegające na dodawaniu metaloorganicznych ugrupowań chemicznych, np. ferrocenu, mogą powodować uzyskanie nowych właściwości związku. W publikacji *Organometallic–Erlotinib Conjugates Active against Lung Cancer Cells and as Emerging Virus Entry Inhibitors* opisują wykorzystanie metaloorganicznych koniugatów erlotynibu w celu zmiany jego zastosowania i zwiększenia jego właściwości przeciwwirusowych. Związek 5, zawierający modyfikację rutenocyłową, spowodował znaczne zmniejszenie replikacji IAV *in vitro*, a także zablokował wnikanie SARS-CoV-1/2 do komórek. Obniżenie poziomu miana IAV przy stężeniu 10 μ M było ponad 10-krotne w stosunku do kontroli, i było większe od efektu hamującego, jaki wykazywał niezmodyfikowany erlotynib. Erlotynib

oraz związek 5 selektywnie obniżyły poziom wnikania koronawirusów do komórek przy stężeniu 100µM. Testowane są obecnie liczne analogi erlotynibu i niektóre modyfikacje mogą służyć konkretnej metodzie podania leku, np. wziewnie w celu dostarczeniu terapeutyku bezpośrednio do płuc, co zwiększy miejscowe stężenie, minimalizując ekspozycję ogólnoustrojową i potencjalne działania niepożądane. Opracowuje się również metody dostarczania erlotynibu z wykorzystaniem nanonośników, jak dwusiarczki molibdenu, który mógłby kierować lek bezpośrednio do zakażonych komórek [129]. Natomiast modyfikacja rdzenia 4-anilinochinazolinowego erlotynibu mogłaby doprowadzić do jego zwiększonej selektywności kinazowej, zwiększając powinowactwo do kinazy GAZ istotnej dla cyklu koronawirusów, przy jednoczesnym słabszym oddziaływaniu na EGFR [130]. Podsumowując, erlotynib posiada potwierdzone właściwości przeciwwirusowe poprzez blokowanie dróg sygnałowych wirusa, zależnych od gospodarza, a jego dodatkowe modyfikacje chemiczne mogą zwiększyć jego potencjał przeciwwirusowy. Natomiast wpływanie na szlaki sygnałowe w komórkach gospodarza jest skuteczną metodą ograniczania infekcji i może stanowić istotne uzupełnienie klasycznej terapii wykorzystującej leki nakierowane na białka wirusowe.

Rozważając poszczególne wady i zalety strategii przeciwwirusowych opartych o VTAs i HTAs, w celu zapewnienia jeszcze korzystniejszego efektu terapeutycznego, można zaproponować wykorzystanie terapii skojarzonej. Jest to zastosowanie mieszanki leków ukierunkowanych na wirusa oraz na komórki gospodarza, która może wykazać optymalny efekt terapeutyczny, przewyższający efekty użycia tych substancji oddzielnie. Jeden składnik hamowałby bezpośrednio enzymy wirusowe, natomiast inny zaburzałby funkcjonowanie szlaku komórkowego wykorzystywanego przez dany patogen. Zastosowanie dwóch leków może wywołać przeciwwirusowy efekt synergistyczny, co oznacza, że substancje wzajemnie wzmacniają swoje działanie. W badaniach wykazano, że zastosowanie mieszaniny molnupirawiru (VTA) z kamostatem (HTA) hamuje infekcję SARS-CoV-2 w większym stopniu, niż każda z substancji zastosowana osobno [109]. Dodatkowo zastosowanie trzeciego związku, brekawinaru (HTA), powodowało inhibicję replikacji SARS-CoV-2 powyżej 95% w warunkach *in vitro*. Zastosowanie leków HTA jednocześnie z VTA zmniejsza jeszcze bardziej prawdopodobieństwo wytworzenia odporności na oba leki, niż ma to miejsce w przypadku samych leków HTA. Badania nad HIV oraz HCV wykazały, że terapia skojarzona w praktyce niemal uniemożliwia rozwój opornych szczepów. Dzięki wystąpieniu efektu synergistycznego dwóch lub trzech substancjach, możliwe jest uzyskanie wysokiej skuteczności terapeutycznej

przy zastosowaniu niższej dawki tych związków [104]. W przypadku pojawienia się wariantu wirusa odpornego na składnik VTA, istnienie substancji HTA może zapewnić utrzymanie skuteczności terapii skojarzonej.

W dyskusji na temat nowych związków przeciwwirusowych nie powinno się zapominać o dodatkowych czynnikach wpływających na skuteczność terapeutyczną, np. strategii dostarczenia danego związku do organizmu, ponieważ droga podania leku istotnie wpływa na jego biodostępność, skuteczność i profil działania. W przypadku IAV i koronawirusów replikacja rozpoczyna się w nabłonku dróg oddechowych, dlatego podanie donosowe może zapewnić wysokie stężenie leku lub szczepionki miejscowo oraz pobudzić odporność błon śluzowych. Dodatkowo podanie poprzez inhalację pozwala ominąć efekt pierwszego przejścia przez wątrobę (ang. *first-pass effect*), który powoduje zmniejszenie biodostępności substancji w wyniku metabolizowania jej. Dzięki temu lek dostarczany jest szybciej do dróg oddechowych [125]. Innym sposobem podawania terapeutyków jest droga dożylna, która zapewnia bardzo wysoki poziom biodostępności substancji oraz jej szybkie dotarcie do wszystkich tkanek. Zazwyczaj podanie terapeutyku drogą dożylną wymaga zastosowania wysokich stężeń preparatu leczniczego lub jest zalecane w przypadkach kiedy wchłanianie doustne jest utrudnione. Terapia wykorzystująca podanie dożylnie terapeutyku jest bardziej inwazyjna i uciążliwa dla pacjenta, może wiązać się również z ryzykiem zakażenia związanym z wkłuciem. Z kolei najbardziej komfortowe dla pacjenta jest podanie substancji terapeutycznych drogą doustną. Jednakże wiele leków wykazuje bardzo niską wchłaniania i biodostępność w kontakcie z enzymami trawiennymi występującymi w układzie pokarmowym, co prowadzi do ich przedwczesnej degradacji. Zastosowanie w terapii zakaźni podawanego doustnie wykazywało biodostępność na poziomie około 2%, z tego względu jest on standardowo podawany wziewnie. Oligonukleotydy antysensowe oraz inne terapie wykorzystujące kwasy nukleinowe nie są skuteczne podczas podania doustnego, ze względu na szybki rozkład przed dotarciem do krwioobiegu. Obecnie jednak opracowuje się doustne leki przeciwwirusowe o odpowiedniej strukturze chemicznej, jak proleki, lub posiadające modyfikacje zwiększające lipofilność, lub także kapsułki odporne na sok żołądkowy, co zapewnia lepszy poziom wchłaniania w przewodzie pokarmowym i umożliwia osiągnięcie pożądanego stężenia. Dzięki zastosowaniu właśnie takiej drogi podawania terapeutyków, możliwa jest szybka interwencja we wczesnej fazie infekcji, również poza środowiskiem ambulatoryjnym [125].

Ważnym czynnikiem w procesie opracowywania nowych leków jest również charakterystyka chemiczna badanego związku. Na przykład oligonukleotydy antysensowe

w podstawowej formie, a więc niezawierającej modyfikacji chemicznych, są nietrwałe biologicznie, gdyż mogą być degradowane przez nukleazy komórkowe. Dodatkowo samodzielnie charakteryzują się słabą przenikalnością przez błony biologiczne. Istotne zatem okazują się odpowiednie modyfikacje chemiczne zwiększające stabilność, poprawiające biodostępność oraz zapewniające ochronę przed nukleazami. I generacja modyfikowanych nukleotydów zawierała głównie podstawienia wiązania fosfodiesterowego z wykorzystaniem wiązania fosforotioanowym (PS) w strukturze szkieletu oligonukleotydu, zwiększając odporność na nukleazy i wydłużając czas półtrwania we krwi [126]. W ASO II generacji wykorzystywano modyfikacje cukrowe 2'-O-metylo lub 2'-O-(2-metyloksyetylowe), które zwiększają powinowactwo ASO i stabilność chemiczną. Natomiast ASO III generacji charakteryzowały się wykorzystaniem zablokowanych kwasów nukleinowych (LNA) lub analogów peptydowych (PNA), zapewniając silniejsze wiązanie do docelowej sekwencji oraz większą trwałość. Zastosowanie modyfikacji chemicznych zmniejsza również toksyczność oraz ich immunogenność [126]. Charakterystyka ASO została dokładnie opisana w dyskusji artykułu *TMPRSS2-specific antisense oligonucleotides inhibit host cell entry of emerging viruses* będącego częścią cyklu artykułów wchodzących w skład tej rozprawy doktorskiej. Należy równocześnie zaznaczyć fakt, że ASO stanowią potencjalną alternatywę wobec tradycyjnych terapeutów, ze względu na szybkość projektowania nowych cząsteczek. Sekwencja nowych ASO tworzona jest na podstawie genomu wirusa bądź znanej sekwencji nukleotydowej genomu człowieka, co pozwala na opracowanie nowej terapii w ciągu tygodni, w przeciwieństwie prac nad tradycyjnymi terapeutami, trwających często wiele lat.

Alternatywne strategie lecznicze, takie jak technologie RNA, zmieniły sposób projektowania nowoczesnych leków przeciwwirusowych. W efekcie pandemii COVID-19 mogliśmy obserwować błyskawiczne opracowanie skutecznych szczepionek mRNA przeciwko SARS-CoV-2, które zapobiegły milionom infekcji i ograniczyły tym samym śmiertelność. Tradycyjnie rozumiane leki przeciwwirusowe, pomimo swojej skuteczności, mają pewne ograniczenia i jest to szczególnie widoczne przy nowo pojawiających się i szybko mutujących wirusach. Cząsteczki RNA mogą służyć jako leki bądź też szczepionki, pozostając bardzo plastycznymi pod względem zmiany formulacji, aby nadążyć za szybko zmieniającym się zagrożeniem. Jednocześnie dzięki tej technologii możliwe jest celowanie bezpośrednio w informację genetyczną patogenu bądź gospodarza. Leki RNA znajdują zastosowanie komplementarne do klasycznych leków, szczepionki mRNA będą coraz popularniejsze, a w leczeniu ostrych infekcji zastosowanie znajdzie prawdopodobnie

w postaci koktajli substancji leczniczych. Dzięki możliwościom wprowadzania licznych modyfikacji chemicznych terapeutyki RNA mogą być bezpieczne i skuteczne, a koszty ekonomiczne sukcesywnie obniżane. Już niebawem potencjalna szczepionka może powstawać w zaledwie kilka dni, podobnie jak leki RNAi, co zdecydowanie podniesie nasze zdolności przeciwdziałania globalnym zagrożeniom ze strony patogenów [131].

Na podstawie uzyskanych wyników wykazałem, że skuteczność przeciwwirusowa analizowanych cząsteczek układała się w relacji:

$$IC_{50}^{ASO} < IC_{50}^{SPIKE} < IC_{50}^{erlot.}$$

Oznacza to, że ASO charakteryzowały się najwyższą aktywnością biologiczną w porównaniu z inhibitorami oddziałującymi na białko kolca. Z kolei najniższą skutecznością wykazały się związki erlotynibu. Wskazuje to na przewagę strategii ASO jako potencjalnie najbardziej efektywnej spośród badanych podejść przeciwwirusowych.

Podsumowując, wszystkie trzy prace składające się na mój cykl publikacyjny przedstawiają trzy innowacyjne sposoby blokowania wirusa podczas wejścia do komórki – u symbolicznych wrót – TMPRSS2 specyficzne ASO działają poprzez wyciszenie ich strażnika, hybrydy CBD-NLPZ blokują zamek wrót, zakłócając aktywację białka kolca, a organometaliczny koniugat erlotynibu sabotuje klucz, zapobiegając proteolitycznej aktywacji białka kolca. W porównaniu z alternatywnymi inhibitorami i podejściami do problemu inhibicji, każde z nich ma swoje wady i zalety, ale wszystkie trzy osiągnęły znaczącą skuteczność w zakresach od nanomolarnego do niskiego- μ M. Połączenie strategii nakierowanych na komórki gospodarza z innymi lekami przeciwwirusowymi oraz ich dalsze udoskonalanie może przynieść liczne korzyści w walce z obecnymi i nowo pojawiającymi się wirusami, od grypy po koronawirusy. Dalsze badania nad lekami przeciwwirusowymi ukierunkowanymi na komórki gospodarza są nie tylko ekscytujące z naukowego punktu widzenia, ale także kluczowe na wypadek nowej pandemii.

8. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że:

1. Hamowanie procesu wnikania wirusów do wnętrza komórki za pomocą VTAs, np. CBD-NLPZ, jak i HTAs, np. TMPRSS2-specyficzne ASO oraz koniugaty erlotynibu z resztami organometalicznymi, są skuteczną nową strategią przeciwwirusową przeciwko nowo pojawiającym się wirusom, takim jak wirusy grypy typu A oraz SARS-CoV-2.
2. Modyfikacje znanych związków przeciwwirusowych poprzez dodanie NLPZ czy też reszt organometalicznych prowadzą do otrzymania nowych związków o większym potencjale przeciwwirusowym, szerszym spektrum działania i nowych właściwościach oraz o nieznanych dotąd mechanizmach działania.
3. TMPRSS2 stanowi interesujący cel do opracowywania nowych skutecznych strategii przeciwwirusowych, przeciwko nowo pojawiającym się wirusom wywołującym potencjalne epidemie/pandemie, opartych o kwasy nukleinowe, takich jak ASO.
4. Inhibicja aktywności EGFR pośrednio prowadzi do hamowania TMPRSS2-zależnego cięcia proteolitycznego białka kolca SARS-CoV-2, tym samym wskazując na bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy EGFR a TMPRSS2.

9. Wykaz skrótów

ACE2 – druga konwertaza angiotensyny (ang. *angiotensin convertase enzyme*)

AIDS – zespół nabytego niedoboru odporności (ang. *acquired immune deficiency syndrome*)

AKT – kinaza białkowa B

ARDS – zespół ostrej niewydolności oddechowej (ang. *acute respiratory distress syndrome*)

ARE – element odpowiedzi na androgeny (ang. *androgen response element*)

ASO – oligonukleotyd antysensowy (ang. *antisense oligonucleotide*)

Białko E – białko otoczki (ang. *envelope protein*)

Białko M – białko błony (ang. *membrane protein*)

Białko N – białko nukleokapsydu (ang. *nucleocapsid protein*)

Białko NSP – białko niestrukturalne (ang. *non-structural protein*)

Białko S – białko kolca (ang. *spike protein*)

Cas – białka powiązane z CRISPR (ang. *CRISPR-associated protein*)

CBD – kannabidiol (ang. *cannabidiol*)

CME – endocytoza zależna od klatryny (ang. *clathrin-mediated endocytosis*)

CMEV – endocytoza zależna od kaweoliny (ang. *caveolin-mediated endocytosis*)

COPI – kompleks białek opłaszczających (ang. *coat protein complex I*)

COVID-19 – choroba wywołana przez SARS-CoV-2 (ang. *Coronavirus Disease 2019*)

CRISPR – regularnie rozdzielone, krótkie, palindromiczne powtórzenia skupione w klastrach (ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)

CRL4 – ligaza ubikwitynowa typu E3 CRL4 (ang. *cullin-RING ligase 4*)

cRNA – komplementarny RNA (ang. *complementary RNA*)

CRYO-EM – krio-mikroskopia elektronowa (ang. *cryo-electron microscopy*)

CTD – domena C-końcowa (ang. *C-terminal domain*)

DC-SIGN – lektyna typu C swoista dla komórek dendrytycznych

DCAF1 – czynnik 1 związany z kompleksem DDB1-Cul4 (ang. *DDB1-Cul4-associated factor 1*)

EGFR – receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*)

ENaC – nabłonkowy kanał sodowy ENaC (ang. *epithelial sodium channel*)

EPN1 – epsyna 1 (ang. *epsin-1*)

ER – retikulum endoplazmatyczne (ang. *endoplasmic reticulum*)

ERCIG – przedział pośredni pomiędzy retikulum endoplazmatycznym a aparatem Golgiego (ang. *endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment*)

FDA – Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*)

FIPV – wirus zakaźnego zapalenia otrzewnej kotów (ang. *feline infectious peritonitis virus*)

FN1 – fibronektyna (ang. *fibronectin*)

FP – peptyd fuzyjny (ang. *fusion peptide*)

GISRS – Globalny System Nadzoru i Reagowania na Grypę (ang. *Global Influenza Surveillance and Response System*)

GUS – Główny Urząd Statystyczny

HA – hemaglutynina

HAT – ludzka trypsynopodobna proteaza dróg oddechowych (ang. *human airway trypsin-like protease*)

HCoV – ludzki koronawirus (ang. *human coronavirus*)

HCV – wirus zapalenia wątroby typu C (ang. *hepatitis C virus*)

HEF – hemaglutynino-esteraza

HGFA – aktywator czynnika wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor activator*)

HI – testy inhibicji hemaglutynacji (ang. *hemagglutination inhibition*)

HIV – ludzki wirus niedoboru odporności (ang. *human immunodeficiency virus*)

HPAI – wysoce zjadliwa grypa ptaków (ang. *highly pathogenic avian influenza*)

HR1 – powtórzenia heptapeptydu 1 (ang. *heptad repeat 1*)

HR2 – powtórzenia heptapeptydu 2 (ang. *heptad repeat 2*)

HSV – wirus opryszczki pospolitej (ang. *herpes simplex virus*)

HTA – przeciwwirusowe środki ukierunkowane na czynniki komórki gospodarza (ang. *host-targeting antivirals*)

IAV – wirus grypy typu A (ang. *influenza A virus*)

IBV – wirus zakaźnego zapalenia oskrzeli drobiu (ang. *avian infectious bronchitis virus*)

ICAM-3 – cząsteczka adhezji międzykomórkowej 3 (ang. *intercellular adhesion molecule 3*)

ICV – wirus grypy typu C (ang. *influenza C virus*)

IDV – wirus grypy typu D (ang. *influenza D virus*)

ILO – Międzynarodowa Organizacja Pracy

IMPDH – dehydrogenaza monofosforanu inozyny (ang. *inosine monophosphate dehydrogenase*)

ISG – geny stymulowane interferonem (ang. *interferon-stimulated genes*)

L-SIGN – lektyna typu C wątrobowo-limfatyczna

LNA – modyfikowane kwasy nukleinowe o usztywnionej konformacji (ang. *locked nucleic acid*)

LPAI – nisko zjadliwa grypa ptaków (ang. *low pathogenic avian influenza*)

MDCK – komórki nabłonka nerki psa (ang. *madin-darby canine kidney epithelial cells*)

MERS – bliskowschodni zespół niewydolności oddechowej (ang. *middle east respiratory syndrome*)

MERS-CoV – koronawirus bliskowschodniego zespołu niewydolności oddechowej (ang. *middle east respiratory syndrome coronavirus*)

miRNA – mikro RNA

MP – makropinocytoza (ang. *macropinocytosis*)

mRNA – informacyjny RNA (ang. *messenger RNA*)

MSPL – duża forma mozaikowej proteazy serynowej (ang. *mosaic serine protease large form*)

NA – neuraminidaza

NAI – test inhibicji neuraminidazy (ang. *neuraminidase inhibition*)

NCL – nukleolina powierzchniowa komórki (ang. *surface nucleolin*)

NLS – sygnał lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization signals*)

NP – nukleoproteina

NPC – kompleks poru jądrowego (ang. *nuclear pore complex*)

NRP1 – neuropilina-1

NSAID – niesteroidowe leki przeciwzapalne (ang. *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*)

NTD – domena N-końcowa (ang. *N-terminal domain*)

ORF – otwarta ramka odczytu (ang. *open reading frame*)

PA – polimeraza kwasowa (ang. *polymerase acidic*)

PAR-2 – receptor aktywowany proteazą typu 2 (ang. *protease-activated receptor 2, PAR-2*)

PB1 – polimeraza podstawowa 1 (ang. *polymerase basic 1*)

PB2 – polimeraza podstawowa 2 (ang. *polymerase basic 2*)

PDCoV – świński deltakoronawirus (ang. *porcine deltacoronavirus*)

PEPD – prolidaza (ang. *prolidase*)

PI3K – kinaza fosfatydyloinozytolu 3 (ang. *phosphoinositide 3-kinase*)

PLD – fosfolipaza D (ang. *phospholipase D*)

POChP – przewlekła obturacyjna choroba płuc

R – domena wiążąca receptor (ang. *receptor-binding subdomain*)

RBD – domena wiążąca receptor (ang. *receptor binding domain*)

RBM – motyw wiążący receptor (ang. *receptor binding motif*)

RISC – kompleks wyciszania indukowanego RNA (ang. *RNA-induced silencing complex*)

RNA – kwas rybonukleinowy (ang. *ribonucleic acid*)

RT-PCR – reakcja odwrotnej transkrypcji połączona z reakcją łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *reverse transcription-polymerase chain reaction*)

RTC – kompleks replikacji i transkrypcji (ang. *replication-transcription complex*)

SARS – ciężki ostry zespół oddechowy (ang. *severe acute respiratory syndrome*)

SARS-CoV-1 – koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego 1 (ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 1*)

SARS-CoV-2 – koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego 2 (ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)

SHAPE – selektywna acylacja grupy 2'-hydroksylowej analizowana w reakcji wydłużania starterów (ang. *selective 2' hydroxyl acylation analyzed by primer extension*)

siRNA – małe interferujące RNA (ang. *small interfering RNA*)

SRCR – domena SRCR (ang. *scavenger receptor cysteine-rich*)

SRP – cząsteczka rozpoznająca sygnał (ang. *signal recognition particle*)

SV40 – małpi wirus 40 (ang. *simian virus 40*)

SW1 – koronawirus wieloryba białego (ang. *beluga whale coronavirus*)

TMPRSS2 – transbłonowa proteaza serynowa typu 2 (ang. *type II transmembrane serine protease*)

TRS-B – sekwencje regulatorowe transkrypcji (ang. *transcription regulatory sequence body*)

TRS-L – region liderowy (ang. *leader transcription regulatory sequence*)

UTR – region nieulegający translacji (ang. *untranslated region*)

VGCC – zasializowany zależny od napięcia kanał wapniowy (ang. *sialylated voltage-gated calcium channel*)

VOC – wariant alarmowy (ang. *variant of concern*)

vRNP – wirusowy kompleks rybonukleoproteinowy (ang. *viral ribonucleoprotein complex*)

VTa – przeciwwirusowe środki ukierunkowane bezpośrednio na wirusa (ang. *virus-targeting antivirals*)

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

+sgRNA – subgenomowe RNA o dodatniej polarności

-sgRNA – subgenomowe RNA o ujemnej polarności

10. Bibliografia

1. World Health Organization. The top 10 causes of death [Internet]. Geneva: WHO; 2020 [cited 2025 Jul 14]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
2. Bakhodirovna, M. D., & Taxirovich, A. S. (2024). CHARACTERISTICS OF RHINOVIRUS INFECTION. *International journal of medical sciences*, 4(08), 55-59.
3. World Health Organization. HIV/AIDS [Internet]. Geneva: WHO; 2023 [cited 2025 Jul 14]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
4. Wu, Z., Harrich, D., Li, Z., Hu, D., & Li, D. (2021). The unique features of SARS-CoV-2 transmission: Comparison with SARS-CoV, MERS-CoV and 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *Reviews in medical virology*, 31(2), e2171.
5. Państwowa Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna we Wrocławku. Dobre sposoby na zakaźne choroby [Internet]. Wrocław: PSSE; [cited 2025 Jul 14]. Available from: <https://www.gov.pl/web/psse-wloclawek/dobre-sposoby-na-zakazne-choroby2>
6. World Health Organization. Influenza (seasonal) [Internet]. Geneva: WHO; 2023 [cited 2025 Jul 14]. Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
7. Walkowiak, M. P., & Walkowiak, D. (2023). From respiratory diseases to nervous system disorders: Unraveling the certified causes of influenza-associated deaths in Poland from 2000 to 2019. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 17(11), e13214.
8. Collier L, Oxford J. *Wirusologia: podręcznik dla studentów medycyny, stomatologii i mikrobiologii*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 1996.
9. King, P. T., & Londrigan, S. L. (2021). The 1918 influenza and COVID-19 pandemics: The effect of age on outcomes. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 26(9), 840.
10. Harrington, W. N., Kackos, C. M., & Webby, R. J. (2021). The evolution and future of influenza pandemic preparedness. *Experimental & molecular medicine*, 53(5), 737-749.
11. Kalyar, F., Chen, X., Chughtai, A. A., & MacIntyre, C. R. (2024). Origin of the H1N1 (Russian influenza) pandemic of 1977—A risk assessment using the modified Grunow–Finke tool (mGFT). *Risk Analysis*, 44(11), 2696-2706.
12. McIntosh, K., & Peiris, J. S. M. (2009). Coronaviruses. *Clinical virology*, 1155-1171.

13. Carabelli, A. M., Peacock, T. P., Thorne, L. G., Harvey, W. T., Hughes, J., COVID-19 Genomics UK Consortium de Silva Thushan I. 6, ... & Robertson, D. L. (2023). SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nature Reviews Microbiology*, 21(3), 162-177.
14. Musaeva, T., Fadeev, A., Pisareva, M., Eder, V., Ksenafontov, A., Korzhanova, M., ... & Komissarov, A. (2024). Development of Primer Panels for Whole-Genome Amplification and Sequencing of Human Seasonal Coronaviruses: hCoV-OC43, hCoV-HKU1, hCoV-229E, and hCoV-NL63. *Viruses*, 17(1), 13.
15. World Health Organization. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003 [Internet]. Geneva: WHO; 2015 [cited 2024 Aug 15]. Available from: <https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003>
16. Cheng, V. C., Lau, S. K., Woo, P. C., & Yuen, K. Y. (2007). Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection. *Clinical microbiology reviews*, 20(4), 660-694.
17. World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) [Internet]. Geneva: WHO; [cited 2025 Jul 14]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/mers-cov/en/>
18. Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., ... & Shi, Z. L. (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *nature*, 579(7798), 270-273.
19. Liu, K., Pan, X., Li, L., Yu, F., Zheng, A., Du, P., ... & Wang, Q. (2021). Binding and molecular basis of the bat coronavirus RaTG13 virus to ACE2 in humans and other species. *Cell*, 184(13), 3438-3451.
20. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic [Internet]. Geneva: WHO; [cited 2025 Jul 14]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
21. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny. Strona główna [Internet]. Warszawa: NIZP–PZH; [cited 2024 Apr 16]. Available from: <https://www.pzh.gov.pl/>
22. Lorent, D., Nowak, R., Roxo, C., Lenartowicz, E., Makarewicz, A., Zaremba, B., ... & Zmora, P. (2021). Prevalence of anti-SARS-CoV-2 antibodies in Poznań, Poland, after the first wave of the COVID-19 pandemic. *Vaccines*, 9(6), 541.

23. Sah, P., Fitzpatrick, M. C., Zimmer, C. F., Abdollahi, E., Juden-Kelly, L., Moghadas, S. M., ... & Galvani, A. P. (2021). Asymptomatic SARS-CoV-2 infection: A systematic review and meta-analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(34), e2109229118.
24. International Monetary Fund. World Economic Outlook, October 2021: Recovery During a Pandemic [Internet]. Washington (DC): IMF; 2021 [cited 2025 Jul 14]. Available from: <https://www.imf.org/en/Publications/WEO/Issues/2021/10/12/world-economic-outlook-october-2021>
25. International Air Transport Association. Annual Review [Internet]. Montreal: IATA; [cited 2025 Jul 14]. Available from: <https://www.iata.org/en/publications/annual-review/>
26. World Tourism Organization (UNWTO). Impact assessment of the COVID-19 outbreak on international tourism [Internet]. Madrid: UNWTO; [cited 2025 Jul 14]. Available from: <https://www.unwto.org/impact-assessment-of-the-covid-19-outbreak-on-international-tourism>
27. Centrum Badania Opinii Społecznej. Raporty CBOS [Internet]. Warszawa: CBOS; [cited 2025 Jul 14]. Available from: <https://www.cbos.pl/PL/publikacje/raporty.php>
28. Hawton, K., Lascelles, K., Brand, F., Casey, D., Bale, L., Ness, J., ... & Waters, K. (2021). Self-harm and the COVID-19 pandemic: a study of factors contributing to self-harm during lockdown restrictions. *Journal of psychiatric research*, 137, 437.
29. Hanushek, E. A., & Woessmann, L. (2020). The economic impacts of learning losses.
30. Rzecznik Praw Pacjenta. Koniec stanu zagrożenia epidemicznego [Internet]. Warszawa: gov.pl; 2023 [cited 2025 Jul 14]. Available from: <https://www.gov.pl/web/rpp/koniec-stanu-zagrozenia-epidemicznego>
31. Zahorski, T., & Zendran, I. (2018). Złoty wiek grypy. Krótka historia pandemii.
32. World Health Organization. Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) [Internet]. Geneva: WHO; [cited 2025 Jul 14]. Available from: <https://www.who.int/initiatives/global-influenza-surveillance-and-response-system>
33. Spackman, E. (2020). A brief introduction to avian influenza virus. *Animal influenza virus: Methods and protocols*, 83-92.
34. de Jong, M. D., & Hien, T. T. (2006). Avian influenza A (H5N1). *Journal of clinical virology*, 35(1), 2-13.

35. Tanner, W. D., Toth, D. J. A., & Gundlapalli, A. V. (2015). The pandemic potential of avian influenza A (H7N9) virus: a review. *Epidemiology & Infection*, 143(16), 3359-3374.
36. Spackman, E. (2014). Influenza subtype identification with molecular methods. *Animal Influenza Virus*, 119-123.
37. Tewawong, N., Suwannakarn, K., Prachayangprecha, S., Korkong, S., Vichi wattana, P., Vongpunsawad, S., & Poovorawan, Y. (2015). Molecular epidemiology and phylogenetic analyses of influenza B virus in Thailand during 2010 to 2014. *PloS one*, 10(1), e0116302.
38. Nogales, A., Rodríguez-Sánchez, I., Monte, K., Lenschow, D. J., Perez, D. R., & Martínez-Sobrido, L. (2016). Replication-competent fluorescent-expressing influenza B virus. *Virus research*, 213, 69-81.
39. Matsuzaki, Y., Mizuta, K., Sugawara, K., Tsuchiya, E., Muraki, Y., Hongo, S., ... & Nishimura, H. (2003). Frequent reassortment among influenza C viruses. *Journal of virology*, 77(2), 871-881.
40. Su, S., Fu, X., Li, G., Kerlin, F., & Veit, M. (2017). Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence*, 8(8), 1580-1591.
41. Zmasek, C. M., Lefkowitz, E. J., Niewiadomska, A., & Scheuermann, R. H. (2022). Genomic evolution of the Coronaviridae family. *Virology*, 570, 123-133.
42. Tregoning, J. S., Flight, K. E., Higham, S. L., Wang, Z., & Pierce, B. F. (2021). Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape. *Nature reviews immunology*, 21(10), 626-636.
43. Bertram, S., Glowacka, I., Steffen, I., Köhl, A., & Pöhlmann, S. (2010). Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin. *Reviews in medical virology*, 20(5), 298-310.
44. Mihindukulasuriya, K. A., Wu, G., St. Leger, J., Nordhausen, R. W., & Wang, D. (2008). Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *Journal of virology*, 82(10), 5084-5088.
45. Woo, P. C., Huang, Y., Lau, S. K., & Yuen, K. Y. (2010). Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *viruses*, 2(8).
46. Hu, G., Huang, Y., Chen, Z., Geng, R., Zhao, Z., Peng, O., ... & Zhang, H. (2024). Genomic characterization and tissue tropism variations of two porcine delta

- coronavirus strains isolated in China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1507277.
47. Goździcka-Józefiak A, Barylski J, Broniarczyk J, Durzyńska J, Musidlak O, Nawrot R, et al. *Wirusologia*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2019.
 48. Piekarowicz A. *Podstawy wirusologii molekularnej*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2012. ISBN: 978-83-01-14223-0.
 49. Collier L, Oxford J. *Wirusologia: podręcznik dla studentów medycyny, stomatologii i mikrobiologii*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL; 1996.
 50. Wróblewska M, Dzieciatkowski T, editors. *Choroby wirusowe w praktyce klinicznej*. Warszawa: PZWL Wydawnictwo Lekarskie; 2017.
 51. Howley PM, Knipe DM, Whelan S, editors. *Fields Virology: Emerging Viruses*. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2020. ISBN: 978-1-9751-1254-7.
 52. Howley PM, Knipe DM, Whelan S, Freed EO, Cohen JL, editors. *Fields Virology: RNA Viruses*. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2022. ISBN: 978-1-9751-1260-8.
 53. Słońska, A., Cymerys, J., & Bańbura, M. W. (2016). Mechanizmy endocytozy wykorzystywane przez wirusy podczas zakażenia. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej*, 70.
 54. Wu, W. W., Sun, Y. H. B., & Panté, N. (2007). Nuclear import of influenza A viral ribonucleoprotein complexes is mediated by two nuclear localization sequences on viral nucleoprotein. *Virology journal*, 4(1), 49.
 55. Cros, J. F., & Palese, P. (2003). Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus research*, 95(1-2), 3-12.
 56. Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, 23(1), 3-20.
 57. Lei, J., Kusov, Y., & Hilgenfeld, R. (2018). Nsp3 of coronaviruses: Structures and functions of a large multi-domain protein. *Antiviral research*, 149, 58-74.
 58. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 155-170.
 59. Fournier, E., Moules, V., Essere, B., Paillart, J. C., Sirbat, J. D., Isel, C., ... & Marquet, R. (2012). A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments. *Nucleic acids research*, 40(5), 2197-2209.

60. Goto, H., Muramoto, Y., Noda, T., & Kawaoka, Y. (2013). The genome-packaging signal of the influenza A virus genome comprises a genome incorporation signal and a genome-bundling signal. *Journal of virology*, 87(21), 11316-11322.
61. Rossman, J. S., Jing, X., Leser, G. P., & Lamb, R. A. (2010). Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell*, 142(6), 902-913.
62. Chaimayo, C., Hayashi, T., Underwood, A., Hodges, E., & Takimoto, T. (2017). Selective incorporation of vRNP into influenza A virions determined by its specific interaction with M1 protein. *Virology*, 505, 23-32.
63. Carter, T., & Iqbal, M. (2024). The influenza a virus replication cycle: a comprehensive review. *Viruses*, 16(2), 316.
64. Shaw, M. L., Stone, K. L., Colangelo, C. M., Gulcicek, E. E., & Palese, P. (2008). Cellular proteins in influenza virus particles. *PLoS pathogens*, 4(6), e1000085.
65. Nakatsu, S., Sagara, H., Sakai-Tagawa, Y., Sugaya, N., Noda, T., & Kawaoka, Y. (2016). Complete and incomplete genome packaging of influenza A and B viruses. *MBio*, 7(5), 10-1128.
66. Cao, Y., Yang, R., Lee, I., Zhang, W., Sun, J., Wang, W., & Meng, X. (2021). Characterization of the SARS-CoV-2 E protein: sequence, structure, viroporin, and inhibitors. *Protein Science*, 30(6), 1114-1130.
67. Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S., & Crispin, M. (2020). Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*, 369(6501), 330-333.
68. Tan, Q., Fu, J., Liu, Z., Deng, H., Zhang, L., He, J., ... & Fu, J. (2023). Impacts of transmembrane serine protease 4 expression on susceptibility to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Chinese Medical Journal*, 136(07), 860-862.
69. Zmora, P., Hoffmann, M., Kollmus, H., Moldenhauer, A. S., Danov, O., Braun, A., ... & Pöhlmann, S. (2018). TMPRSS11A activates the influenza A virus hemagglutinin and the MERS coronavirus spike protein and is insensitive against blockade by HAI-1. *Journal of Biological Chemistry*, 293(36), 13863-13873.
70. Zmora, P., Blazejewski, P., Moldenhauer, A. S., Welsch, K., Nehlmeier, I., Wu, Q., ... & Bertram, S. (2014). DESC1 and MSPL activate influenza A viruses and emerging coronaviruses for host cell entry. *Journal of virology*, 88(20), 12087-12097.
71. Zmora, P., Moldenhauer, A. S., Hofmann-Winkler, H., & Pöhlmann, S. (2015). TMPRSS2 isoform 1 activates respiratory viruses and is expressed in viral target cells. *PloS one*, 10(9), e0138380.

72. Simmons, G., Zmora, P., Gierer, S., Heurich, A., & Pöhlmann, S. (2013). Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research. *Antiviral research*, 100(3), 605-614.
73. Jawad, B., Adhikari, P., Podgornik, R., & Ching, W. Y. (2021). Key interacting residues between RBD of SARS-CoV-2 and ACE2 receptor: combination of molecular dynamics simulation and density functional calculation. *Journal of chemical information and modeling*, 61(9), 4425-4441.
74. Bestle, D., Heindl, M. R., Limburg, H., Pilgram, O., Moulton, H., Stein, D. A., ... & Böttcher-Friebertshäuser, E. (2020). TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life science alliance*, 3(9).
75. Winger, A., & Caspari, T. (2021). The spike of concern—the novel variants of SARS-CoV-2. *Viruses*, 13(6), 1002.
76. Gamblin, S. J., Vachieri, S. G., Xiong, X., Zhang, J., Martin, S. R., & Skehel, J. J. (2021). Hemagglutinin structure and activities. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 11(10), a038638.
77. Wu, N. C., & Wilson, I. A. (2020). Structural biology of influenza hemagglutinin: An amaranthine adventure. *Viruses*, 12(9), 1053.
78. Wang, W., DeFeo, C. J., Alvarado-Facundo, E., Vassell, R., & Weiss, C. D. (2015). Intermonomer interactions in hemagglutinin subunits HA1 and HA2 affecting hemagglutinin stability and influenza virus infectivity. *Journal of Virology*, 89(20), 10602-10611.
79. Böttcher-Friebertshäuser, E., Klenk, H. D., & Garten, W. (2013). Activation of influenza viruses by proteases from host cells and bacteria in the human airway epithelium. *Pathogens and disease*, 69(2), 87-100.
80. Luczo, J. M., Stambas, J., Durr, P. A., Michalski, W. P., & Bingham, J. (2015). Molecular pathogenesis of H5 highly pathogenic avian influenza: the role of the haemagglutinin cleavage site motif. *Reviews in medical virology*, 25(6), 406-430.
81. Bugge, T. H., Antalis, T. M., & Wu, Q. (2009). Type II transmembrane serine proteases. *Journal of Biological Chemistry*, 284(35), 23177-23181.
82. Hussain, M., Jabeen, N., Amanullah, A., Baig, A. A., Aziz, B., Shabbir, S., ... & Uddin, N. (2020). Molecular docking between human TMPRSS2 and SARS-CoV-2 spike protein: conformation and intermolecular interactions. *AIMS microbiology*, 6(3), 350.

83. Wettstein, L., Kirchhoff, F., & Münch, J. (2022). The transmembrane protease TMPRSS2 as a therapeutic target for COVID-19 treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1351.
84. Lin, B., Ferguson, C., White, J. T., Wang, S., Vessella, R., True, L. D., ... & Nelson, P. S. (1999). Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *Cancer research*, 59(17), 4180-4184.
85. Schwerdtner, M., Schmacke, L. C., Nave, J., Limburg, H., Steinmetzer, T., Stein, D. A., ... & Böttcher-Friebertshäuser, E. (2024). Unveiling the Role of TMPRSS2 in the Proteolytic Activation of Pandemic and Zoonotic Influenza Viruses and Coronaviruses in Human Airway Cells. *Viruses*, 16(11), 1798.
86. Heindl, M. R., Rupp, A. L., Schwerdtner, M., Bestle, D., Harbig, A., De Rocher, A., ... & Böttcher-Friebertshäuser, E. (2024). ACE2 acts as a novel regulator of TMPRSS2-catalyzed proteolytic activation of influenza A virus in airway cells. *Journal of Virology*, 98(4), e00102-24.
87. Lou, Z., Sun, Y., & Rao, Z. (2014). Current progress in antiviral strategies. *Trends in pharmacological sciences*, 35(2), 86-102.
88. Simonsen, L., Viboud, C., Grenfell, B. T., Dushoff, J., Jennings, L., Smit, M., ... & Holmes, E. C. (2007). The genesis and spread of reassortment human influenza A/H3N2 viruses conferring adamantane resistance. *Molecular biology and evolution*, 24(8), 1811-1820.
89. Burke, J. D., & Fish, E. N. (2009). Antiviral strategies: the present and beyond. *Current Molecular Pharmacology*, 2(1), 32-39.
90. Crooke, S. T., Baker, B. F., Crooke, R. M., & Liang, X. H. (2021). Antisense technology: an overview and prospectus. *Nature reviews Drug discovery*, 20(6), 427-453.
91. Bajan, S., & Hutvagner, G. (2020). RNA-based therapeutics: from antisense oligonucleotides to miRNAs. *Cells*, 9(1), 137.
92. Yadavalli, T., Volety, I., & Shukla, D. (2021). Aptamers in virology—A Consolidated review of the most recent advancements in diagnosis and therapy. *Pharmaceutics*, 13(10), 1646.
93. Haley, B., & Zamore, P. D. (2004). Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nature structural & molecular biology*, 11(7), 599-606.

94. Rosa, C., Kuo, Y. W., Wuriyanghan, H., & Falk, B. W. (2018). RNA interference mechanisms and applications in plant pathology. *Annual review of phytopathology*, 56(1), 581-610.
95. Huang, D. T. N., Lu, C. Y., Shao, P. L., Chang, L. Y., Wang, J. Y., Chang, Y. H., ... & Huang, L. M. (2017). In vivo inhibition of influenza A virus replication by RNA interference targeting the PB2 subunit via intratracheal delivery. *PloS one*, 12(4), e0174523.
96. Ge, Q., McManus, M. T., Nguyen, T., Shen, C. H., Sharp, P. A., Eisen, H. N., & Chen, J. (2003). RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2718-2723.
97. Jonas, S., & Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature reviews genetics*, 16(7), 421-433.
98. Berkhout, B., & Haasnoot, J. (2006). The interplay between virus infection and the cellular RNA interference machinery. *FEBS letters*, 580(12), 2896-2902.
99. Ingle, H., Kumar, S., Raut, A. A., Mishra, A., Kulkarni, D. D., Kameyama, T., ... & Kumar, H. (2015). The microRNA miR-485 targets host and influenza virus transcripts to regulate antiviral immunity and restrict viral replication. *Science signaling*, 8(406), ra126-ra126.
100. Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C. S., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of molecular evolution*, 60(2), 174-182.
101. Escalona-Noguero, C., López-Valls, M., & Sot, B. (2021). CRISPR/Cas technology as a promising weapon to combat viral infections. *Bioessays*, 43(4), 2000315.
102. Li, H., Wang, S., Dong, X., Li, Q., Li, M., Li, J., ... & Kou, Z. (2020). CRISPR-Cas13a cleavage of dengue virus NS3 gene efficiently inhibits viral replication. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 19, 1460-1469.
103. Han, J., Perez, J. T., Chen, C., Li, Y., Benitez, A., Kandasamy, M., ... & Manicassamy, B. (2018). Genome-wide CRISPR/Cas9 screen identifies host factors essential for influenza virus replication. *Cell reports*, 23(2), 596-607.
104. Martin, D. E., & Tripp, R. A. (2024). Host-directed antiviral therapeutics and the NIAID research agenda: an underexplored frontier. *Frontiers in Virology*, 4, 1458112.

105. He, Y., Zhou, J., Gao, H., Liu, C., Zhan, P., & Liu, X. (2024). Broad-spectrum antiviral strategy: host-targeting antivirals against emerging and re-emerging viruses. *European journal of medicinal chemistry*, 265, 116069.
106. Bonomini, A., Mercorelli, B., & Loregian, A. (2025). Antiviral strategies against influenza virus: An update on approved and innovative therapeutic approaches. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 82(1), 75.
107. Chitalia, V. C., & Munawar, A. H. (2020). A painful lesson from the COVID-19 pandemic: the need for broad-spectrum, host-directed antivirals. *Journal of translational medicine*, 18(1), 390.
108. Lin, K., & Gallay, P. (2013). Curing a viral infection by targeting the host: the example of cyclophilin inhibitors. *Antiviral research*, 99(1), 68-77.
109. Wagoner, J., Herring, S., Hsiang, T. Y., Ianevski, A., Biering, S. B., Xu, S., ... & Polyak, S. J. (2022). Combinations of host-and virus-targeting antiviral drugs confer synergistic suppression of SARS-CoV-2. *Microbiology spectrum*, 10(5), e03331-22.
110. Sure, F., Bertog, M., Afonso, S., Diakov, A., Rinke, R., Madej, M. G., ... & Ilyaskin, A. V. (2022). Transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2) proteolytically activates the epithelial sodium channel (ENaC) by cleaving the channel's γ -subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 298(6), 102004.
111. Kim, T. S., Heinlein, C., Hackman, R. C., & Nelson, P. S. (2006). Phenotypic analysis of mice lacking the Tmprss2-encoded protease. *Molecular and cellular biology*, 26(3), 965-975.
112. Kodama, K., Imai, T., Asai, Y., Kozu, Y., Hayashi, K., Shimizu, T., ... & Ootsuka, S. (2022). Incidence and risk factors for hyperkalaemia in patients treated for COVID-19 with nafamostat mesylate. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 47(7), 1070-1078.
113. Kim, T. S., Heinlein, C., Hackman, R. C., & Nelson, P. S. (2006). Phenotypic analysis of mice lacking the Tmprss2-encoded protease. *Molecular and cellular biology*, 26(3), 965-975.
114. Iwata-Yoshikawa, N., Kakizaki, M., Shiwa-Sudo, N., Okura, T., Tahara, M., Fukushi, S., ... & Takeda, M. (2022). Essential role of TMPRSS2 in SARS-CoV-2 infection in murine airways. *Nature Communications*, 13(1), 6100.
115. Redondo-Calvo, F. J., Padín, J. F., Muñoz-Rodríguez, J. R., Serrano-Oviedo, L., López-Juárez, P., Porras Leal, M. L., ... & Martínez Alarcón, J. (2022). Aprotinin

- treatment against SARS-CoV-2: a randomized phase III study to evaluate the safety and efficacy of a pan-protease inhibitor for moderate COVID-19. *European Journal of Clinical Investigation*, 52(6), e13776.
116. Mikhaylov, E. N., Lyubimtseva, T. A., Vakhrushev, A. D., Stepanov, D., Lebedev, D. S., Vasilieva, E. Y., ... & Shlyakhto, E. V. (2022). Bromhexine Hydrochloride Prophylaxis of COVID-19 for Medical Personnel: A Randomized Open-Label Study. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2022(1), 4693121.
 117. Tolouian, R., & Mulla, Z. (2021). Controversy with bromhexine in COVID-19; where we stand. *Immunopathol Persa*, 7(2), e12.
 118. Habtemariam, S., Nabavi, S. F., Ghavami, S., Cismaru, C. A., Berindan-Neagoe, I., & Nabavi, S. M. (2020). Possible use of the mucolytic drug, bromhexine hydrochloride, as a prophylactic agent against SARS-CoV-2 infection based on its action on the Transmembrane Serine Protease 2. *Pharmacological Research*, 157, 104853.
 119. Yamaya, M., Shimotai, Y., Hatachi, Y., Kalonji, N. L., Tando, Y., Kitajima, Y., ... & Nishimura, H. (2015). The serine protease inhibitor camostat inhibits influenza virus replication and cytokine production in primary cultures of human tracheal epithelial cells. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*, 33, 66-74.
 120. Shrimp, J. H., Kales, S. C., Sanderson, P. E., Simeonov, A., Shen, M., & Hall, M. D. (2020). An enzymatic TMPRSS2 assay for assessment of clinical candidates and discovery of inhibitors as potential treatment of COVID-19. *ACS pharmacology & translational science*, 3(5), 997-1007.
 121. Fraser, B., Young, N., Bender, B., Gahbauer, S., Ilyasov, O., Wilson, R., ... & Arrowsmith, C. (2024). Large library docking and biophysical analysis of small molecule TMPRSS2 inhibitors.
 122. Chen, Y., Lear, T. B., Evankovich, J. W., Larsen, M. B., Lin, B., Alfaras, I., ... & Chen, B. B. (2021). A high-throughput screen for TMPRSS2 expression identifies FDA-approved compounds that can limit SARS-CoV-2 entry. *Nature communications*, 12(1), 3907.
 123. Shapira, T., Monreal, I. A., Dion, S. P., Buchholz, D. W., Imbiakha, B., Olmstead, A. D., ... & Jean, F. (2022). A TMPRSS2 inhibitor acts as a pan-SARS-CoV-2 prophylactic and therapeutic. *Nature*, 605(7909), 340-348.

124. Mahoney, M., Damalanka, V. C., Tartell, M. A., Chung, D. H., Lourenço, A. L., Pwee, D., ... & Janetka, J. W. (2021). A novel class of TMPRSS2 inhibitors potentially block SARS-CoV-2 and MERS-CoV viral entry and protect human epithelial lung cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(43), e2108728118.
125. Žigayová, D., Mikušová, V., & Mikuš, P. (2023). Advances in antiviral delivery systems and chitosan-based polymeric and nanoparticulate antivirals and antiviral carriers. *Viruses*, 15(3), 647.
126. Tarn, W. Y., Cheng, Y., Ko, S. H., & Huang, L. M. (2021). Antisense oligonucleotide-based therapy of viral infections. *Pharmaceutics*, 13(12), 2015.
127. Razzaq, A., Disoma, C., Zhou, Y., Tao, S., Chen, Z., Liu, S., ... & Xia, Z. (2024). Targeting epidermal growth factor receptor signalling pathway: a promising therapeutic option for COVID-19. *Reviews in Medical Virology*, 34(1), e2500.
128. Saviano, A., Habersetzer, F., Lupberger, J., Simo-Noumbissie, P., Schuster, C., Doffoël, M., ... & Baumert, T. F. (2022). Safety and antiviral activity of EGFR inhibition by erlotinib in chronic hepatitis C patients: A phase Ib randomized controlled trial. *Clinical and translational gastroenterology*, 13(6), e00492.
129. Chen, Z., Wei, X., Zheng, Y., Zhang, Z., Gu, W., Liao, W., ... & Xu, W. (2023). Targeted co-delivery of curcumin and erlotinib by MoS₂ nanosheets for the combination of synergetic chemotherapy and photothermal therapy of lung cancer. *Journal of nanobiotechnology*, 21(1), 333.
130. Karim, M., Saul, S., Ghita, L., Sahoo, M. K., Ye, C., Bhalla, N., ... & Einav, S. (2022). Numb-associated kinases are required for SARS-CoV-2 infection and are cellular targets for antiviral strategies. *Antiviral Research*, 204, 105367.
131. Bowden-Reid, E., Moles, E., Kelleher, A., & Ahlenstiel, C. (2025). Harnessing antiviral RNAi therapeutics for pandemic viruses: SARS-CoV-2 and HIV. *Drug Delivery and Translational Research*, 1-22.
132. Böttcher-Friebertshäuser, E., Stein, D. A., Klenk, H. D., & Garten, W. (2011). Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2. *Journal of virology*, 85(4), 1554-1562.
133. Qiao, Y., Wotring, J. W., Zhang, C. J., Jiang, X., Xiao, L., Watt, A., ... & Chinnaiyan, A. M. (2023). Antisense oligonucleotides to therapeutically target SARS-CoV-2 infection. *PloS one*, 18(2), e0281281.

134. Lenartowicz, E., Nogales, A., Kierzek, E., Kierzek, R., Martínez-Sobrido, L., & Turner, D. H. (2016). Antisense oligonucleotides targeting influenza A segment 8 genomic RNA inhibit viral replication. *Nucleic acid therapeutics*, 26(5), 277-285.
135. Michalak, P., Soszynska-Jozwiak, M., Biala, E., Moss, W. N., Keszy, J., Szutkowska, B., ... & Kierzek, E. (2019). Secondary structure of the segment 5 genomic RNA of influenza A virus and its application for designing antisense oligonucleotides. *Scientific reports*, 9(1), 3801.
136. Piasecka, J., Lenartowicz, E., Soszynska-Jozwiak, M., Szutkowska, B., Kierzek, R., & Kierzek, E. (2020). RNA secondary structure motifs of the influenza A virus as targets for siRNA-mediated RNA interference. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 19, 627-642.
137. White, K. M., Rosales, R., Yildiz, S., Kehrer, T., Miorin, L., Moreno, E., ... & García-Sastre, A. (2021). Plitidepsin has potent preclinical efficacy against SARS-CoV-2 by targeting the host protein eEF1A. *Science*, 371(6532), 926-931.
138. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., & Pöhlmann, S. (2020). A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Molecular cell*, 78(4), 779-784.
139. Essalmani, R., Jain, J., Susan-Resiga, D., Andréo, U., Evagelidis, A., Derbali, R. M., ... & Seidah, N. G. (2022). Distinctive roles of furin and TMPRSS2 in SARS-CoV-2 infectivity. *Journal of virology*, 96(8), e00128-22.
140. Belouzard, S., Chu, V. C., & Whittaker, G. R. (2009). Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), 5871-5876.
141. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Graichen, L., Nehlmeier, I., Kempf, A., Moldenhauer, A. S., ... & Pöhlmann, S. (2024). Acquisition of a multibasic cleavage site does not increase MERS-CoV entry into Calu-3 human lung cells. *Journal of Virology*, 98(11), e01305-24.
142. Luczo, J. M., & Spackman, E. (2025). Molecular evolution of the H5 and H7 highly pathogenic avian influenza virus haemagglutinin cleavage site motif. *Reviews in Medical Virology*, 35(1), e70012.
143. Cai, Y., Zhang, J., Xiao, T., Peng, H., Sterling, S. M., Walsh Jr, R. M., ... & Chen, B. (2020). Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science*, 369(6511), 1586-1592.

144. Ray, D., Le, L., & Andricioaei, I. (2021). Distant residues modulate conformational opening in SARS-CoV-2 spike protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(43), e2100943118.
145. Zhang, H., Lv, P., Jiang, J., Liu, Y., Yan, R., Shu, S., ... & Li, Y. (2023). Advances in developing ACE2 derivatives against SARS-CoV-2. *The Lancet Microbe*, 4(5), e369-e378.
146. Jamison Jr, D. A., Anand Narayanan, S., Trovão, N. S., Guarnieri, J. W., Topper, M. J., Moraes-Vieira, P. M., ... & Beheshti, A. (2022). A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, Part 1: Intracellular overdrive for SARS-CoV-2 infection. *European Journal of Human Genetics*, 30(8), 889-898.
147. Von Delft, A., Hall, M. D., Kwong, A. D., Purcell, L. A., Saikatendu, K. S., Schmitz, U., ... & Lee, A. A. (2023). Accelerating antiviral drug discovery: lessons from COVID-19. *Nature Reviews Drug Discovery*, 22(7), 585-603.
148. Cross, K. J., Langley, W. A., Russell, R. J., Skehel, J. J., & Steinhauer, D. A. (2009). Composition and functions of the influenza fusion peptide. *Protein and peptide letters*, 16(7), 766-778.
149. Bolland, W. (2025). SARS-CoV-2 Spike Membrane Fusion. <https://app.biorender.com/biorender-templates/details/t-66856a932fc1434c679a8af0-sars-cov-2-spike-membrane-fusion>
150. Ma, Q., Liu, J., Liu, Q., Kang, L., Liu, R., Jing, W., ... & Liu, M. (2021). Global percentage of asymptomatic SARS-CoV-2 infections among the tested population and individuals with confirmed COVID-19 diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *JAMA network open*, 4(12), e2137257-e2137257.
151. World Health Organization. Consensus document on the epidemiology of severe acute respiratory syndrome (SARS) [Internet]. Geneva: WHO; 2003 [cited 2025 Aug 14]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/70863>
152. El-Saed, A., Othman, F., Baffoe-Bonnie, H., Almulhem, R., Matalqah, M., Alshammari, L., & Alshamrani, M. M. (2023). Symptomatic MERS-CoV infection reduces the risk of future COVID-19 disease; a retrospective cohort study. *BMC Infectious Diseases*, 23(1), 757.
153. Prill, M. M., Iwane, M. K., Edwards, K. M., Williams, J. V., Weinberg, G. A., Staat, M. A., ... & New Vaccine Surveillance Network. (2012). Human coronavirus in young children hospitalized for acute respiratory illness and asymptomatic controls. *The Pediatric infectious disease journal*, 31(3), 235-240.

154. The Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team. The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) — China, 2020 [Internet]. China CDC Weekly. 2020;2(8):113-122 [cited 2025 Aug 14]. Available from: <http://weekly.chinacdc.cn/en/article/id/e53946e2-c6c4-41e9-9a9b-fea8db1a8f51>
155. Lew, T. W., Kwek, T. K., Tai, D., Earnest, A., Loo, S., Singh, K., ... & Goh, S. K. (2003). Acute respiratory distress syndrome in critically ill patients with severe acute respiratory syndrome. *Jama*, 290(3), 374-380.
156. Matsuyama, R., Nishiura, H., Kutsuna, S., Hayakawa, K., & Ohmagari, N. (2016). Clinical determinants of the severity of Middle East respiratory syndrome (MERS): a systematic review and meta-analysis. *BMC public health*, 16(1), 1203.
157. Walsh, E. E., Shin, J. H., & Falsey, A. R. (2013). Clinical impact of human coronaviruses 229E and OC43 infection in diverse adult populations. *The Journal of infectious diseases*, 208(10), 1634-1642.
158. Idris, A., Davis, A., Supramaniam, A., Acharya, D., Kelly, G., Tayyar, Y., ... & Morris, K. V. (2021). A SARS-CoV-2 targeted siRNA-nanoparticle therapy for COVID-19. *Molecular Therapy*, 29(7), 2219-2226.
159. Moss, R. B., Hansen, C., Sanders, R. L., Hawley, S., Li, T., & Steigbigel, R. T. (2012). A phase II study of DAS181, a novel host directed antiviral for the treatment of influenza infection. *The Journal of infectious diseases*, 206(12), 1844-1851.
160. Fraser, B. J., Beldar, S., Seitova, A., Hutchinson, A., Mannar, D., Li, Y., ... & Bénard, F. (2022). Structure and activity of human TMPRSS2 protease implicated in SARS-CoV-2 activation. *Nature chemical biology*, 18(9), 963-971.
161. Nimishakavi, S., Raymond, W. W., Gruenert, D. C., & Caughey, G. H. (2015). Divergent inhibitor susceptibility among airway lumen-accessible tryptic proteases. *PLoS One*, 10(10), e0141169.
162. Hoffmann, M., Hofmann-Winkler, H., Smith, J. C., Krüger, N., Arora, P., Sørensen, L. K., ... & Pöhlmann, S. (2021). Camostat mesylate inhibits SARS-CoV-2 activation by TMPRSS2-related proteases and its metabolite GBPA exerts antiviral activity. *EBioMedicine*, 65.
163. Pawlotsky, J. M. (2020). COVID-19 pandemic: time to revive the cyclophilin inhibitor alisporivir. *Clinical Infectious Diseases*, 71(16), 2191-2194.

164. Zheng, Y., Li, S., Song, K., Ye, J., Li, W., Zhong, Y., ... & Xu, K. (2022). A broad antiviral strategy: inhibitors of human DHODH pave the way for host-targeting antivirals against emerging and re-emerging viruses. *Viruses*, 14(5), 928.
165. Uddin, M. H., Zonder, J. A., & Azmi, A. S. (2020). Exportin 1 inhibition as antiviral therapy. *Drug Discovery Today*, 25(10), 1775-1781.
166. Santer, D. M., Li, D., Ghosheh, Y., Zahoor, M. A., Prajapati, D., Hansen, B. E., ... & Gehring, A. J. (2022). Interferon- λ treatment accelerates SARS-CoV-2 clearance despite age-related delays in the induction of T cell immunity. *Nature Communications*, 13(1), 6992.
167. RECOVERY Collaborative Group. (2021). Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19. *New England journal of medicine*, 384(8), 693-704.
168. Inoue, J., & Yamamoto, M. (2020). Identification of an existing Japanese pancreatitis drug, Nafamostat, which is expected to prevent the transmission of new coronavirus infection (COVID-19). *BioRxiv*.
169. Daly, J. L., Simonetti, B., Klein, K., Chen, K. E., Williamson, M. K., Antón-Plágaro, C., ... & Yamauchi, Y. (2020). Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science*, 370(6518), 861-865.
170. Lempp, F. A., Soriaga, L. B., Montiel-Ruiz, M., Benigni, F., Noack, J., Park, Y. J., ... & Corti, D. (2021). Lectins enhance SARS-CoV-2 infection and influence neutralizing antibodies. *Nature*, 598(7880), 342-347.

11. Załączniki

11.1 Oświadczenia określające wkład w powstanie prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Poznań, 01.09.2024 r.

Mgr inż. Rafał Nowak
Zakład Wirusologii Molekularnej
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

**Oświadczenie kandydata o wkładzie własnym w publikacje
wchodzące w skład rozprawy doktorskiej**

Tytuł publikacji: *Novel Molecular Consortia of Cannabidiol with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Emerging Coronaviruses' Entry.*

Autorzy: Anna Pawełczyk*, **Rafał Nowak ***, Monika Gazecka, Anna Jelińska, Lucjusz Zaprutko, Paweł Zmora.

*równorzędni współautorzy

Czasopismo: „Pathogens”

Data opublikowania: 2023

Oświadczam, że mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: wykonywanie eksperymentów, sporządzanie sprawozdań z badań, analizę wyników i ich interpretację, oraz udział w przygotowaniu pierwotnej wersji artykułu.

Tytuł publikacji: *TMPRSS2-specific antisense oligonucleotides inhibit host cell entry of emerging viruses.*

Autorzy: **Rafał Nowak**, Monika Gazecka, Markus Hoffmann, Ryszard Kierzek, Stefan Pöhlmann, Paweł Zmora.

Czasopismo: „Virology”

Data opublikowania: 2024

Oświadczam, że mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: wykonywanie eksperymentów, sporządzanie sprawozdań z badań, analizę wyników i ich interpretację, udział w przygotowaniu pierwotnej wersji artykułu oraz odpowiedzi dla recenzentów.

Tytuł publikacji: *Organometallic–Erlotinib Conjugates Active against Lung Cancer Cells and as Emerging Virus Entry Inhibitors.*

Autorzy: Przemysław Biegański*, Monika Gazecka*, **Rafał Nowak**, Aleksander Górski, Natalia Dutkiewicz, Daniel Fabio Kawano, Paweł Zmora*, Konrad Kowalski*.

Czasopismo: „Organometallics”

Data opublikowania: 2024

*równorzędni współautorzy

Oświadczam, że mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: wykonywanie eksperymentów, sporządzanie sprawozdań z badań, analizę wyników i ich interpretację, oraz udział w przygotowaniu pierwotnej wersji artykułu.

.....
Podpis kandydata

Poznań, 01.09.2024 r.

Dr Paweł Zmora

Zakład Wirusologii Molekularnej

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

**Oświadczenie autora korespondencyjnego o wkładzie kandydata w publikacje
wchodzące w skład rozprawy doktorskiej**

Tytuł publikacji: *Novel Molecular Consortia of Cannabidiol with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Emerging Coronaviruses' Entry.*

Autorzy: Anna Pawełczyk*, **Rafał Nowak ***, Monika Gazecka, Anna Jelińska, Lucjusz Zaprutko, Paweł Zmora.

*równorzędni współautorzy

Czasopismo: „Pathogens”

Data opublikowania: 2023

Oświadczam, że wkład mgr inż. Rafała Nowaka w powstanie tej pracy obejmował: wykonywanie eksperymentów, sporządzanie sprawozdań z badań, analizę wyników i ich interpretację, oraz udział w przygotowaniu pierwotnej wersji artykułu.

Tytuł publikacji: *TMPRSS2-specific antisense oligonucleotides inhibit host cell entry of emerging viruses.*

Autorzy: Rafał Nowak, Monika Gazecka, Markus Hoffmann, Stefan Pöhlmann, Ryszard Kierzek, Paweł Zmora.

Czasopismo: „Virology”

Data opublikowania: 2024

Oświadczam, że wkład mgr inż. Rafała Nowaka w powstanie tej pracy obejmował: wykonywanie eksperymentów, sporządzanie sprawozdań z badań, analizę wyników i ich interpretację, udział w przygotowaniu pierwotnej wersji artykułu, odpowiedzi dla recenzentów oraz ostatecznej wersji manuskryptu.

Tytuł publikacji: *Organometallic–Erlotinib Conjugates Active against Lung Cancer Cells and as Emerging Virus Entry Inhibitors.*

Autorzy: Przemysław Biegański*, Monika Gazecka*, **Rafał Nowak**, Aleksander Górski, Natalia Dutkiewicz, Daniel Fabio Kawano, Paweł Zmora, Konrad Kowalski.

Czasopismo: „Organometallics”

Data opublikowania: 2024

*równorzędni współautorzy

Oświadczam, że wkład mgr inż. Rafała Nowaka w powstanie tej pracy obejmował: wykonywanie eksperymentów, sporządzanie sprawozdań z badań, analizę wyników i ich interpretację, udział w przygotowaniu pierwotnej wersji artykułu, odpowiedzi dla recenzentów oraz ostatecznej wersji manuskryptu.

.....
Podpis autora korespondencyjnego

Oświadczenie dotyczące wykorzystania narzędzi generatywnej sztucznej inteligencji

W związku z przygotowaniem niniejszej rozprawy doktorskiej oświadczam, że na etapie opracowywania pracy korzystałem z narzędzi generatywnej sztucznej inteligencji wyłącznie w sposób pomocniczy, zgodny z ogólnymi zasadami rzetelności akademickiej i etyki naukowej.

Narzędzia te zostały wykorzystane do:

- korekty językowej, stylistycznej i edytorskiej wybranych fragmentów tekstu,
- wsparcia w porządkowaniu i ujednolicaniu treści przeglądowych, w tym w zakresie zachowania spójności terminologicznej i klarowności wypowiedzi,

Podkreślam, że narzędzia generatywnej sztucznej inteligencji **nie były wykorzystywane** do tworzenia treści merytorycznych, formułowania wniosków badawczych ani analizy wyników. Całość pracy – w tym struktura rozprawy, interpretacja danych oraz sformułowane wnioski – stanowi rezultat samodzielnej pracy autora.

.....
Podpis kandydata

11.2 Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

Article

Novel Molecular Consortia of Cannabidiol with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Emerging Coronaviruses' Entry

Anna Pawełczyk ^{1,*}, Rafał Nowak ^{2,†}, Monika Gazecka ², Anna Jelińska ³, Lucjusz Zaprutko ¹ and Paweł Zmora ^{2,*}

¹ Department of Organic Chemistry, Pharmaceutical Faculty, Poznan University of Medical Sciences, 60-780 Poznan, Poland; zaprutko@ump.edu.pl

² Department of Molecular Virology, Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, 61-704 Poznan, Poland; rnowak@ibch.poznan.pl (R.N.); mgazecka@ibch.poznan.pl (M.G.)

³ Department of Pharmaceutical Chemistry, Poznan University of Medical Sciences, 60-780 Poznan, Poland; ajelinsk@ump.edu.pl

* Correspondence: apaw@ump.edu.pl (A.P.); pzmora@ibch.poznan.pl (P.Z.)

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: The COVID-19 pandemic provoked a global health crisis and highlighted the need for new therapeutic strategies. In this study, we explore the potential of the molecular consortia of cannabidiol (CBD) and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) as novel antiviral dual-target agents against SARS-CoV-2/COVID-19. CBD is a natural compound with a wide range of therapeutic activities, including antiviral and anti-inflammatory properties, while NSAIDs are commonly used to mitigate the symptoms of viral infections. Chemical modifications of CBD with NSAIDs were performed to obtain dual-target agents with enhanced activity against SARS-CoV-2. The synthesised compounds were characterised using spectroscopic techniques. The biological activity of three molecular consortia (CBD–ibuprofen, CBD–ketoprofen, and CBD–naproxen) was evaluated in cell lines transduced with vesicular stomatitis virus-based pseudotypes bearing the SARS-CoV-1 or SARS-CoV-2 spike proteins or infected with influenza virus A/Puerto Rico/8/34. The results showed that some CBD–NSAID molecular consortia have superior antiviral activity against SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2, but not against the influenza A virus. This may suggest a potential therapeutic role for these compounds in the treatment of emerging coronavirus infections. Further studies are needed to investigate the efficacy of these compounds in vivo, and their potential use in clinical settings. Our findings provide a promising new approach to combatting current and future viral emergencies.

Keywords: cannabidiol (CBD); nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs); molecular consortia; SARS-CoV-2; virus entry



Citation: Pawełczyk, A.; Nowak, R.; Gazecka, M.; Jelińska, A.; Zaprutko, L.; Zmora, P. Novel Molecular Consortia of Cannabidiol with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Emerging Coronaviruses' Entry. *Pathogens* **2023**, *12*, 951. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070951>

Academic Editor: Richard Y. Zhao

Received: 19 May 2023

Revised: 7 July 2023

Accepted: 16 July 2023

Published: 18 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The search for completely new chemical entities is an established tendency in modern medical chemistry, particularly in the era of coronaviruses and various multifactorial diseases. Recent research has shown that the following guidelines are extremely important in the design of new, relevant therapeutic structures:

- the design of new chemical systems based on innovative structural features [1], such as hybrids and conjugates (molecular consortia in general);
- the use of compounds of natural origin, i.e., phytochemicals, with pleiotropic activity, which have been effective in the treatment of many diseases [2];
- the use of small-molecule drugs and their new derivatives, with known and proven therapeutic power [3].

These studies were based on both natural and small-molecule chemical individuals, such as natural and small-molecule cannabidiol (CBD) and selected small-molecule nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) compounds, and used the synthetic trends mentioned above to create new chemical entities with potential biological activity. CBD is the main non-psychoactive constituent of *Cannabis sativa*, and has exhibited a wide range of therapeutically promising pharmacological effects, either as a single drug or in combination with other drugs in adjunctive therapy. CBD is one of the chemically and phylogenetically related phenolic terpenes derived from natural hemp. The chemistry and pharmacology of CBD, as well as various molecular targets including CBD receptors and other CBD-interactive components of the endocannabinoid system, have been reviewed extensively [4–7]. The preliminary results of many studies have prompted the exploration of the therapeutic potential of CBD in relation to various diseases, particularly cancer and drug-resistant epilepsy [7–12].

Recently, CBD has become famous due to reports of its health-promoting properties in the treatment of COVID-19. Research results have indicated that CBD can help regulate oxygen levels in the body and protect against cytokine storms. It is speculated that CBD may suppress the immune system's reaction because CBD resembles endocannabinoids naturally occurring in the human body [13]. Recent research results have shown that high concentrations of CBD have a beneficial effect on the treatment of acute respiratory distress syndrome caused by COVID-19, restoring proper oxygen levels in the body [14]. In addition, laboratory tests have shown that CBD reduces swelling and scarring in the lungs. In summary, CBD can help reduce cytokine levels, thus improving the level of oxygen in the body and supporting the regeneration of damaged lung tissue. Therefore, CBD can help fight against the dangerous effects of a coronavirus infection [13,14]. It has also been established that CBD-rich extracts can help regulate the expression and/or activity of the SARS-CoV-2 cellular receptor (i.e., ACE2). Studies have shown that 13 extracts potent in CBD, which were extremely low in psychoactive substances, effectively modulated ACE2 expression [15].

The concepts of structural hybridisation and molecular consortia are well established and have led to the approval of numerous antiviral and anticancer drugs [1,16]. However, it is very important to skilfully select the active agents that will be covalently combined to obtain dual-target activity. NSAIDs are analgesic, antipyretic and anti-inflammatory medications widely used to relieve symptoms related to many conditions, including viral disorders [16,17]. Their use is often limited due to side effects, particularly gastrointestinal ulcerogenic activity and renal toxicity. Therefore, introducing another pharmacophore to mask the free carboxylic group is a promising approach to designing dual-target agents. For example, nitric oxide-releasing NSAIDs, such as NO-aspirin and an ibuprofen derivative, which contain a cleavable ester linker to a nitric oxide-releasing moiety, have been reported to have a superior anti-inflammatory and antithrombotic profile [18]. It has also been suggested that CBD and its physical mixtures with selected NSAIDs (ibuprofen and diclofenac) are promising candidates for the adjuvant treatment of high-risk vulvar squamous cell carcinoma patients [19]. Regarding the side effects of NSAIDs, various combinations with CBD may become a new therapeutic solution. The results of studies on the use of CBD and NSAIDs, as well as on the combined treatment of CBD together with NSAIDs, provide the foundation for a new approach to the modern treatment of many diseases.

Therefore, the aim of this study was to analyse the antiviral effect of selected novel molecular consortia consisting of CBD and NSAID units.

2. Materials and Methods

2.1. General Procedure for the Synthesis of CBD-NSAID Molecular Consortia

The CBD was purchased from Medcolcanna Organics Inc. (Calgary, AB, Canada), and NSAIDs, i.e., ibuprofen, ketoprofen and naproxen, as well as dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP), and solvents (dichloromethane, hexane, ethyl acetate), were purchased from Aldrich® (Sigma Aldrich, Schnelldorf, Germany), Fluka®

(Buchs, Switzerland), POL-AURA (Warsaw, Poland), Chempur® (Piekary Śląskie, Poland) and POCh® (Gliwice, Poland).

In a 50 mL flask, CBD (**1**) (0.314 g, 1 mmol) and selected NSAID compounds (Figure 1; **2–4**) (2.2 mmol) were dissolved in dry CH₂Cl₂ (10 mL).

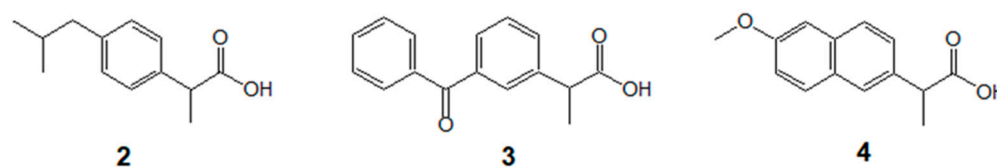


Figure 1. NSAID structures selected (**2**—ibuprofen; **3**—ketoprofen; **4**—naproxen).

Then, DCC (0.454 g, 2.2 mmol) and DMAP (0.012 g, 0.1 mmol) were added (Figure 2). The reaction mixture was stirred at ambient temperature until the reaction was completed (about 2 h). After this time, the mixture was filtered (from the resulting dicyclohexylurea), washed with 1N aqueous HCl solution, saturated brine solution and dried over anhydrous MgSO₄. The obtained mixture was concentrated to yield crude product (**5–7**) as a white waxy solid. The new hybrid diester was purified with flash column chromatography on silica gel using a hexane/ethyl acetate (9:1 or 9:2, v:v) mixture as eluent. The synthetic route designed and employed to obtain the proposed hybrid derivatives **5–7** is presented in Scheme 1. All the derivatives were prepared according to the previously reported method [20,21].

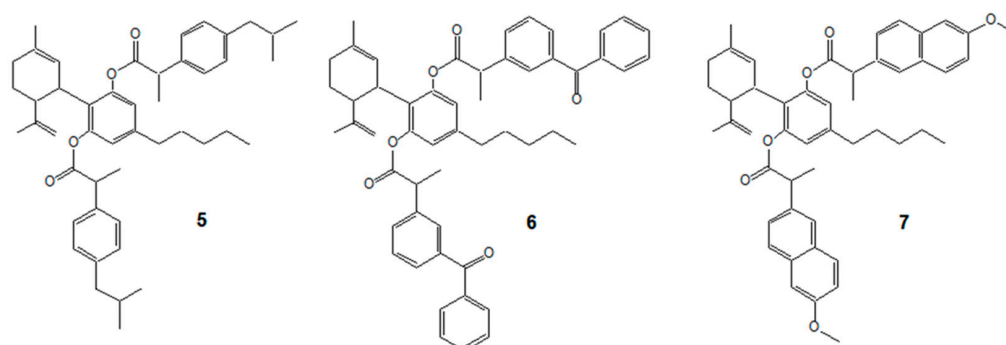
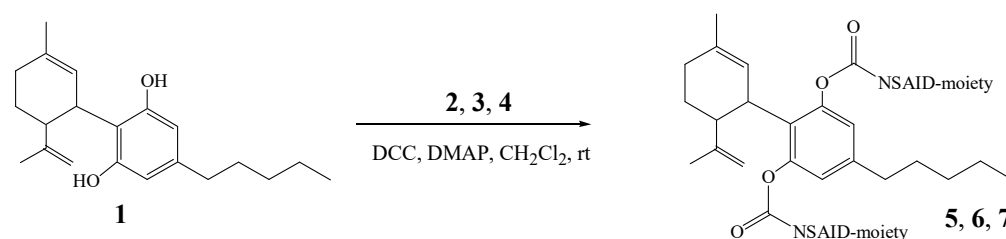


Figure 2. Chemical formulas of CBD-NSAID molecular consortia (**5–7**) obtained.



Scheme 1. General synthetic pathway of CBD-NSAID molecular consortia (**1**—CBD, **2**—ibuprofen, **3**—ketoprofen, **4**—naproxen, **5**—CBD-ibuprofen, **6**—CBD-ketoprofen, **7**—CBD-naproxen).

The ¹H- and ¹³C-NMR spectra were recorded using a BRUKER spectrometer, 400 and 100 MHz, respectively (AvanceCore Select, Bruker, Billerica, MA, USA). Chemical shifts were expressed in parts per million (ppm), relative to tetramethylsilane (TMS) as an internal standard, using CDCl₃ as a solvent. MS spectra were recorded on a 402 AMD INTECTRA apparatus (AMD Intectra GmbH, Harpstedt, Germany) using the electron impact technique (EI), operating at 75 eV. The IR spectra were recorded using an ATR-FTIR spectrometer Nicolet iS50 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and UV-VIS spectra were recorded using an LLG-uniSPEC 2 spectrophotometer (Lab Logistics Group

GmbH, Meckenheim, Germany). The progress of the reactions and the purity of products were checked using the thin-layer chromatography (TLC) method on silica gel plates (DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ from Merck, Darmstadt, Germany). A mixture of hexane/ethyl acetate (9:1, 9:2, 9:4, *v/v*) was used as the eluent. The TLC spots on the plates were observed in UV light ($\lambda = 254$ nm). Silica gel 60 (63–200 μ m particle size, Merck) was used for column chromatography.

In details, the CBD-ibuprofen molecular consortium (**5**; CBD-I) was synthesised via the reaction of 0.314 g of **1** and 0.454 g of **2**, and after chromatographic separation, the product **5** was obtained as a colourless resin (0.559 g, 81%), $R_f = 0.55$ (hexane/ethyl acetate 9:1).

¹H NMR (δ [ppm]): 7.10–7.03 (4H, m, H_{Ar-I}), 6.79–6.95 (m, 4H, H_{Ar-I}), 6.34 (s, 2H, H_{Ar-CBD}), 4.97 (d, 1H, C=CH, $J = 10.4$), 4.26–4.09 (m, 2H, C=CH₂), 4.09 (s, 1H, CH), 4.00 (s, 1H, CH), 3.15–2.85 (d, 2H, CH, $J = 10.4$), 2.32 (d, 4H, CH₂, $J = 6.8$), 2.30–2.27 (m, 6H, CH₃), 1.95–1.79 (m, 2H, CH), 1.82–1.67 (m, 6H, CH₃), 1.49–1.34 (m, 4H, CH₂), 1.23–1.02 (m, 8H, CH₂), 0.75–0.69 (m, 15H, 5 $\times$ CH₃).

¹³C NMR (δ [ppm]): 2.73 (C=O_{ester}), 148.02, 147.88, 147.73, 141.82, 137.46, 136.86, 132.10, 129.54, 129.43, 127.39, 127.14, 124.51, 110.68, 60.68, 45.44, 45.07, 38.08, 37.63, 35.19, 31.53, 30.23, 28.97, 23.21, 22.41, 22.38, 19.54, 18.64, 14.04.

EI-MS (m/z): 691.5 [M]⁺ (C₄₇H₆₂O₄), 501.3, 434.1, 313.1, 231.1, 187.9, 160.9, 118.9.

FTIR (ATR, cm^{−1}): 1756.14 (C=O_{ester})

The CBD-ketoprofen molecular consortium (**6**; CBD-K) was produced via the reaction of 0.314 g of **1** and 0.559 g of **3**; after chromatographic separation, the product **6** was obtained as a colourless resin (0.448 g, 57%), $R_f = 0.62$ (hexane/ethyl acetate 9:2).

¹H NMR (δ [ppm]): 7.69–7.59 (m, 8H, H_{Ar-K}), 7.50–7.44 (m, 4H, H_{Ar-K}), 7.37–7.31 (m, 6H, H_{Ar-K}), 6.42 (m, 2H, H_{Ar-CBD}), 5.00 (d, 1H, C=CH, $J = 10.4$), 4.96 (s, 2H, C=CH₂), 4.27–4.20 (m, 2H, CH), 3.19–3.17 (d, 1H, CH, $J = 10.4$), 2.87–2.84 (d, 1H, CH, $J = 10.4$), 2.39–2.29 (m, 6H, CH₃), 1.95–1.75 (m, 6H, CH₃), 1.54–1.35 (m, 4H, CH₂), 1.24–1.05 (m, 8H, CH₂), 0.76–0.70 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (δ [ppm]): 196.38 (C=O), 172.11 (C=O_{ester}), 147.58, 142.11, 140.50, 139.96, 138.13, 137.99, 137.42, 137.57, 131.74, 130.08, 130.03, 129.51, 129.27, 128.88, 128.37, 126.00, 125.90, 124.32, 124.25, 110.85, 45.69, 45.54, 45.44, 45.23, 35.22, 31.61, 31.53, 30.61, 30.49, 28.94, 23.42, 22.69, 22.44, 19.49, 19.32, 14.16, 14.04.

EI-MS (m/z): 787.0 [M]⁺ (C₅₃H₅₄O₆), 549.6, 467.1, 313.2, 230.4, 209.1, 104.8.

FTIR (ATR, cm^{−1}): 1755.61 (C=O_{ester}), 1656.81 (C=O).

The CBD-naproxen molecular consortium (**7**; CBD-N) was obtained via the reaction of 0.314 g of **1** and 0.506 g of **4**; after chromatographic separation, the product **7** was obtained as a colourless resin (0.480 g, 65%), $R_f = 0.57$ (hexane/ethyl acetate 9:2).

¹H NMR (δ [ppm]): 7.62–7.58 (m, 6H, H_{Ar-N}), 7.37–7.34 (d, 2H, H_{Ar-N}), 7.00–7.04 (m, 4H, H_{Ar-N}), 6.40 (s, 2H, H_{Ar-CBD}), 5.02 (s, 1H, C=CH), 4.26 (s, 1H, C=CH₂), 4.19 (s, 1H, C=CH₂), 3.81 (s, 6H, OCH₃), 3.10–3.08 (d, 2H, CH, $J = 10.4$), 2.37–2.28 (m, 2H, CH), 1.94 (s, 3H, CH₃), 1.75–1.73 (d, 3H, CH₃-C=C, $J = 10.4$), 1.59–1.57 (d, 6H, CH₃, $J = 6.8$), 1.38–1.34 (m, 4H, CH₂), 1.18–1.12 (m, 8H, CH₂), 0.79–0.70 (m, 3H, CH₃).

¹³C NMR (δ [ppm]): 172.63 (C=O_{ester}), 157.69, 147.73, 141.93, 134.68, 133.85, 132.18, 129.33, 128.96, 127.27, 126.24, 125.94, 124.37, 119.03, 110.83, 105.51, 55.34, 45.58, 45.43, 37.95, 35.16, 31.62, 31.51, 30.41, 28.88, 23.19, 22.23, 19.23, 14.17, 14.03.

EI-MS (m/z): 738.7 [M]⁺ (C₄₉H₅₄O₆), 525.5, 418.4, 313.4, 169.6.

FTIR (ATR, cm^{−1}): 1751.25 (C=O_{ester}).

2.2. Cells and Viruses

The HEK293T (CRL-3216, ATCC), MDCK.2 (CRL-2936, ATCC), A549 (CCL-185, ATCC), BHK-21 (G43) (a kind gift of Prof. Gert Zimmer, Institute of Virology and Immunology, Bern, Switzerland, [20]), and Vero-TMPRSS2 (a kind gift of Prof. Stefan Pöhlmann, German Primate Center—Leibniz Institute for Primate Research, Göttingen, Germany, [21]) were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS, Gibco) and 100 U/mL penicillin and

streptomycin (P/S, Gibco). Every third/fourth passage, BHK-21 (G43) and Vero-TMPRSS2 were additionally supplemented with 0.5 µg/mL hygromycin B and 100 µg/mL zeocin, and 50 µg/mL blasticidin, respectively. I1-hybridoma cells (CRL-2700, ATCC) were maintained in minimal essential medium (MEM, Gibco) supplemented with 15% FBS and 100 U/mL P/S. The influenza virus A/Puerto Rico/8/34 (IAV PR8) was reconstituted from the previously described 8-plasmid system [22] and propagated on the MDCK.2 cells. The IAV PR8 viral titre was measured with quantitative RT-PCR, as previously described [23].

2.3. The Cytotoxicity Analysis of CBD-NSAID Molecular Consortia

The HEK293T, A549, and Vero-TMPRSS2 were seeded in 96-well plates at a density of 2×10^5 cell/mL and incubated overnight at 37 °C and 5% CO₂. Next, the medium was removed, cells were washed with warm PBS, and then a medium containing serial dilutions of CBD-NSAID molecular consortia at a final concentration of 1, 5, 10, 50 and 100 µg/mL or mock-treated medium was added. After 24 h incubation at 37 °C, cytotoxicity was analysed with a CellTiter-Glo 2.0 Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, USA), according to manufacturer's instructions. Briefly, the culture medium was carefully removed and 50 µL/well of the reagent was added. After 10–15 min of incubation at room temperature, the lysates were transferred to the white 96-well plates, and the luminescence was checked with Hidex Sense Plate Reader.

2.4. CBD-NSAID-Mediated Inhibition of SARS-CoVs Virus Entry

To investigate the CBD-NSAIDs' effect on the SARS-CoVs virus entry, we used the previously described [24] surrogate system based on VSV*ΔG-FLuc pseudotypes bearing SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 S proteins, as well as VSV g protein as a control. The VSV*ΔG-FLuc pseudotypes encoding GFP and firefly luciferase were propagated on transgenic BHK-21 (G43) cells (a kind gift of Prof. Gert Zimmer, Institute of Virology and Immunology, Mittelhäusern and Bern, Bern, Switzerland), which express the VSV g protein after mifepristone induction. Next, to produce VSV-pseudotypes bearing SARS-CoVs S proteins, the harvested VSV-pseudotypes were used to transduce the HEK293T cells previously transfected with plasmids encoding SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 S proteins, i.e., pCAGGS-SARS-CoV-1-S and pCG1-SARS-2-S (a kind gift of Prof. Stefan Pöhlmann, German Primate Center—Leibniz Institute for Primate Research, Göttingen, Germany, [21]). After 1 h incubation of transfected HEK293T cells with VSV-pseudotypes, the supernatant was removed, cells were gently washed with warm PBS, and fresh culture medium containing I1-hybridoma cell-produced anti-VSV g antibodies was added. The supernatants containing VSV-SARS-CoVs-S pseudotypes were collected at 48 h post transduction.

To examine the effect of the CBD-NSAID molecular consortia on the virus entry, the VSV-SARS-CoVs-S pseudotypes were incubated for 1 h at 37 °C with CBD-NSAIDs at a final concentration of 1, 5, 10, 50 and 100 µg/mL or mock-treated. After incubation, the CBD-NSAID-pretreated pseudotypes were added to HEK293T cells transfected with previously described [21] plasmids encoding ACE-2 and TMPRSS2, and left for 1 h at 37 °C. Next, the cells were gently washed with warm PBS and fresh culture medium was added. The luminescence was investigated at 24 h post transduction with ONE-Glo substrate (Promega) on a Hidex Sense plate reader.

2.5. The CBD-NSAID Molecular Consortia's Effect on Influenza A Virus Replication

To find the CBD-NSAID molecular consortia's mechanisms of action, we analysed their effect on the IAV replication cycle. For this, we seeded A549 and Vero-TMPRSS2 cells in 24-well plates at a density of 2×10^5 cells/mL. After 24 h, IAV PR8 was incubated for 1 h at 37 °C with CBD-NSAIDs at a final concentration of 1, 5, 10, 50 and 100 µg/mL, or mock-treated. Next, the cells were gently washed with warm PBS and then infected with CBD-NSAID-pretreated IAV PR8 at an MOI of 0.01. After 1 h incubation, the infection medium (DMEM supplemented with 0.3% BSA) containing IAV PR8 was removed, cells were washed with PBS, and a fresh infection medium with CBD-NSAID molecular consortia at a

final concentration of 1, 5, 10, 50 and 100 µg/mL or mock-treated was added. Additionally, the fresh infection medium for the A549 cells was supplemented with the 2.5 µg/mL N-acetylated trypsin (Sigma). Culture supernatants were collected at 48 h post infection, and the number of viral RNA genome copies were determined by RT-qPCR, as described previously [23]. Briefly, the viral RNA was isolated from cell-free supernatants with a NucleoSpin RNA Virus Kit (Macherey Nagel, Oensingen, Switzerland) according to the manufacturer's protocol. For determination of the amount of viral RNA, the RT-qPCR was carried out using a previously described IAV gene-specific primer and probe [23], and a One Step RT-qPCR kit (Takara, Kusatsu City, Japan). The RT-qPCR protocol consists of 20 min incubation at 50 °C, 15 min denaturation at 95 °C, 40 cycles of denaturation at 94 °C for 15 s, and annealing with extension at 60 °C for 60 s. The reaction was performed on a BIO-RAD CFX96 Real-Time system. To define the limit of detection (LOD) and to generate a standard curve to calculate the absolute copy number from the cycle threshold (Ct) value, the specific standards were made as 10-fold dilutions of RNA transcribed on an IAV PR8 template. Six serial dilutions starting from 3.6×10^7 the total number of viral RNA genome copies were used. In addition, we checked the IAV structural proteins' expression in the infected cells after the 100 µg/mL CBD-NSAID treatment with an immunofluorescence microscope. Briefly, the cells were infected with 100 µg/mL CBD-NSAID-pretreated IAV PR8 at an MOI or mock-treated. At 48 h post infection, the cells were fixed and stained with anti-IAV antibodies and corresponding secondary antibodies conjugated with FITC, and DAPI. Moreover, we analysed the IAV protein expression on the virion after CBD-NSAID treatment. The IAV was incubated with 100 µg/mL CBD-NSAIDs for one hour, concentrated on sucrose cushion, denatured at 95 °C for 5 min, and then transferred on the nitrocellulose membrane and stained with polyclonal anti-IAV antibodies (Merck, Germany) and corresponding anti-goat antibody coupled with FITC (Merck, Germany).

2.6. Statistical Analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SD. The IC₅₀ was calculated using a nonlinear regression analysis. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism.

3. Results

3.1. NSAID-CBD Molecular Consortia Synthesis

Inspired by the latest literature reports, small-molecule structures of natural CBD and already proven anti-inflammatory NSAIDs have been chemically combined into a single molecule termed the CBD-NSAID molecular consortium. Molecular hybridisation of two or more bioactive molecules via a covalent bond is an effective and efficient tool for the development of new drug candidates. Regarding the importance of a medicinally interesting scaffold of CBD (1) and NSAIDs (2–4) (Figure 1), we decided to combine them into a single molecule, that is, a molecular consortium [1]. Three molecular consortia (5–7) consisting of CBD (1) and selected racemic NSAID structures, namely, ibuprofen (2), ketoprofen (3) and naproxen (4), were obtained (Figure 2).

CBD (1) was reacted with appropriate NSAID compounds (2–4) in the presence of DCC and DMAP reagents. DCC is an activating and coupling agent for carboxylic substrates, while strongly nucleophilic DMAP acts as an acyl transfer reagent in the Steglich esterification reaction [25,26], which is a highly useful process in the conversion of sterically demanding substrates. The water resulting from a DCC-mediated reaction reacts immediately with the carbodiimide applied, and forms dicyclohexylurea (DHU), which is insoluble in a reaction medium and precipitates as a white solid. Reactions were carried out in an anhydrous dichloromethane solution at room temperature for up to two hours to achieve full conversion of the CBD substrate.

As a result of the synthesis, three structures hybridised using the formulas shown in Figure 2 were obtained. Further isolation and purification via column chromatography resulted in the desired pure CBD-NSAID diesters 5–7 with yields ranging from 57% to 81%. The structure of the CBD-NSAID hybrid compounds was confirmed via ¹H- and

^{13}C -NMR, EI-MS, IR and UV-VIS data. In the IR spectrum, characteristic ester bands for CBD-I (1756.14 cm^{-1}), CBD-K (1755.61 cm^{-1}), CBD-N (1751.25 cm^{-1}) are observed. In the case of the CBD-K derivative, an additional carbonyl band at 1656.81 cm^{-1} is present (Supplementary Figure S1). According to the spectrophotometric measurements, the main absorption maxima for CBD-I, CBD-K, and CBD-N occur in the ranges of 216–232 nm, 214–274 nm, and 214–248 nm, respectively (Supplementary Figure S2).

3.2. The Cytotoxicity of CBD-NSAID Molecular Consortia

Three molecular consortia consisting of CBD and NSAIDs (i.e., ibuprofen, ketoprofen and naproxen) in a serial dilution of 0, 1, 5, 10, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ were tested for cytotoxic effect after 24 h incubation on HEK293T, A549, and Vero-TMPRSS2 cells. We did not observe any significant differences in cell viability between different CBD-NSAID concentrations and mock-treated cells (Figure 3), which suggests that the analysed molecular consortia did not have a cytotoxic effect.

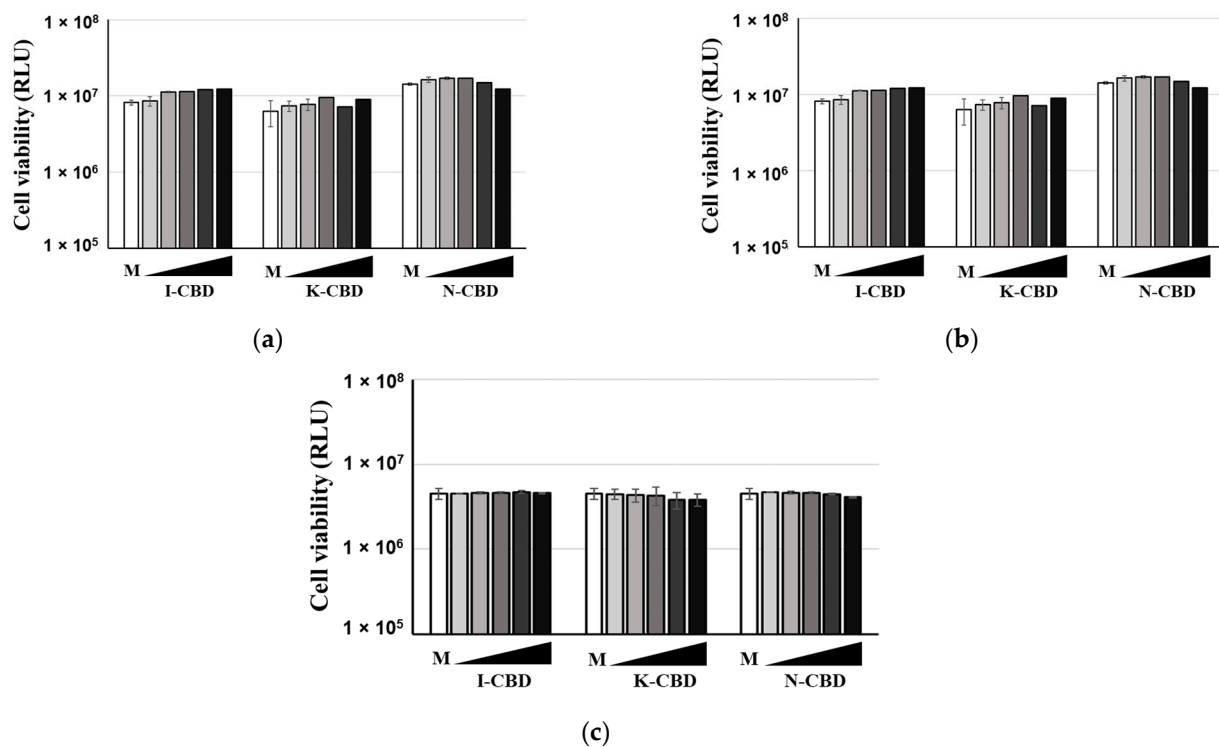


Figure 3. Cytotoxicity of the CBD-NSAID molecular consortia in HEK293T (a), Vero-TMPRSS2 (b), and A549 (c) cells. To analyze the cytotoxic effect of CBD-NSAIDs, the cells were treated with increasing concentrations of CBD-NSAIDs or were mock-treated (M, with an equal volume of the solvent DMSO). The cell viability was analysed at 24 h post CBD-NSAID treatment using the CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay Protocol (Promega). The results of representative experiments performed with triplicate samples are shown. Error bars indicate standard deviations (SD). Similar results were obtained in three independent experiments.

3.3. The CBD-NSAIDs Effect on the SARS-CoVs Entry

To investigate the effect of CBD-NSAID molecular consortia on virus entry, we used the previously described VSV-pseudotype system encoding the reporter gene (i.e., luciferase). In this system, a decrease in luciferase activity indicates the inhibition of virus entry. As expected, no effect of CBD-NSAIDs was observed in cells transduced with VSV-pseudotypes bearing VSV g (Figure 4). A significant reduction in the SARS-CoV-1 virus entry was found when CBD-N was applied, with IC_{50} below 1 $\mu\text{g/mL}$. Moreover, the observed effect was clearly dose-dependent, with more than a 10-fold decrease in luciferase

activity in transduced cells treated with 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and an approximately 2-fold reduction when 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CBD-N was applied. We did not find any significant inhibitory effect of CBD-I and CBD-K on SARS-CoV-1 virus entry (Figure 4). At the same time, CBD-I and CBD-N molecular consortia significantly inhibited SARS-CoV-2 entry, with an IC_{50} below 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. CBD-I reduced luciferase activity in SARS-CoV-2 transduced cells in a dose-dependent manner, with approximately 2- and 10-fold decreases when the lowest and highest concentrations were applied, respectively. A greater than 10-fold inhibition of SARS-CoV-2 entry was observed when CBD-N was added to the transduced cells. In this case, the lowest and highest concentrations had a similar inhibitory effect (Figure 4). The weakest inhibitory effect on SARS-CoV-2 entry was found in cells treated with CBD-K, with a non-significant decrease in luciferase activity for each concentration used.

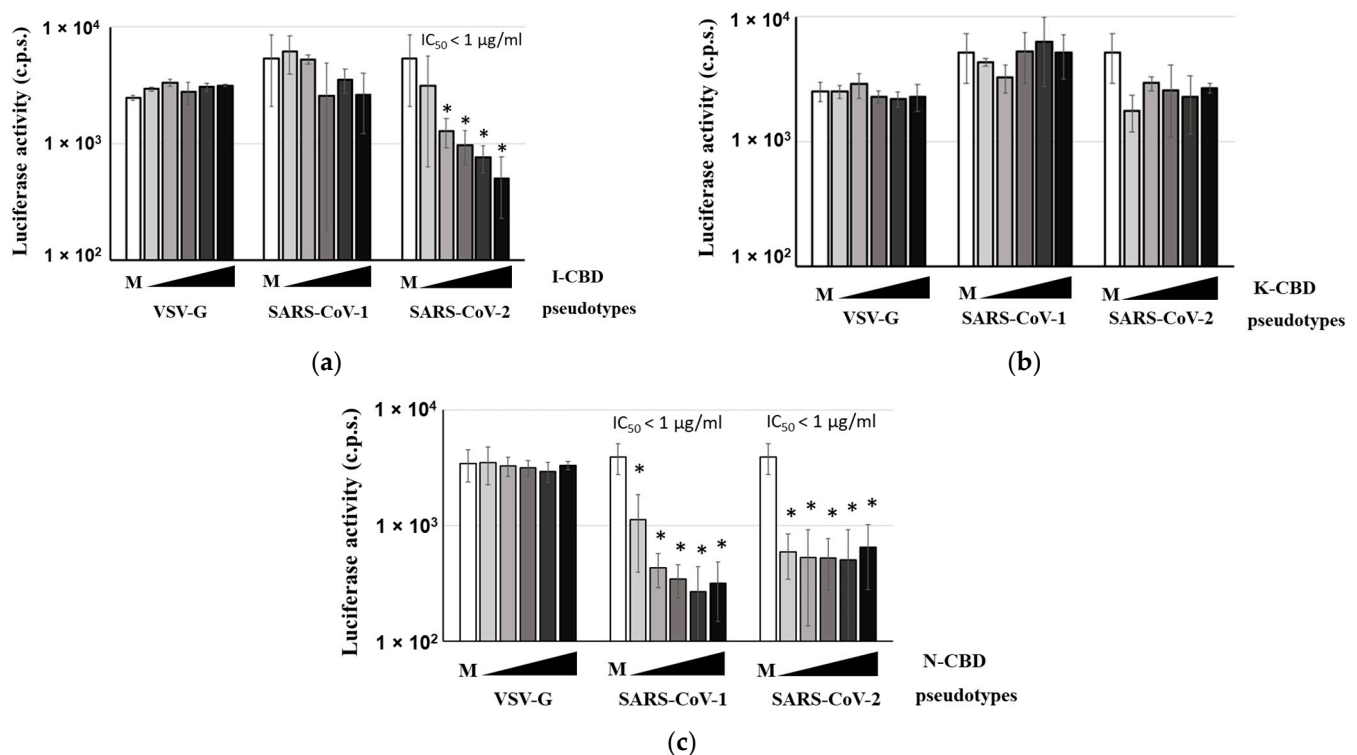


Figure 4. Inhibition of SARS-CoVs S protein-driven entry by the CBD-NSAID molecular consortia. The VSV-pseudotypes bearing VSV-G, SARS-CoV-1 or SARS-CoV-2 S proteins were incubated for 1 h with increasing concentrations of CBD-I (a), -K (b), -N (c), or were mock-treated (M), and then used for transduction of HEK293T cells expressing ACE-2 and TMPRSS2. Transduction efficiency was analysed at 24 h post inoculation by determining luciferase activities in cell lysates. The results of a single experiment carried out with triplicate samples are shown; error bars indicate standard deviations (SD). Similar results were obtained in three separate experiments. * $p < 0.05$.

3.4. The CBD-NSAIDs Effect on the IAV Replication

To analyse the effect of CBD-NSAID molecular consortia on influenza A virus replication, we infected A549 and Vero-TMPRSS2 with CBD-NSAID-pre-treated replication-competent IAV PR8, and then incubated the infected cells with increasing concentrations of CBD-NSAIDs. At 48 h post-infection, we analysed the viral copy numbers in the supernatants, and did not find any relevant differences between the mock and CBD-NSAID-treated groups (Figure 5). In addition, we found no significant differences in the IAV structural proteins' expression in the infected cell line, i.e., almost all cells were infected with IAV, and no effect of CBD-NSAID molecular consortia treatment was observed (Supplementary Figure S3). Similarly, we did not observe any significant differences in the IAV structural proteins' expression on the IAV virion level (Supplementary Figure S4).

Because there were no differences in the IAV PR8 titres as well as IAV protein expression, we did not analyse immune responses, such as interferon signalling pathways and/or other host/viral gene expressions, any further.

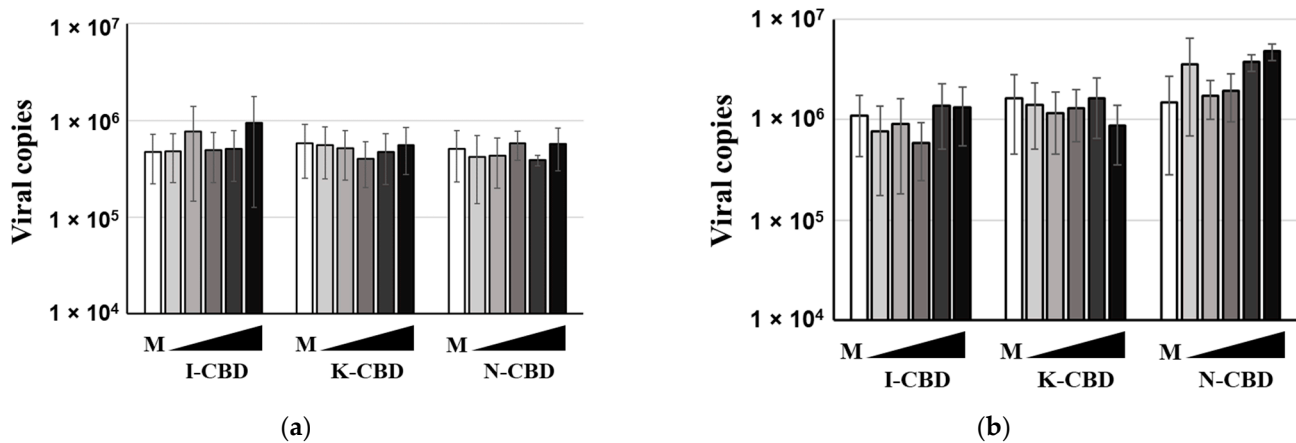


Figure 5. The effect of CBD-NSAID molecular consortia on influenza virus A/Puerto Rico/8/34 replication. The Vero-TMPRSS2 (a) and A549 (b) cells were infected with CBD-NSAID-pretreated IAV PR8 at an MOI 0.01, and then incubated with increasing concentrations of CBD-I, -K, or -N, or were mock-treated (M). At 48 h post-infection, viral spread was quantified as the release of infectious particles into the culture supernatants, as measured by an RT-qPCR. The result of a single experiment carried out with triplicate samples is shown; error bars indicate standard deviations (SD). Similar results were obtained in three separate experiments.

4. Discussion

The ongoing COVID-19 pandemic has caused almost 700 million confirmed SARS-CoV-2 infections and approximately 7 million deaths (as of 20 April 2023) [27,28]. In addition to the development of safe and highly effective mRNA and vector vaccines against severe COVID-19 [29], finding new antiviral therapeutics remains a necessity. Non-vaccinated, not fully vaccinated and certain vaccinated individuals, such as older people, persons with comorbidities, and patients with immunodeficiencies, are high-risk groups for severe COVID-19, hospitalisation, and death [30,31]. Therefore, effective, globally available and relatively cheap COVID-19 treatment strategies, both those that inhibit virus replication and those that mitigate SARS-CoV-2-mediated immune system overreaction, are being investigated by scientists and pharmaceutical companies all over the world. Moreover, such strategies may be insensitive to acquired mutations in the SARS-CoV-2 genome, and thus to the emergence of new genetic variants with a different phenotype, which may result in higher transmissibility and virulence, as well as potential resistance to existing vaccines.

Currently, in the European Union, several drugs have been approved for the treatment of COVID-19: remdesivir (Gilead Sciences, Foster City, CA, USA), PF-07321332, and ritonavir (Pfizer, New York, NY, USA), and monoclonal antibodies, such as sotrovimab (GlaxoSmithKline, Brentford, UK), casirivimab/imdevimab (Roche, Basel, Switzerland), regdanvimab (Celltrion, Yeonsu-gu, Republic of Korea), and tixagevimab/cilgavimab (AstraZeneca, Cambridge, UK) [32]. However, it should be highlighted that all the above-mentioned therapeutics (i) act directly against SARS-CoV-2 replication, i.e., remdesivir [33], PF-07321332, and ritonavir [34], or (ii) block virus entry to the host cells, i.e., monoclonal antibodies [35], and should be implemented as part of therapy within 1–5 days of the onset of symptoms to mitigate virus replication, spread, and pathogenesis, and to block the SARS-CoV-2-mediated overreaction of the immune system, which leads to severe acute respiratory syndrome. In addition, these drugs are recommended for SARS-CoV-2-infected patients who belong to the severe COVID-19 risk group in the first stages of viral infection [36]. Patients with a mild-to-moderate SARS-CoV-2 infection course are mainly treated symptomatically (e.g., via NSAID administration) [37–39]. The combination of

direct antiviral compounds, such as CBD, with general anti-inflammatory drugs, such as ibuprofen, ketoprofen, and/or naproxen, may have beneficial effects on COVID-19 therapy in patients with mild and severe infection courses. At the same time, it should be noted that potential adverse drug events and drug–drug interactions with medical CBD may occur (i.e., simultaneous administration of CBD and naproxen affect CYP2C8/9), which may increase the risk of side effects related to the substrate; thus, monitoring for adverse effects and toxicity is needed [40]. Our study showed that the molecular consortia of CBD with NSAIDs did not have any cytotoxic effect *in vitro*, which may suggest that they are a safe alternative that does not impact the CYP450 enzymes implicated in the primary metabolism and biotransformation of most therapeutic agents and xenobiotics.

The antiviral activities of CBD have been confirmed by many scientific groups, which have also discussed potential antiviral mechanisms. Nguyen et al. observed that CBD and its metabolite 7-OH-CBD inhibit SARS-CoV-2 replication in lung epithelial cells by inhibiting viral gene expression in part via the upregulation of the host IRE1 alpha RNase endoplasmic reticulum stress response, as well as via interferon signalling pathways [41]. At the same time, Corpetti et al. demonstrated that CBD blocked SARS-CoV-2 S protein-induced cytotoxicity and inflammation through PPAR γ -dependent suppression of proinflammatory agent signalling. In addition, the authors demonstrated that CBD inhibits S protein enterotoxicity by blocking the expression of interleukin 1 beta, interleukin 6, tumour necrosis factor alpha, and interleukin 18 [42]. Moreover, van Breemen et al. focused on the SARS-CoV-2 S protein as a target for CBD and its derivatives, namely cannabidiolic acid (CBDA) and cannabigerolic acid (CBGA). The authors demonstrated that CBDA and CBGA significantly block SARS-CoV-2 entry into cells via high affinity with the receptor-binding domain on the S1 subunit, which is responsible for the interaction with SARS-CoV-2 receptor ACE2 [43]. The following amino acids of the S1 subunit were essential for CBDA interactions: R403, Y453, Y495, G469 and Y505. It is worth mentioning that these amino acids are quite conserved and present in the S1 subunit of SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2, as well as in almost all genetic variants of SARS-CoV-2 (i.e., alpha, beta, and delta), which means that CBD and its derivatives may be a universal anti-SARS-CoVs agent, independent of the emergence of new genetic variants. Additionally, our study showed that the molecular consortia CBD-I and CBD-N significantly reduced SARS-CoV-2 viral entry, measured as an inhibition of luciferase activity in a VSV bearing SARS-CoV-2 S protein pseudotypes. Furthermore, we observed that the analysed consortia were characterised by similar levels of IC₅₀, as observed by Nguyen et al., and were significantly lower than those presented for CBDA and CBDG [41]. At the same time, the molecular consortium CBD-K did not significantly affect the entry of SARS-CoV-2 to the cells, which may be explained by the spatial hindrance caused by the two aromatic rings in its chemical structure. Interestingly, in the case of SARS-CoV-1, only the molecular consortium CBD-N exhibited significant inhibitory activity, with an IC₅₀ below 1 μ g/mL. This may be explained by the fact that the amino acids interacting with CBD are identical among the SARS-CoVs; however, in general, the S protein among the SARS-CoVs is 76% identical and 86% similar. The mutations in the receptor-binding sites of the S protein in the SARS-CoVs may result in different interactions with other proteins or small compounds with inhibitory activity. The use of linkers in the chemical structure of CBD–NSAID molecular consortia may potentially expand the specificity of the analysed compound to all emerging coronaviruses.

Our study had certain limitations. For example, the chosen cell culture model could not represent the inflammation process, and we could not check the anti-inflammatory activities of the CBD–NSAID molecular consortia. At the same time, at least one NSAID, (i.e., naproxen) exhibited broad anti-influenza virus activity by inhibiting nucleoprotein binding to RNA and impeding viral nucleoprotein nuclear export [44–46]. In our study, we did not find any effect of CBD-N on IAV replication, which means that the CBD-N molecular consortium does not interact directly with the IAV nucleoprotein, probably due to its size, but it may still have anti-inflammatory activity. The study of the anti-inflammatory activities of the synthesised CBD–NSAIDs should be continued using mice models.

5. Conclusions

Generation of bifunctional molecular consortia consisting of CBD and NSAIDs may result in a compound with higher antiviral activity. Simultaneously, it should be noted that some combinations of CBD and NSAIDs may result in the loss of their activity, due to the spatial hindrance and the impossibility of interaction with SARS-CoVs spike proteins. Therefore, the generated compounds should be carefully analysed with all available tools and models in the context of antiviral as well as anti-inflammatory activities. Further studies on the activity of CBD-NSAID molecular consortia should be continued with more complex models and in vivo models.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens12070951/s1>, Figure S1: The IR spectra of synthesized CBD-NSAID molecular consortia; Figure S2: The UV-VIS spectra of synthesized CBD-NSAID molecular consortia; Figure S3: Effect of the CBD-NSAID molecular consortia on the influenza A virus (IAV) replication. The cells were infected with 100 µg/mL CBD-NSAIDs pretreated IAV PR8 at an MOI or mock treated. At 48 h post infection, the cells were fixed and stained with anti-IAV antibodies, corresponding secondary antibodies conjugated with FITC, and DAPI; Figure S4: Effect of the CBD-NSAID molecular consortia on the structural proteins of influenza A virus (IAV). The cells were infected with CBD-NSAIDs pretreated IAV PR8 at an MOI 0.01 and then incubated with 100 µg/mL CBD-I, -K, or -N or mock-treated. At 48 h post infection, the supernatant was collected and the IAV was concentrated on the sucrose cushion, denaturated at 95 °C for 5 min and then transfer on the nitrocellulose membrane. The, IAV proteins were stained with anti-IAV antibodies (Merck, Germany) and corresponding secondary antibodies coupled with horse radish peroxidase.

Author Contributions: Conceptualization, A.P. and P.Z.; investigation, A.P., R.N., M.G. and A.J.; writing—original draft preparation, A.P., R.N. and P.Z.; supervision, L.Z. and P.Z.; funding acquisition, L.Z. and P.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the National Science Centre (Poland), grant numbers UMO-2020/01/0/NZ6/00152.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available within this article.

Acknowledgments: We thank Gert Zimmer from the Institute of Virology and Immunology, Mittelhaeusern, Switzerland, and Stefan Pöhlmann from German Primate Center—Leibniz Institute for Primate Research, Göttingen, Germany for providing the VSV*ΔG-FLuc pseudotype system and the plasmids encoding SARS-CoVs S proteins.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Pawełczyk, A.; Sowa-Kasprzak, K.; Olender, D.; Zaprutko, L. Molecular Consortia—Various Structural and Synthetic Concepts for More Effective Therapeutics Synthesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1104. [\[CrossRef\]](#)
2. Mihaylova, D.; Popova, A. Phytochemicals of Natural Products: Analysis and Biological Activities. *Horticulturae* **2023**, *9*, 167. [\[CrossRef\]](#)
3. Lu, B.; Atala, A. Small molecules and small molecule drugs in regenerative medicine. *Drug Discov. Today* **2014**, *19*, 801–808. [\[CrossRef\]](#)
4. Mechoulam, R.; Parker, L.A.; Gallily, R. Cannabidiol: An overview of some pharmacological aspects. *J. Clin. Pharmacol.* **2002**, *42*, 11S–19S. [\[CrossRef\]](#)
5. Mechoulam, R.; Peters, M.; Murillo-Rodriguez, E.; Hanus, L.O. Cannabidiol—recent advances. *Chem. Biodivers.* **2007**, *4*, 1678–1692. [\[CrossRef\]](#)
6. Ibeas Bih, C.; Chen, T.; Nunn, A.V.W.; Bazetot, M.; Dallas, M.; Whalley, B.J. Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders. *Neurotherapeutics* **2015**, *12*, 699–730. [\[CrossRef\]](#)
7. Burstein, S. Cannabidiol (CBD) and its analogs: A review of their effects on inflammation. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 1377–1385. [\[CrossRef\]](#)
8. Bergamaschi, M.M.; Queiroz, R.H.C.; Zuardi, A.W.; Crippa, J.A.S. Safety and side effects of cannabidiol, a Cannabis sativa constituent. *Curr. Drug Saf.* **2011**, *6*, 237–249. [\[CrossRef\]](#)

9. Zhornitsky, S.; Potvin, S. Cannabidiol in humans-the quest for therapeutic targets. *Pharmaceuticals* **2012**, *5*, 529–552. [\[CrossRef\]](#)
10. Fernández-Ruiz, J.; Sagredo, O.; Pazos, M.R.; García, C.; Pertwee, R.; Mechoulam, R.; Martínez-Orgado, J. Cannabidiol for neurodegenerative disorders: Important new clinical applications for this phytocannabinoid? *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2013**, *75*, 323–333. [\[CrossRef\]](#)
11. Green, R.; Khalil, R.; Mohapatra, S.S.; Mohapatra, S. Role of Cannabidiol for Improvement of the Quality of Life in Cancer Patients: Potential and Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 12956. [\[CrossRef\]](#)
12. Devinsky, O.; Cilio, M.R.; Cross, H.; Fernandez-Ruiz, J.; French, J.; Hill, C.; Katz, R.; Di Marzo, V.; Jutras-Aswad, D.; Notcutt, W.G.; et al. Cannabidiol: Pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia* **2014**, *55*, 791–802. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Salles, É.L.; Khodadadi, H.; Jarrahi, A.; Ahluwalia, M.; Paffaro, V.A.; Costigliola, V.; Yu, J.C.; Hess, D.C.; Dhandapani, K.M.; Baban, B. Cannabidiol (CBD) modulation of apelin in acute respiratory distress syndrome. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 12869–12872. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Khodadadi, H.; Salles, É.L.; Jarrahi, A.; Chibane, F.; Costigliola, V.; Yu, J.C.; Vaibhav, K.; Hess, D.C.; Dhandapani, K.M.; Baban, B. Cannabidiol Modulates Cytokine Storm in Acute Respiratory Distress Syndrome Induced by Simulated Viral Infection Using Synthetic RNA. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2020**, *5*, 197–201. [\[CrossRef\]](#)
15. Wang, B.; Kovalchuk, A.; Li, D.; Rodriguez-Juarez, R.; Ilnytsky, Y.; Kovalchuk, I.; Kovalchuk, O. In search of preventive strategies: Novel high-CBD Cannabis sativa extracts modulate ACE2 expression in COVID-19 gateway tissues. *Aging* **2020**, *12*, 22425–22444. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Zhou, Q.; Luo, Y.; Zhu, Y.; Chen, Q.; Qiu, J.; Cong, F.; Li, Y.; Zhang, X. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and nucleotide analog GS-441524 conjugates with potent in vivo efficacy against coronaviruses. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *249*, 115113. [\[CrossRef\]](#)
17. Ahmadi, M.; Bekeschus, S.; Weltmann, K.-D.; von Woedtke, T.; Wende, K. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: Recent advances in the use of synthetic COX-2 inhibitors. *RSC Med. Chem.* **2022**, *13*, 471–496. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Lolli, M.L.; Cena, C.; Medana, C.; Lazzarato, L.; Morini, G.; Coruzzi, G.; Manarini, S.; Fruttero, R.; Gasco, A. A new class of ibuprofen derivatives with reduced gastrototoxicity. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3463–3468. [\[CrossRef\]](#)
19. Krajka-Kuźniak, V.; Papierska, K.; Narożna, M.; Jelińska, A.; Majchrzak-Celińska, A. Cannabidiol and Its Combinations with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Induce Apoptosis and Inhibit Activation of NF- κ B Signaling in Vulvar Squamous Cell Carcinoma. *Molecules* **2022**, *27*, 8779. [\[CrossRef\]](#)
20. Hanika, A.; Larisch, B.; Steinmann, E.; Schwegmann-Weßels, C.; Herrler, G.; Zimmer, G. Use of influenza C virus glycoprotein HEF for generation of vesicular stomatitis virus pseudotypes. *J. Gen. Virol.* **2005**, *86*, 1455–1465. [\[CrossRef\]](#)
21. Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Schroeder, S.; Krüger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, T.S.; Herrler, G.; Wu, N.-H.; Nitsche, A.; et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **2020**, *181*, 271–280.e8. [\[CrossRef\]](#)
22. Gnirß, K.; Zmora, P.; Blazejewska, P.; Winkler, M.; Lins, A.; Nehlmeier, I.; Gärtner, S.; Moldenhauer, A.-S.; Hofmann-Winkler, H.; Wolff, T.; et al. Tetherin Sensitivity of Influenza A Viruses Is Strain Specific: Role of Hemagglutinin and Neuraminidase. *J. Virol.* **2015**, *89*, 9178–9188. [\[CrossRef\]](#)
23. Piasecka, J.; Lenartowicz, E.; Soszynska-Jozwiak, M.; Szutkowska, B.; Kierzek, R.; Kierzek, E. RNA Secondary Structure Motifs of the Influenza A Virus as Targets for siRNA-Mediated RNA Interference. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2019**, *19*, 627–642. [\[CrossRef\]](#)
24. Hoffmann, M.; Krüger, N.; Zmora, P.; Wrensch, F.; Herrler, G.; Pöhlmann, S. The Hemagglutinin of Bat-Associated Influenza Viruses Is Activated by TMPRSS2 for pH-Dependent Entry into Bat but Not Human Cells. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0152134. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Pawelczyk, A.; Olender, D.; Sowa-Kasprzak, K.; Zaprutko, L. Hybrid Compounds Strategy in the Synthesis of Oleanolic Acid Skeleton-NSAID Derivatives. *Molecules* **2016**, *21*, 420. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Shenvi, S.; Kiran, K.R.; Kumar, K.; Diwakar, L.; Reddy, G.C. Synthesis and biological evaluation of boswellic acid-NSAID hybrid molecules as anti-inflammatory and anti-arthritic agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *98*, 170–178. [\[CrossRef\]](#)
27. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Available online: <https://covid19.who.int> (accessed on 24 March 2023).
28. Graña, C.; Ghosn, L.; Evrenoglou, T.; Jarde, A.; Minozzi, S.; Bergman, H.; Buckley, B.S.; Probyn, K.; Villanueva, G.; Henschke, N.; et al. Efficacy and safety of COVID-19 vaccines. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2022**, *12*, CD015477. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Sharif, N.; Alzahrani, K.J.; Ahmed, S.N.; Dey, S.K. Efficacy, Immunogenicity and Safety of COVID-19 Vaccines: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 714170. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Feikin, D.R.; Higdon, M.M.; Abu-Raddad, L.J.; Andrews, N.; Araos, R.; Goldberg, Y.; Groome, M.J.; Huppert, A.; O'Brien, K.L.; Smith, P.G.; et al. Duration of effectiveness of vaccines against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease: Results of a systematic review and meta-regression. *Lancet Lond. Engl.* **2022**, *399*, 924–944. [\[CrossRef\]](#)
31. Tenforde, M.W.; Self, W.H.; Adams, K.; Gaglani, M.; Ginde, A.A.; McNeal, T.; Ghamande, S.; Douin, D.J.; Talbot, H.K.; Casey, J.D.; et al. Association Between mRNA Vaccination and COVID-19 Hospitalization and Disease Severity. *JAMA* **2021**, *326*, 2043–2054. [\[CrossRef\]](#)
32. EMA COVID-19 Treatments. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/covid-19-treatments> (accessed on 24 March 2023).

33. Beigel, J.H.; Tomashek, K.M.; Dodd, L.E.; Mehta, A.K.; Zingman, B.S.; Kalil, A.C.; Hohmann, E.; Chu, H.Y.; Luetkemeyer, A.; Kline, S.; et al. Remdesivir for the Treatment of COVID-19—Final Report. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 1813–1826. [[CrossRef](#)]
34. Owen, D.R.; Allerton, C.M.N.; Anderson, A.S.; Aschenbrenner, L.; Avery, M.; Berritt, S.; Boras, B.; Cardin, R.D.; Carlo, A.; Coffman, K.J.; et al. An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science* **2021**, *374*, 1586–1593. [[CrossRef](#)]
35. Taylor, P.C.; Adams, A.C.; Hufford, M.M.; de la Torre, I.; Winthrop, K.; Gottlieb, R.L. Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* **2021**, *21*, 382–393. [[CrossRef](#)]
36. Robinson, P.C.; Liew, D.F.L.; Tanner, H.L.; Grainger, J.R.; Dwek, R.A.; Reisler, R.B.; Steinman, L.; Feldmann, M.; Ho, L.-P.; Hussell, T.; et al. COVID-19 therapeutics: Challenges and directions for the future. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2022**, *119*, e2119893119. [[CrossRef](#)]
37. Robb, C.T.; Goepp, M.; Rossi, A.G.; Yao, C. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, prostaglandins, and COVID-19. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177*, 4899–4920. [[CrossRef](#)]
38. Kragholm, K.; Torp-Pedersen, C.; Fosbol, E. Non-steroidal anti-inflammatory drug use in COVID-19. *Lancet Rheumatol.* **2021**, *3*, e465–e466. [[CrossRef](#)]
39. Kushner, P.; McCarberg, B.H.; Grange, L.; Kolosov, A.; Haveric, A.L.; Zucal, V.; Petruschke, R.; Bissonnette, S. The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in COVID-19. *Npj Prim. Care Respir. Med.* **2022**, *32*, 35. [[CrossRef](#)]
40. Brown, J.D.; Winterstein, A.G. Potential Adverse Drug Events and Drug-Drug Interactions with Medical and Consumer Cannabidiol (CBD) Use. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 989. [[CrossRef](#)]
41. Nguyen, L.C.; Yang, D.; Nicolaescu, V.; Best, T.J.; Gula, H.; Saxena, D.; Gabbard, J.D.; Chen, S.-N.; Ohtsuki, T.; Friesen, J.B.; et al. Cannabidiol inhibits SARS-CoV-2 replication through induction of the host ER stress and innate immune responses. *Sci. Adv.* **2022**, *8*, eabi6110. [[CrossRef](#)]
42. Corpetti, C.; Del Re, A.; Seguela, L.; Palenca, I.; Rurgo, S.; De Conno, B.; Pesce, M.; Sarnelli, G.; Esposito, G. Cannabidiol inhibits SARS-CoV-2 spike (S) protein-induced cytotoxicity and inflammation through a PPAR γ -dependent TLR4/NLRP3/Caspase-1 signaling suppression in Caco-2 cell line. *Phytother. Res.* **2021**, *35*, 6893–6903. [[CrossRef](#)]
43. van Breemen, R.B.; Muchiri, R.N.; Bates, T.A.; Weinstein, J.B.; Leier, H.C.; Farley, S.; Tafesse, F.G. Cannabinoids Block Cellular Entry of SARS-CoV-2 and the Emerging Variants. *J. Nat. Prod.* **2022**, *85*, 176–184. [[CrossRef](#)]
44. Zheng, W.; Fan, W.; Zhang, S.; Jiao, P.; Shang, Y.; Cui, L.; Mahesutihan, M.; Li, J.; Wang, D.; Gao, G.F.; et al. Naproxen Exhibits Broad Anti-influenza Virus Activity in Mice by Impeding Viral Nucleoprotein Nuclear Export. *Cell Rep.* **2019**, *27*, 1875–1885.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Structure-Based Design of Novel Naproxen Derivatives Targeting Monomeric Nucleoprotein of Influenza A Virus. Available online: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/07391102.2014.979230?src=getftr> (accessed on 24 March 2023).
46. Structure-Based Discovery of the Novel Antiviral Properties of Naproxen against the Nucleoprotein of Influenza A Virus. Available online: <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/AAC.02335-12?src=getftr> (accessed on 24 March 2023).

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



TMPRSS2-specific antisense oligonucleotides inhibit host cell entry of emerging viruses

Rafal Nowak^a, Monika Gazecka^a, Markus Hoffmann^{b,c}, Ryszard Kierzek^d, Stefan Pöhlmann^{b,c}, Pawel Zmora^{a,*}

^a Department of Molecular Virology, Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland

^b Infection Biology Unit, German Primate Center – Leibniz Institute for Primate Research, Göttingen, Germany

^c Faculty of Biology and Psychology, Georg August University, Göttingen, Germany

^d Department of Structural Chemistry and Biology of Nucleic Acids, Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland

ARTICLE INFO

Handling Editor: Dr. Jasmine Tomar

Keywords:

TMPRSS2

Antisense oligonucleotides

Antivirals

Influenza A virus

SARS-CoV-2

ABSTRACT

Emerging viruses, such as novel influenza A viruses (IAV) and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), pose a constant threat to animal and human health. Identification of host cell factors necessary for viral replication but dispensable for cellular survival might reveal novel, attractive targets for therapeutic intervention. Proteolytic activation of IAV hemagglutinin (HA) and SARS-CoV-2 spike protein (S) by the type II transmembrane serine protease (TTSPs), e.g. TMPRSS2 is sought to be critical for viral spread and pathogenesis. Here, we investigated the secondary structure of *TMPRSS2* mRNA coding sequence and designed *TMPRSS2*-specific antisense oligonucleotides (ASOs). Several of these ASOs markedly reduced the *TMPRSS2* expression and decreased IAV infection and SARS-CoV-2 entry into cells.

1. Introduction

Emerging viruses, such as influenza A viruses (IAVs) and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pose a permanent and evolving threat to both animal and human health. Several antiviral drugs can inhibit IAV replication, spread and pathogenesis, including inhibitors of the IAV neuraminidase, such as oseltamivir, zanamivir, and peramivir (Batool et al., 2023). However, the emergence of antiviral resistance to neuraminidase inhibitors underlines the need for novel anti-IAVs therapies. Monoclonal antibodies, protease inhibitors, RNA polymerase inhibitors, and host cell entry inhibitors are being developed for treatment of SARS-CoV-2 infection (Murakami et al., 2023; Yuan et al., 2023) and the nucleoside analogs remdesivir and molnupiravir, and the Mpro inhibitor paxlovid are already successfully used to treat coronavirus disease 2019 (COVID-19) (Zur et al., 2024). These drugs target viral proteins and are thus susceptible to resistance development and active against a limited spectrum of coronaviruses, which underlines the need for broad spectrum antivirals for pandemic preparedness.

Type II transmembrane serine proteases (TTSPs), including TMPRSS2, TMPRSS3, DESC-1, MSPL, TMPRSS11a, are a family of serine

proteases that are anchored to the cell membrane. These proteases play essential roles in various physiological processes, including digestion, immune response, and tissue remodeling (Bugge et al., 2009; Choi et al., 2009; Menou et al., 2017; Shin and Seong, 2017; Szabo et al., 2003). In addition, TMPRSS2 and other TTSPs have been shown to cleave the surface proteins of diverse respiratory viruses, including the hemagglutinin (HA) of IAVs and the spike (S) proteins of the coronaviruses, SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, MERS-CoV, HCoV-229E (Bertram et al., 2010; Böttcher et al., 2006; Gierer et al., 2013; Glowacka et al., 2011; Hoffmann et al., 2020a; Matsuyama et al., 2010; Shirato et al., 2013; Shulla et al., 2011; Steinhauer, 1999; Zmora et al., 2014, 2015, 2018). HA and S proteins are synthesized as inactive precursor proteins and are converted into their activate forms by proteolytic cleavage, a process that is termed priming or, for historic reasons, activation. Activation is essential for IAV and coronavirus infectivity and the responsible proteases are attractive targets for antiviral intervention. Importantly, TMPRSS2 was not only shown to activate IAV and coronaviruses in cell culture but knock-out of TMPRSS2 was reported to protect mice from spread and pathogenesis of several IAVs (Hatesuer et al., 2013; Lambert et al., 2018, 2019, 2020; Tarnow et al., 2014) and the highly pathogenic coronaviruses SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 and MERS-CoV

* Corresponding author.

E-mail address: pzmora@ibch.poznan.pl (P. Zmora).

<https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.110218>

Received 14 March 2024; Received in revised form 6 August 2024; Accepted 30 August 2024

Available online 3 September 2024

0042-6822/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

(Iwata-Yoshikawa et al., 2019, 2022). Thus, TMPRSS2 seems to be an essential host factor for several IAV and coronaviruses and the finding that knock-out of TMPRSS2 is not associated with a phenotype in the absence of infection (Kim et al., 2006) suggests that this protease can be targeted for therapeutic intervention without inducing major unwanted side effects.

Protease inhibitors like camostat and nafamostat, were developed for indication unrelated to infection but were subsequently shown to inhibit TMPRSS2 (Fujimoto et al., 2022; Hoffmann et al., 2020b; Kim et al., 2023; Kinoshita et al., 2022; Seccia et al., 2023; Tobback et al., 2022; Zhuravel et al., 2021). Although some evidence was obtained that such inhibitor can be used for treatment of IAV infection (Lee et al., 1996; Zhirnov et al., 2011), clinical evaluation of intravenous (IV) camostat and nafamostat for COVID-19 treatment showed modest or no significant benefit to patients (Gunst et al., 2021; Kim et al., 2023). However, studies with animal models suggest that application of protease inhibitors directly to the airways via aerosolization can result in potent antiviral activity and protect against COVID-19 (Iwata-Yoshikawa et al., 2022; Li et al., 2021; Shapira et al., 2022). Furthermore, treatment of COVID-19 patients with aerosolized aprotinin, a protease inhibitor active against TMPRSS2 and other proteases, was shown to be suitable for safe and effective COVID-19 treatment (Redondo-Calvo et al., 2022). However, neither camostat nor nafamostat or aprotinin are specific for TMPRSS2 and highly specific inhibitors are needed to further increase safety and efficacy of therapeutic approaches.

Antisense oligonucleotide (ASO) allow to specifically target expression of host cell factors, thereby disrupting viral replication, and hold therapeutic potential (Bajan and Hutvagner, 2020). Therefore, we sought to determine the RNA secondary structure of the *TMPRSS2* mRNA coding sequence, and to employ this information to design *TMPRSS2*-specific ASOs, which were then to be tested for antiviral activity. Here, we report *TMPRSS2*-specific ASO that reduce IAV infection and cell entry of SARS-CoV-2.

2. Material & methods

2.1. Oligonucleotide synthesis

5-FAM labeled DNA primers for reverse transcription in SHAPE experiments and 2'-O-methyl-LNA antisense oligoribonucleotides were synthesized on a BioAutomation MerMade12 DNA/RNA synthesizer using cyanoethyl phosphoramidite chemistry. The details of deprotection and purification of oligoribonucleotides were previously described (Piasecka et al., 2019). Thin-layer chromatography (TLC) purification of the oligonucleotides was carried out on Merck 60 F254 TLC plates with the mixture of 1-propanol/aqueous ammonia/water = 55:35:10 (v/v/v). Concentrations of all oligonucleotides were measured with the UV spectrophotometer NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

2.2. Preparation of target RNA fragments

RNA fragments for structure probing were prepared by *in vitro* transcription from a DNA template prepared in a PCR reaction. The sequence of interest was preceded by a T7 polymerase promoter sequence and was used as a template for *in vitro* transcription with the MEGashortscript™ Kit (Ambion/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The sequence integrity of the obtained PCR products that served as matrices for *in vitro* transcription was verified by Sanger sequencing.

2.3. Chemical mapping

2 pmol of RNA was used for a single experiment. The RNA was folded in a buffer containing 300 mM sodium chloride, 5 mM magnesium chloride, and 50 mM HEPES, pH 7.5 for 5 min at 80 °C, and slowly

cooled down for 30 min. After folding, the RNAs formed one band on native agarose gels consistent with the formation of one structure. The SHAPE method with N-methylisatoic anhydride (NMIA) was used to modify flexible 2'-O-hydroxyl of nucleotide residues. RNA was treated with 8 mM NMIA for 60 min and incubated at 37 °C. A control reaction was performed in the same conditions without reagent. Mapping reaction was terminated by ethanol precipitation.

2.4. Primer extension and mapping data analysis

Chemically mapped nucleotides were identified by reverse transcription, starting from proper 5-FAM labeled primers specific to tested RNAs. Some of the primers contained LNA-modified nucleotides that raise the stabilities of RNA–DNA duplexes, simultaneously increasing transcription efficiency. A reverse transcription reaction was performed using SuperScript III First-Strand Synthesis system (Invitrogen, Waltham, MA, USA). For each reaction, 2 pmol of RNA and 1 pmol of the primer were used. Primer extension reactions were performed at 55 °C for 90 min with reverse transcriptase SuperScript III. Reactions were terminated by ethanol precipitation. For every probe, one ddNTP ladder was prepared. The final DNA product was separated by capillary electrophoresis using ABI 3130xl Genetic Sequencer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The readout was performed in the Laboratory of Molecular Biology Techniques at the Adam Mickiewicz University, Poznan, Poland. Chemical mapping data, such as ABI files, were analyzed with QuShape. Reactive nucleotides were recognised by comparing dideoxy sequencing ladders along with a mass marker. The 2% of the highest peaks were excluded and the next 8% of the peak intensities were used to calculate the average value. To receive proper nucleotide reactivity, all peak intensities were divided by the average. Reactivities were normalized on a scale of 0–1.5, where 0 suggests not reactive and 1.5 is highly reactive. Reactivities >0.7 are considered as strong, 0.3–0.7 as medium, and <0.3 as weak. Nucleotides with no data were indicated as –999. Normalized SHAPE reactivities from each primer extension reaction were processed independently. All calculated data were used for secondary structure prediction with RNAstructure 6.4 software. For all mapping experiments, at least three datasets were collected.

2.5. Cells and viruses

Calu-3 (ATCC HTB-55), Caco-2 (ATCC HTB-37) and genetically modified Vero-E6 cells with stable TMPRSS2 expression (Vero-TMPRSS2) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco). All media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1x PS (100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin) and cells were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ humidified incubator. All cell lines were regularly checked for mycoplasma contamination. Every third to fourth passage Vero-TMPRSS2 culture medium was supplemented with 50 µg/ml blasticidin. The influenza A virus A/PR/8/34 (H1N1) was reconstituted with 8-plasmid system in MDCK cells. Cell-free supernatants of virus stocks were kept in aliquots at –80 °C.

2.6. Cytotoxicity of TMPRSS2 mRNA targeting ASOs

For the cell viability assays, Calu-3 (ATCC HTB-55), Caco-2 (ATCC HTB-37) and Vero-TMPRSS2 cells were seeded in 96-well plates at a density of 2×10^5 cells/mL and incubated overnight at 37 °C and 5% CO₂. After 24 h cells were washed with warm PBS and incubated with ASOs or positive (TMPRSS2 siRNA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and negative (scramble siRNA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) controls. The cell viability was measured after 48 h using the CellTiter-Glo® Assay (Promega, Madison, Wisconsin, USA) according to the manufacturer's recommendations. After 10 min of incubation with 50 µl of reagent, the lysates were transferred to white 96-well plates and the luminescence (200–300 nm)

in each well was measured using the Hidex Sense Plate Reader (Hidex, Turku, Finland). In this assay, the luciferase activity is directly proportional to the number of living cells and results were compared to those obtained with cells exposed only to culture medium.

2.7. Effects of ASOs on IAV infection and TMPRSS2 expression

Calu-3 (ATCC HTB-55), Caco-2 (ATCC HTB-37) and Vero-TMPRSS2 cells were seeded in 24-well plates at 2×10^5 cells/ml and after a 24 h incubation at 37 °C, transfected using Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). For this, 2.5 µl of Lipofectamine (2000) was diluted in 60 µl Opti-MEM (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) and the mixture was incubated for 10 min at room temperature (RT). Next, ASOs or TMPRSS2/scramble siRNA were diluted with Opti-MEM and 60 µl of the solution was mixed gently with Lipofectamine-Opti-MEM solution and incubated for 20 min at RT. In general, the final concentration of ASOs during transfection was 250 nM. After overnight incubation, the transfection medium was replaced with standard culture media. For transfection efficiency control, cells were transfected with 1 µg plasmid coding for GFP and after 24 h post transfection we measured GFP fluorescence. At 24 h post-transfection the cells were incubated in an infection medium (DMEM supplemented with 0.2% BSA, 100 U/ml of penicillin, and 100 µg/ml of streptomycin) containing A/PR/8/34 (H1N1) at an MOI of 0.01. After 1 h of incubation at 37 °C and 5% CO₂ the infection medium was removed and the cells were washed with PBS, and a fresh infection medium was added. Supernatants and cells were collected after 48 h.

The number of viral RNA genome copies in the culture supernatants was determined by qRT-PCR. For this, the viral RNA was isolated from cell-free supernatants with NucleoSpin RNA Virus Kit (Macherey Nagel, Duren, Germany) according to the manufacturer's protocol. For the determination of viral RNA copy numbers, the qRT-PCR was carried out using an in house reagent kit with gene-specific primers, probe, reverse transcriptase, and polymerase (Piasecka et al., 2019). The qRT-PCR protocol consists of 20 min reverse transcription at 50 °C, 15 min primary denaturation at 95 °C, and 40 cycles of 94 °C denaturation for 15 s, and annealing with extension at 60 °C for 60 s. The reaction was performed using the BIO-RAD CFX96 Real-Time system (Bio-Rad, Hercules, California, USA). To define the limit of detection (LOD) and to generate a standard curve to calculate the absolute copy numbers from the cycle threshold (Ct) value, 10-fold dilutions of previously described RNA transcribed from an IAV template were used as standards. Six serial dilutions starting from 3.6×10^7 total number of viral RNA genome copies were used.

Subsequently, we analyzed the TMPRSS2 expression in the above-mentioned cell lines treated with ASOs and infected with IAV. For this, the total cellular RNA was isolated with NucleoSpin RNA Kit (Macherey Nagel, Duren, Germany), according to the manufacturer's protocol. Then, the isolated RNA was reverse transcribed with SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and Random Hexamers (Invitrogen, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Next, qPCR was carried out using TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and specific assays: Hs00237175_m1 (TMPRSS2) and Hs99999908_m1 (β-glucuronidase, GUSB). The qPCR protocol consists of 2 min UNG incubation at 50 °C, 2 min primary denaturation at 95 °C, and 40 cycles of 95 °C denaturation for 1 s, and annealing with extension at 60 °C for 20 s. The reaction was performed using the BIO-RAD CFX96 Real-Time system (Bio-Rad, Hercules, California, USA). The TMPRSS2 expression fold change was calculated based on the Ct values using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001)

2.8. ASOs mediated inhibition of SARS-CoV-2 virus entry

To evaluate the ASOs inhibition of SARS-CoV-2 virus entry by ASOs, a luciferase encoding VSV vector, VSV*ΔG-FLuc (Zettl et al., 2020) pseudotyped with SARS-CoV-2 S protein was used. For this, VSV*ΔG-FLuc pseudotypes encoding GFP and firefly luciferase were propagated in transgenic BHK-21 (G43) cells (kind gift of Prof. Gert Zimmer, Institute of Virology and Immunology, Mittelhäusern and Bern, Bern, Switzerland). The VSV-G protein was expressed after mifepristone induction. Next, HEK293T cells were transfected with plasmids encoding SARS-CoV-2 S protein, pCG1-SARS-2-S (Hu.1) (Hoffmann et al., 2020a) and transduced with VSV-pseudotypes. Supernatants were removed after 1h incubation at 37 °C and cells were washed with warm PBS. Neutralizing anti-VSV-G antibody, produced in I1-hybridoma cell line (ATCC CRL-2700) was added to inactivate residual VSV-G and supernatant containing VSV-SARS-CoV-2 S pseudotypes was harvested at 48 h post transduction. To examine the effect of the ASOs on the viral entry into cells, the cell lines Calu-3, Caco-2 and Vero-TMPRSS2 were seeded at 2×10^4 cells/well density on 96-well plates. At the next day, cells were transfected with ASOs or positive/negative controls at a final concentration of 250 nM, using Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent, as described above. After overnight incubation the transfection medium was replaced with standard culture medium. At 24 h post-transfection the cells were incubated with VSV-SARS-CoV-2 S pseudotypes for 1h at 37 °C. Next, fresh medium was added, and luminescence was measured at 48h post transduction with ONE-Glo substrate (Promega) on Hidex Sense plate reader (Hidex, Turku, Finland).

2.9. Statistical analysis

One-way ANOVA with the Tukey post-hoc test was used to test statistical significance of data originating from single representative experiments performed in triplicate and independently repeated at least three times. The statistical differences between tested groups are marked with ^{a,b,c}. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 9 software.

3. Results

3.1. Secondary structure model of TMPRSS2 mRNA coding sequence

Chemical mapping allows obtaining data about single stranded regions of RNA that are accessible to modifying reagents and double stranded regions that are inaccessible to chemical modification. TMPRSS2 mRNA coding sequence secondary structure was studied using chemical mapping with NMIA, which modifies all accessible nucleotides at the 2'OH. The secondary structure of TMPRSS2 mRNA coding sequence was chemically mapped in buffer A (300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM HEPES, pH 7.5) at 80 °C. NMIA reacted strongly with 217 and moderately with 372 out of 1590 nucleotides. Thus, 62.9% of nucleotides showed only weak or no reactivity, indicating that the TMPRSS2 mRNA coding sequence is highly structured *in vitro*. The data from chemical mapping were uploaded into the RNAstructure 6.4 program as described in Material and methods. The resulting base pairing model for the TMPRSS2 mRNA coding sequence is presented in (Fig. 1).

The TMPRSS2 mRNA coding sequence structural model with the lowest Gibbs free energy was selected as the final model structure. The secondary structure of TMPRSS2 mRNA coding sequence is structured and complex. The free energy is −561.0 J and several hairpins and internal bulges were identified. The 5' and 3' ends are unpaired. There are four single-stranded regions longer than 7 nucleotides, modified by NMIA reagent. There are also helical regions inside the structure that cannot be mapped, including nucleotides 317–344, 651–703 and 1533–1590 (Fig. 1).

Based on the secondary structure obtained, ten specific ASOs

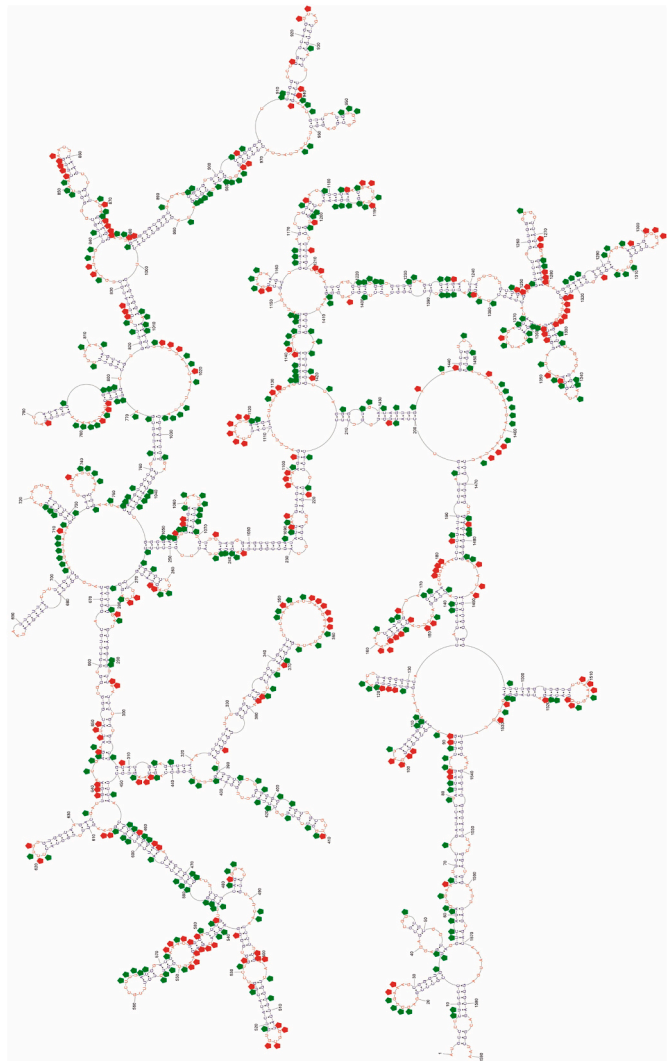


Fig. 1. Self-folding of *TMPRSS2* coding sequence mRNA by RNAstructure 6.4 using as constrains values: SHAPE reactivities converted to pseudo-free energies. Sites of chemical modifications using the NMIA reagent, based on reactivity data: strong ($0.7 \geq$) and medium ($0.7-0.3$) reactivities are marked on the structure in red and green, respectively.

Table 1
The designed *TMPRSS2*-specific antisense oligonucleotide used in this study.

2'OME ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES	
RN29	UAU ^L UGU ^L UCU ^L UCGAAG
RN33	UUGGAGUCAUAAUUUG
RN34	UGGAU ^L UGU ^L UAGA
RN37	AGUU ^L CAAGUUGA
RN39	AUCCACUAUUCUU
RN40	AGGAU ^L GAAGU ^L UU
RN41	CACCGAUUCUCGUCC
RN43	UUU ^L CUU ^L AGU ^L CUUU
RN44	GUUUUCAUAGUAAGG
RN45	CACGCAGUGGCGCGC

*L – LNA (Locked Nucleic Acid) modification.

(Table 1) were designed, nine of them targeting single-stranded regions and one ASO, RN45, targeting a double-stranded region as a negative control (Fig. 2). All ASOs were primarily 2'-O-methyl RNA, with several also containing locked nucleic acid (LNA) nucleotides to stabilize binding to target sequence. All designed ASO were fully complementary to *TMPRSS2* mRNA coding sequence.

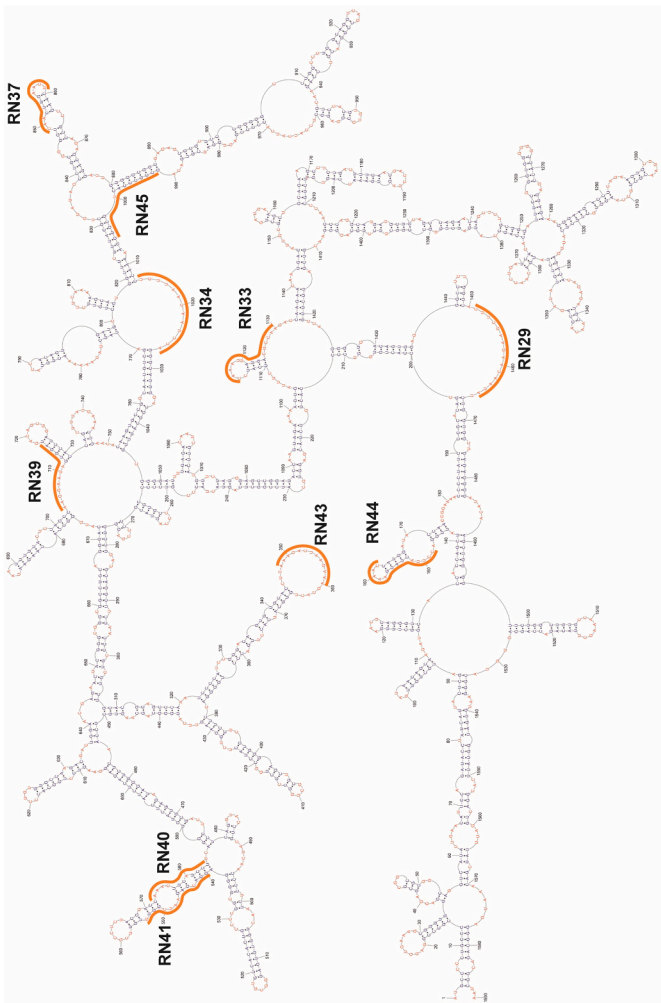
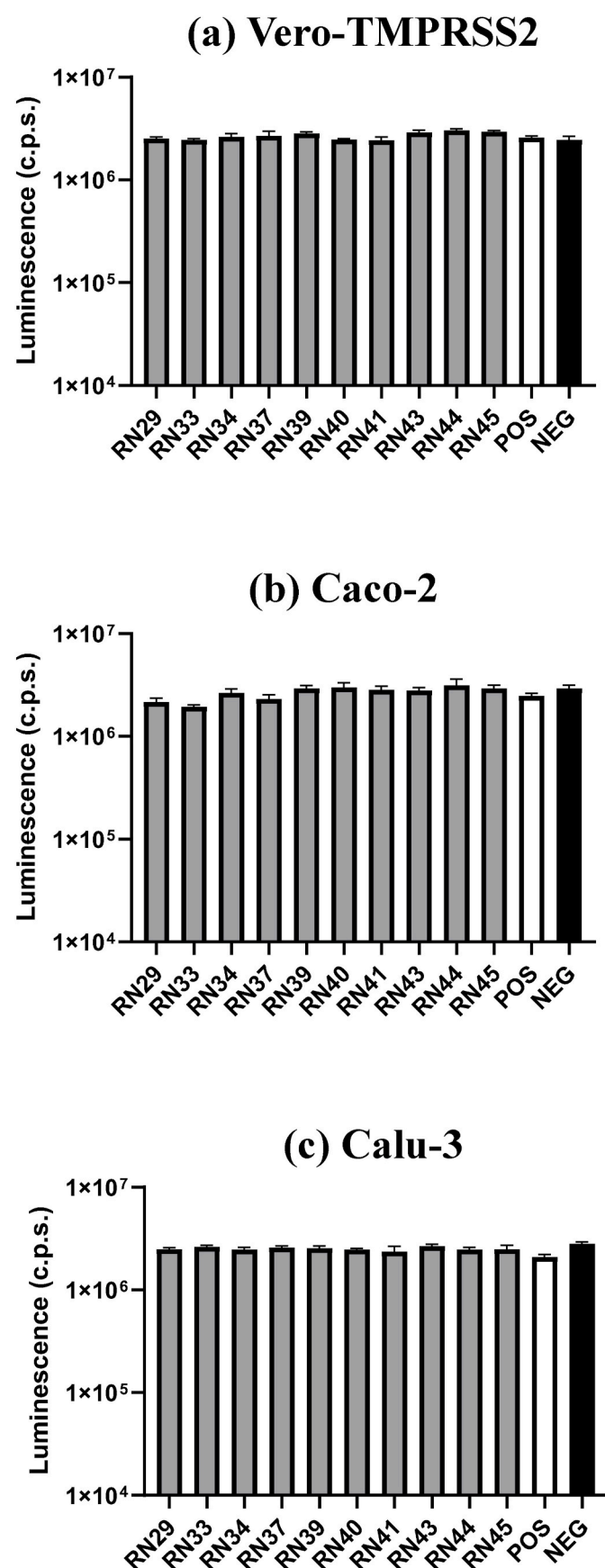


Fig. 2. Targets of ASOs in predicted secondary structure of *TMPRSS2* mRNA coding sequence. Orange lines indicate regions targeted by ASOs. All ASOs are complementary to the *TMPRSS2* mRNA.

3.2. Inhibition of IAV infection by ASOs

First, all tested ASOs were tested for cytotoxicity in Vero-TMPRSS2, Caco-2, Calu-3 cells employing CellTiter-Glo® Assay. None impacted cell viability at 250 nM, the concentration employed for analyzing antiviral activity (Fig. 3). In the context of Vero-TMPRSS2 cells, seven of the ten ASOs tested showed significant inhibition of IAV replication, which was determined using qRT-PCR in comparison to cells transfected with commercially available scramble siRNA (negative control), as well as cell treated with ASO RN45 targetting double stranded region of *TMPRSS2* mRNA secondary structure (Fig. 4a, left panel). The most effective oligonucleotide was RN29, which inhibited IAV replication by more than 10-fold. The ASOs RN34, RN40 and RN45 showed no significant inhibitory effect. There are no statistically significant differences between IAV titer in cells transfected with ASOs RN29, RN33, RN37, RN39, RN41, RN43, RN44 and positive control (cells transfected with *TMPRSS2* siRNA). In Caco-2 cells, five of ten tested ASOs, i.e. RN33, RN34, RN39, RN41 and RN43 inhibited IAV infection with titer reductions of 5-10-fold in comparison to the ASO RN45 and negative control (scramble siRNA, Fig. 4b, left panel). We did not notice any significant difference between RN33, RN34, RN39, RN41, RN43 and positive control (*TMPRSS2* siRNA). In Calu-3 cells all ten ASOs led to the significant reduction in IAV titer (Fig. 4c, left panel). However, RN40 showed the best performance inhibiting IAV titer by more than 10-fold. In addition, we found statistically significant differences between all ten



(caption on next column)

Fig. 3. Cytotoxicity of ASOs. To analyze the potential unwanted cytotoxic effect of ASOs, Vero-TMPRSS2 (a), Caco-2 (b) and Calu-3 (c) were treated with ASOs or negative (NEG, scramble siRNA) and positive (POS, TMPRSS2 siRNA) controls. The cell viability was analyzed at 48h post treatment using the CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay Protocol (Promega). The results of representative experiments performed with triplicate samples are shown. Error bars indicate standard deviations (SD). Similar results were obtained in three independent experiments.

ASOs inhibiting IAV infection and positive (TMPRSS2 siRNA) as well as negative (scramble siRNA) controls. Finally, we observed that only ASOs RN33, RN39, RN41 and RN43 inhibited IAV infection in all tested cell lines, suggesting that *TMPRSS2* mRNA secondary structure may be cell line dependent, and that only some conserved structural motifs are present in all cell lines and can thus be efficiently targeted by ASOs.

3.3. Inhibition of *TMPRSS2* expression by ASOs

We next analyzed the effect of ASOs on the *TMPRSS2* expression. Unfortunately, the expression of *TMPRSS2* in the selected cells was too low to be detected with immunoblotting (data not shown). Therefore, we determined the level of *TMPRSS2* transcript, since it was found that ASOs can diminish mRNA levels by acting through the no-go decay pathway (Liang et al., 2019). Using RT-PCR we observed that all ASOs inhibiting IAV infection decreased the *TMPRSS2* mRNA level in all tested cell lines with similar efficiency as the positive control, *TMPRSS2* siRNA (Fig. 4a, b, c, right panel). The RN45 ASO targeting double stranded mRNA motif did not change the *TMPRSS2* transcript level in Caco-2 and Calu-3, as expected (Fig. 4b and c, right panel). To sum up, we observed a correlation of *TMPRSS2* expression interference and antiviral activity of ASOs, confirming that ASOs mediated *TMPRSS2* silencing underlies antiviral activity.

3.4. Inhibition of SARS-CoV-2 cell entry by ASOs

We finally investigated the effect of ASOs on the cell entry of SARS-CoV-2 using VSV-pseudotypes bearing SARS-CoV-2 S protein. In this system, entry efficiency is determined by measuring the activity of VSV-encoded luciferase in cell lysates and the system adequately models SARS-CoV-2 cell entry and its inhibition (Condor Capcha et al., 2021; Nie et al., 2020; Schmidt et al., 2020; Zettl et al., 2020). Our analyses demonstrated that in Vero-TMPRSS2 cells, seven of ten ASOs: RN29, RN33, RN34, RN39, RN41, RN43 and RN45 markedly inhibited entry as compared to the negative control (Fig. 5a, left panel). Interestingly, four of ASOs: RN29, RN39, RN41 and RN43 showed almost ten fold inhibition. Furthermore, all ten ASOs displayed substantial inhibitory activity in Caco-2 cells (Fig. 5b, left panel). In contrast, none of the ASOs inhibited entry driven by VSV-G, indicating that inhibition of SARS-CoV-2 S protein-driven entry was specific (Fig. 5a and b, right panel). Finally, we were unable to transduce the Calu-3 cells with produced VSV-SARS-CoV-2 S pseudotypes, likely due to insufficient titers. The differences between IAV infection and VSV-based pseudotypes transduction efficiency may be also an answer for the differences in the number of particular ASOs inhibiting IAV infection and VSV-pseudotypes transduction in Caco-2 cells. Also, the differences in the infection and transduction conditions may affect the *TMPRSS2* structure and cause above mentioned discrepancies. However, experiments with SARS-CoV-2 entry into cells confirmed that *TMPRSS2* mRNA structural motifs specific for ASOs RN33, RN39, RN41 and RN43 are conserved and may constitute targets to inhibit virus entry into cells.

4. Discussion

ASOs are artificial single-stranded fragments of DNA or RNA, typically ranging from 12 to 30 nucleotides in length (Szabat et al., 2020), which selectively bind to complementary regions and obstruct

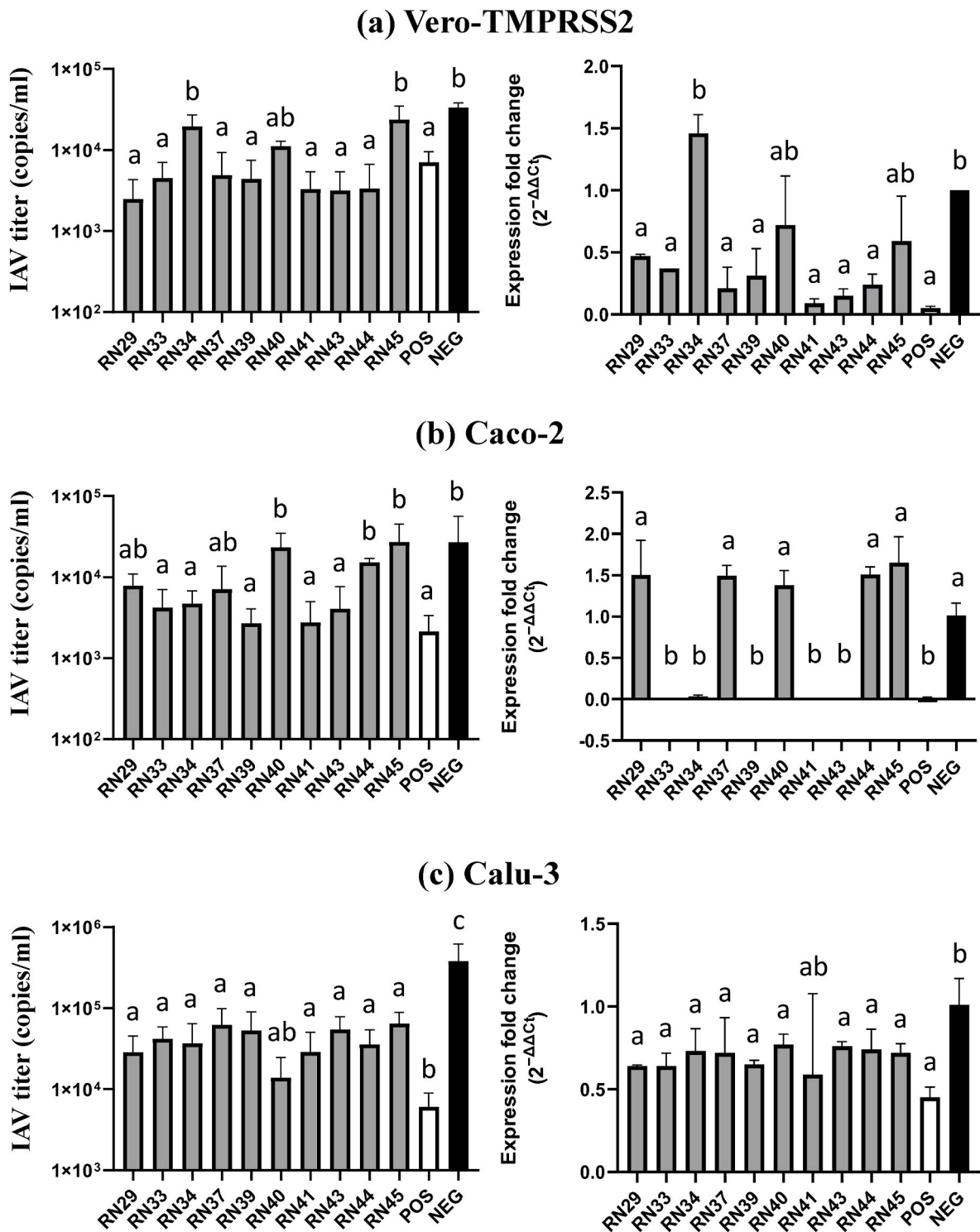


Fig. 4. Inhibition of influenza A virus infection and *TMPRSS2* expression by ASOs. Vero-TMPRSS2 (a), Caco-2 (b) and Calu-3 (c) were transfected with ASOs or negative (NEG, scramble siRNA) and positive (POS, *TMPRSS2* siRNA) controls and infected with influenza virus A/PuertoRico/8/34 at an MOI 0.01. Copy number of viral RNA in supernatant (left panel) and *TMPRSS2* expression in cells (right panel) were determined by RT qPCR. The results of representative experiments performed with triplicate samples are shown. Error bars indicate standard deviations (SD). Similar results were obtained in three independent experiments. ^{a,b,c} - values with different superscript letters differ $p < 0.05$.

expression of target genes through diverse mechanisms. The primary categories of ASOs based on their mode of action include steric blockers of translation, modulators of splicing, and recruiters of protein factors (e.g., RNase H), leading to the degradation of the target RNA (Bajan and Hutvagner, 2020). The modulatory effect of ASOs is determined by the functions of the target RNA and the selected interaction site,

emphasizing the importance of predicting the RNA secondary structure in the design process. This prediction aids in identifying local structures and conserved motifs accessible to ASO hybridization. Several factors, including pharmacokinetics, toxicity and delivery method, can influence the activity of ASOs on their intended RNA targets. Therefore, the design of specific ASOs should consider these factors to optimise the

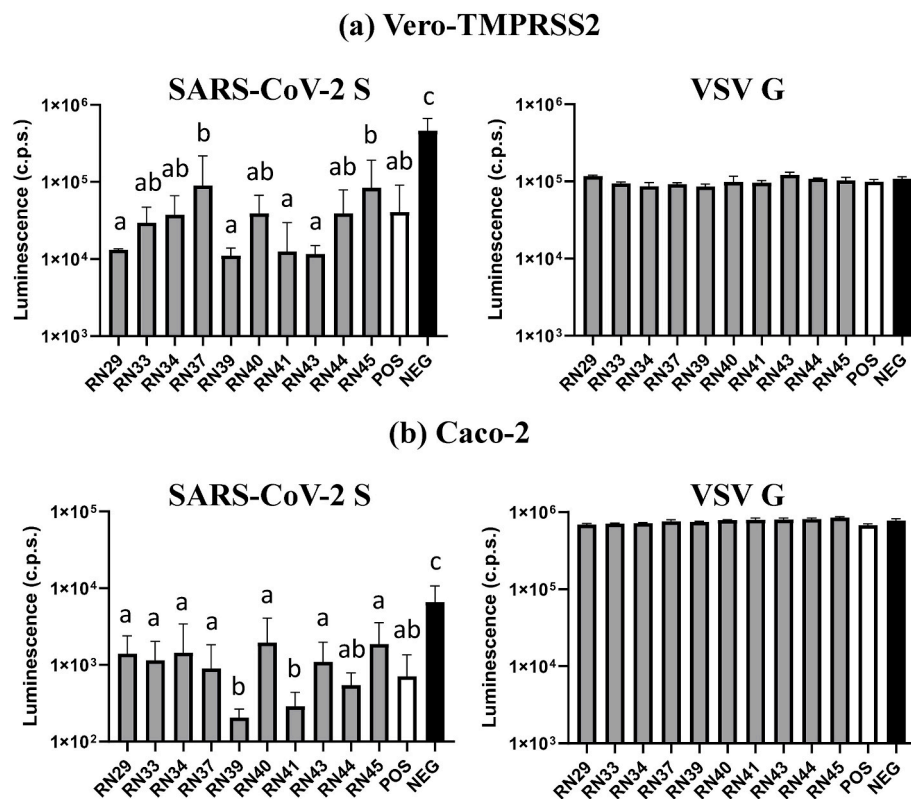


Fig. 5. Inhibition of SARS-CoV-2 entry by ASOs.

ASOs or negative (NEG, scrambled siRNA) and positive (POS, TMPRSS2 siRNA) controls were transfected into the indicated cell lines at 250 nM final concentration. Subsequently, the Vero-TMPRSS2 (a) and Caco-2 (b) cells were transduced with VSV-pseudotypes bearing SARS-CoV-2 S protein (left panel) or VSV-G (right panel) for 1h. Next, fresh medium was added and luciferase activities in cell lysates determined at 48 h post transduction. The results of a single experiment carried out with triplicate samples are shown; error bars indicate standard deviations (SD). Similar results were obtained in three separate experiments. ^{a,b,c} - values with different superscript letters differ $p < 0.05$.

therapeutic efficacy in cells (Bennett and Swayze, 2010).

TMPRSS2 constitutes a potential target for therapeutic intervention. Here, we analyzed the secondary structure of the TMPRSS2 mRNA and the ability of ASOs directed against TMPRSS2 to inhibit IAV and coronavirus infection. The current investigation of the TMPRSS2 coding sequence suggests that the RNA secondary structure might have functional relevance *in vitro*. The secondary structure plays a crucial role in determining RNA function. RNAs exhibit a significant inclination to self-folding, resulting in the formation of intricate structural motifs (Hendrix et al., 2005). In our research, we obtained the secondary structure of the TMPRSS2 coding sequence using recognised *in vitro* experimental methodology and bioinformatics software, as well as selected potential targets for ASOs (Fig. 1). Experimentally identified, thermodynamically stable motifs offer a unique understanding of the folding landscape of TMPRSS2 mRNA. Such *in vitro* RNA structure determinations appear to be valuable for the consideration of accessible targets within TMPRSS2 mRNA and could potentially remain suitable for intervention within other members of the TTSP family, where potentially conserved structural motifs could exist.

RNA structural motifs featuring extensive unpaired nucleotide stretches, including internal loops and bulges, multibranch loops, long hairpin loops and extended terminal single-stranded regions, appear to be advantageous targets for ASOs (Svoboda and Di Cara, 2006). The TMPRSS2 mRNA coding sequence secondary structure contains many hairpins with varying helix and loop lengths (see Fig. 2). RNA hairpins constitute a common structural element in biologically essential RNAs and serve diverse functions in nature. They could possibly act as recognition sites for RNA-protein and RNA-RNA intermolecular interactions (Emory et al., 1992; Li et al., 2014) and offer protection to RNA from degradation (Uhlenbeck, 1990). Additionally, hairpin motifs

serve as initiation points during the folding of more complex RNA structures. Notably, the process of forming these hairpin structures can progress within tens of microseconds (Crothers et al., 1974) and provide a high level of thermodynamic stability for a given motif; for instance, a single GC pair can stabilize a helix by 3 kcal/mol at 37 °C (Xia et al., 1998).

A limited number of publications describe the use of TMPRSS2-specific ASOs. Böttcher-Friebertshäuser and coworkers designed an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting TMPRSS2, which inhibited spread of IAV and SARS-CoV-2 in Calu-3 by interfering with TMPRSS2 splicing (Bestle et al., 2020; Böttcher-Friebertshäuser et al., 2011). In research conducted in 2023, Qiao and colleagues designed ASOs targeted against the SARS-CoV-2 genome and host entry factors ACE2 and TMPRSS2 and tested for their ability to inhibit cellular infection by SARS-CoV-2 (Qiao et al., 2023). Screening of ACE2 and TMPRSS2 ASOs showed that targeting the ACE2 and SARS-CoV-2 genes strongly prevented infection. ASOs targeting TMPRSS2 showed no efficiency; however, all designed ASOs targeted only noncoding sequences, in contrast to our research, where ASOs targeted only coding sequences. The authors suggest that, combined with the demonstrated success of ASOs, the results support further research into the development of ASOs targeting SARS-CoV-2 and host entry factors as potential COVID-19 therapeutics.

The inhibitory effect of designed ASOs may be connected to their structure. All ASOs we designed were tested as completely 2'-O methyl modified RNA. However, RN29, RN34, RN37, RN40 and RN43 were modified with several LNA substitutions. The introduction of 2'-OME modification to RNA is recognised for enhancing its chemical stability, preventing enzymatic degradation, elevating the affinity for RNA targets and augmenting the thermodynamic stability of RNA duplexes (Braasch

et al., 2003; Geary et al., 2015; Kierzek et al., 2006; Prakash et al., 2005). In antisense strategies, chemical modifications are extensively employed to bolster the stability of oligonucleotides, confer resistance to nucleases, enhance target binding, diminish off-target effects and extend overall activity (Piasecka et al., 2019).

The ASOs generally target predicted single-stranded regions with adjacent stems predicted to be dynamic in protein-free *TMPRSS2* mRNA coding sequence particles. We observed that the antiviral activity of some ASOs was cell-type dependent. The ability of ASOs to enter cells and reach the target site within the cell influences their efficacy. Cellular uptake is influenced by factors such as cell type, tissue-specific barriers and the presence of cell membrane transporters. The highest scores for the inhibition of IAV were obtained in Calu-3 cells, a human lung cancer cell line commonly used in cancer research and drug development. Calu-3 cells are epithelial with endogenous *TMPRSS2* expression, and thus can act as respiratory models in preclinical applications, in opposite to Vero-TMPRSS2 and Caco2 cells, which are African green monkey kidney epithelial cells and an immortalised cell line of human colorectal adenocarcinoma, respectively. The cellular response to ASOs can vary among different cell types and tissues. Factors such as the presence of intracellular signalling pathways or immune responses may impact the overall effects (Zupin et al., 2022).

We postulate that *TMPRSS2*-specific ASOs affect translational machinery or may lead to mRNA degradation. Even though the designed ASOs are not aptamers—meaning they do not comprise DNA-RNA-DNA strands so the recruitment of RNase H does not occur—our observations align with those of Liang and colleagues (Liang et al., 2019). Liang demonstrated that ASOs can diminish mRNA levels by acting through the No-Go Decay (NGD) pathway. The NGD mechanism triggers the degradation of mRNA, which is characterised by a multitude of attached and blocked ribosomes on one strand. This inhibition of translation arises from the presence of stable intramolecular or intermolecular RNA structures, enzymatic cutting or chemically damaged sequences. The process of mRNA degradation is dependent on translation and necessitates cleavage by endoribonucleases located upstream of the ribosome aggregation sequence. The aggregation site must be positioned at least 105 nucleotides downstream of the start codon, with the cleavage site occurring upstream of the aggregation site sequence likely situated between ribosomes.

To sum up, we have predicted the *TMPRSS2* mRNA coding sequence secondary structure and proved the antiviral activity of *TMPRSS2*-specific ASOs and showed some therapeutic potential of such compounds. The inhibitory activity of designed ASOs should be further analyzed in more complex models, including the mice challenges with IAVs and SARS-CoV-2.

CRedit authorship contribution statement

Rafal Nowak: Writing – original draft, Investigation, Formal analysis. **Monika Gazecka:** Investigation. **Markus Hoffmann:** Resources. **Ryszard Kierzek:** Methodology. **Stefan Pöhlmann:** Resources, Conceptualization. **Pawel Zmora:** Writing – original draft, Supervision, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was funded by the National Science Centre (Poland) grant UMO-2018/31/F/NZ1/03891. We would like to thank Elżbieta Kierzek and Agnieszka Ruszkowska from the Institute of Bioorganic Chemistry Polish Academy of Sciences for their valuable comments.

References

- Bajan, S., Hutvagner, G., 2020. RNA-based therapeutics: from antisense oligonucleotides to miRNAs. *Cells* 9, 137. <https://doi.org/10.3390/cells9010137>.
- Batool, S., Chokkakula, S., Song, M.-S., 2023. Influenza treatment: limitations of antiviral therapy and advantages of drug combination therapy. *Microorganisms* 11, 183. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010183>.
- Bennett, C.F., Swayze, E.E., 2010. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 259–293. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105654>.
- Bertram, S., Glowacka, I., Blazejewska, P., Soilleux, E., Allen, P., Danisch, S., Steffen, I., Choi, S.-Y., Park, Y., Schneider, H., Schughart, K., Pöhlmann, S., 2010. TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. *J. Virol.* 84, 10016–10025. <https://doi.org/10.1128/JVI.00239-10>.
- Bestle, D., Heindl, M.R., Limburg, H., Van Lam van, T., Pilgram, O., Moulton, H., Stein, D. A., Harges, K., Eickmann, M., Dolnik, O., Rohde, C., Klenk, H.-D., Garten, W., Steinmetzer, T., Böttcher-Friebertshäuser, E., 2020. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. *Life Sci. Alliance* 3, e202000786. <https://doi.org/10.26508/lsa.202000786>.
- Böttcher, E., Matrosovich, T., Beyerle, M., Klenk, H.-D., Garten, W., Matrosovich, M., 2006. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J. Virol.* 80, 9896–9898. <https://doi.org/10.1128/JVI.01118-06>.
- Böttcher-Friebertshäuser, E., Stein, D.A., Klenk, H.-D., Garten, W., 2011. Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2. *J. Virol.* 85, 1554–1562. <https://doi.org/10.1128/JVI.01294-10>.
- Braasch, D.A., Jensen, S., Liu, Y., Kaur, K., Arar, K., White, M.A., Corey, D.R., 2003. RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry* 42, 7967–7975. <https://doi.org/10.1021/bi0343774>.
- Bugge, T.H., Antal, T.M., Wu, Q., 2009. Type II transmembrane serine proteases. *J. Biol. Chem.* 284, 23177–23181. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.021006>.
- Choi, S.-Y., Bertram, S., Glowacka, I., Park, Y.W., Pöhlmann, S., 2009. Type II transmembrane serine proteases in cancer and viral infections. *Trends Mol. Med.* 15, 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.05.003>.
- Condor Capcha, J.M., Lambert, G., Dykxhoorn, D.M., Salerno, A.G., Hare, J.M., Whitt, M. A., Pahwa, S., Jayaweera, D.T., Shehadeh, L.A., 2021. Generation of SARS-CoV-2 spike pseudotyped virus for viral entry and neutralization assays: a 1-week protocol. *Front. Cardiovasc. Med.* 7, 618651. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.618651>.
- Crothers, D.M., Cole, P.E., Hilbers, C.W., Shulman, R.G., 1974. The molecular mechanism of thermal unfolding of Escherichia coli formylmethionine transfer RNA. *J. Mol. Biol.* 87, 63–88. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90560-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90560-9).
- Emory, S.A., Bouvet, P., Belasco, J.G., 1992. A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in Escherichia coli. *Genes Dev.* 6, 135–148. <https://doi.org/10.1101/gad.6.1.135>.
- Fujimoto, K.J., Hobbs, D.C.F., Umeda, M., Nagata, A., Yamaguchi, R., Sato, Y., Sato, A., Ohmatsu, K., Ooi, T., Yanai, T., Kimura, H., Murata, T., 2022. In silico analysis and Synthesis of nafamostat derivatives and evaluation of their anti-SARS-CoV-2 activity. *Viruses* 14, 389. <https://doi.org/10.3390/v14020389>.
- Geary, R.S., Norris, D., Yu, R., Bennett, C.F., 2015. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 87, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.008>.
- Gierer, S., Bertram, S., Kaup, F., Wrensch, F., Heurich, A., Krämer-Kühl, A., Welsch, K., Winkler, M., Meyer, B., Drosten, C., Dittmer, U., von Hahn, T., Simmons, G., Hofmann, H., Pöhlmann, S., 2013. The spike protein of the emerging betacoronavirus EMC uses a novel coronavirus receptor for entry, can be activated by TMPRSS2, and is targeted by neutralizing antibodies. *J. Virol.* 87, 5502–5511. <https://doi.org/10.1128/JVI.00128-13>.
- Glowacka, I., Bertram, S., Müller, M.A., Allen, P., Soilleux, E., Pfefferle, S., Steffen, I., Tsegaye, T.S., He, Y., Gnirss, K., Niemeyer, D., Schneider, H., Drosten, C., Pöhlmann, S., 2011. Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *J. Virol.* 85, 4122–4134. <https://doi.org/10.1128/JVI.02232-10>.
- Gunst, J.D., Staerke, N.B., Pahus, M.H., Kristensen, L.H., Bodilsen, J., Lohse, N., Dalgaard, L.S., Brønnum, D., Frøbert, O., Hønge, B., Johansen, I.S., Monrad, I., Erikstrup, K., Rosendal, R., Vilstrup, E., Mariager, T., Bove, D.G., Offensen, J., Shakar, S., Cajander, S., Jørgensen, N.P., Sriharan, S.S., Breining, P., Jespersen, S., Mortensen, K.L., Jensen, M.L., Kolte, L., Frattari, G.S., Larsen, C.S., Storgaard, M., Nielsen, L.P., Tolstrup, M., Sædder, E.A., Østergaard, L.J., Ngo, H.T.T., Jensen, M.H., Højen, J.F., Kjolby, M., Søgaard, O.S., 2021. Efficacy of the TMPRSS2 inhibitor camostat mesilate in patients hospitalized with Covid-19: a double-blind randomized controlled trial. *EclinicalMedicine* 35, 100849. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.100849>.
- Hatesuer, B., Bertram, S., Mehnert, N., Bahgat, M.M., Nelson, P.S., Pöhlmann, S., Schughart, K., 2013. TmpRSS2 is essential for influenza H1N1 virus pathogenesis in mice. *PLoS Pathog.* 9, e1003774. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003774>.
- Hendrix, D.K., Brenner, S.E., Holbrook, S.R., 2005. RNA structural motifs: building blocks of a modular biomolecule. *Q. Rev. Biophys.* 38, 221–243. <https://doi.org/10.1017/S0033583506004215>.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T.S., Herrler, G., Wu, N.-H., Nitsche, A., Müller, M.A., Drosten, C., Pöhlmann, S., 2020a. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 181, 271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>.

- Hoffmann, M., Schroeder, S., Kleine-Weber, H., Müller, M.A., Drosten, C., Pöhlmann, S., 2020b. Nafamostat mesylate blocks activation of SARS-CoV-2: new treatment option for COVID-19. *Antimicrob. Agents Chemother.* 64, e00754 <https://doi.org/10.1128/AAC.00754-20>.
- Iwata-Yoshikawa, N., Kakizaki, M., Shiwa-Sudo, N., Okura, T., Tahara, M., Fukushi, S., Maeda, K., Kawase, M., Asanuma, H., Tomita, Y., Takayama, I., Matsuyama, S., Shirato, K., Suzuki, T., Nagata, N., Takeda, M., 2022. Essential role of TMPRSS2 in SARS-CoV-2 infection in murine airways. *Nat. Commun.* 13, 6100. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33911-8>.
- Iwata-Yoshikawa, N., Okamura, T., Shimizu, Y., Hasegawa, H., Takeda, M., Nagata, N., 2019. TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after coronavirus infection. *J. Virol.* 93, e01815–e01818. <https://doi.org/10.1128/JVI.01815-18>.
- Kierzek, E., Mathews, D.H., Ciesielska, A., Turner, D.H., Kierzek, R., 2006. Nearest neighbor parameters for Watson–Crick complementary heteroduplexes formed between 2'-O-methyl RNA and RNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 34, 3609–3614. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl232>.
- Kim, T.S., Heinlein, C., Hackman, R.C., Nelson, P.S., 2006. Phenotypic analysis of mice lacking the tmprss2-encoded protease. *Mol. Cell Biol.* 26, 965–975. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.3.965-975.2006>.
- Kim, Y.-S., Jeon, S.-H., Kim, Junghee, Koh, J.H., Ra, S.W., Kim, J.W., Kim, Yeonjae, Kim, C.K., Shin, Y.C., Kang, B.D., Kang, S.J., Park, C.H., Lee, B., Lee, J.Y., Lee, C.H., Choi, J.-P., Kim, J.Y., Yu, S.N., Peck, K.R., Kim, S.-H., Heo, J.Y., Kim, H.A., Park, H.-J., Choi, J., Han, J., Kim, JooHyun, Kim, H.J., Han, S.H., Yoon, A., Park, M., Park, S., Kim, YuKyung, Jung, M., Oh, M.-D., 2023. A double-blind, randomized, placebo-controlled, phase II clinical study to evaluate the efficacy and safety of camostat mesylate (DWJ1248) in adult patients with mild to moderate COVID-19. *Antimicrob. Agents Chemother.* 67, e0045222 <https://doi.org/10.1128/aac.00452-22>.
- Kinoshita, T., Shinoda, M., Nishizaki, Y., Shiraki, K., Hirai, Y., Kichikawa, Y., Tsushima, K., Shinkai, M., Komura, N., Yoshida, K., Kido, Y., Kakeya, H., Uemura, N., Kadota, J., 2022. A multicenter, double-blind, randomized, parallel-group, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of camostat mesylate in patients with COVID-19 (CANDLE study). *BMC Med.* 20, 342. <https://doi.org/10.1186/s12916-022-02518-7>.
- Lambertz, R.L.O., Gerhauser, I., Nehlmeier, I., Gärtner, S., Winkler, M., Leist, S.R., Kollmus, H., Pöhlmann, S., Schughart, K., 2020. H2 influenza A virus is not pathogenic in Tmprss2 knock-out mice. *J. Virol.* 94, 56. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01323-z>.
- Lambertz, R.L.O., Gerhauser, I., Nehlmeier, I., Leist, S.R., Kollmus, H., Pöhlmann, S., Schughart, K., 2019. Tmprss2 knock-out mice are resistant to H10 influenza A virus pathogenesis. *J. Gen. Virol.* 100, 1073–1078. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001274>.
- Lambertz, R.L.O., Pippel, J., Gerhauser, I., Kollmus, H., Anhlán, D., Hrincius, E.R., Krausz, J., Kühn, N., Schughart, K., 2018. Exchange of amino acids in the H1-haemagglutinin to H3 residues is required for efficient influenza A virus replication and pathology in Tmprss2 knock-out mice. *J. Gen. Virol.* 99, 1187–1198. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001128>.
- Lee, M.G., Kim, K.H., Park, K.Y., Kim, J.S., 1996. Evaluation of anti-influenza effects of camostat in mice infected with non-adapted human influenza viruses. *Arch. Virol.* 141, 1979–1989. <https://doi.org/10.1007/BF01718208>.
- Li, K., Meyerholz, D.K., Bartlett, J.A., McCray, P.B., 2021. The TMPRSS2 inhibitor nafamostat reduces SARS-CoV-2 pulmonary infection in mouse models of COVID-19. *mBio* 12, e0097021. <https://doi.org/10.1128/mBio.00970-21>.
- Li, X., Kazan, H., Lipshitz, H.D., Morris, Q.D., 2014. Finding the Target Sites of RNA-Binding Proteins, vol. 5. Wiley Interdiscip. Rev. RNA, pp. 111–130. <https://doi.org/10.1002/wrna.1201>.
- Liang, X.-H., Nichols, J.G., Hsu, C.-W., Vickers, T.A., Crooke, S.T., 2019. mRNA levels can be reduced by antisense oligonucleotides via no-go decay pathway. *Nucleic Acids Res.* 47, 6900–6916. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz500>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Matsuyama, S., Nagata, N., Shirato, K., Kawase, M., Takeda, M., Taguchi, F., 2010. Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *J. Virol.* 84, 12658–12664. <https://doi.org/10.1128/JVI.01542-10>.
- Menou, A., Duitman, J., Flajolet, P., Sallenave, J.-M., Mailleux, A.A., Crestani, B., 2017. Human airway trypsin-like protease, a serine protease involved in respiratory diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 312, L657–L668. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00509.2016>.
- Murakami, N., Hayden, R., Hills, T., Al-Samkari, H., Casey, J., Del Sorbo, L., Lawler, P.R., Sise, M.E., Leaf, D.E., 2023. Therapeutic advances in COVID-19. *Nat. Rev. Nephrol.* 19, 38–52. <https://doi.org/10.1038/s41581-022-00642-4>.
- Nie, J., Li, Q., Wu, J., Zhao, C., Hao, H., Liu, H., Zhang, L., Nie, L., Qin, H., Wang, M., Lu, Q., Li, X., Sun, Q., Liu, J., Fan, C., Huang, W., Xu, M., Wang, Y., 2020. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by a pseudotyped virus-based assay. *Nat. Protoc.* 15, 3699–3715. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0394-5>.
- Piasecka, J., Lenartowicz, E., Soszynska-Jozwiak, M., Szutkowska, B., Kierzek, R., Kierzek, E., 2019. RNA secondary structure motifs of the influenza A virus as targets for siRNA-mediated RNA interference. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 19, 627–642. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.12.018>.
- Prakash, T.P., Allerson, C.R., Dande, P., Vickers, T.A., Sioufi, N., Jarres, R., Baker, B.F., Swayze, E.E., Griffey, R.H., Bhat, B., 2005. Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells. *J. Med. Chem.* 48, 4247–4253. <https://doi.org/10.1021/jm050044o>.
- Qiao, Y., Wotring, J.W., Zhang, C.J., Jiang, X., Xiao, L., Watt, A., Gattis, D., Scandalis, E., Freier, S., Zheng, Y., Pretto, C.D., Ellison, S.J., Swayze, E.E., Guo, S., Sexton, J.Z., Chinnaiyan, A.M., 2023. Antisense oligonucleotides to therapeutically target SARS-CoV-2 infection. *PLoS One* 18, e0281281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281281>.
- Redondo-Calvo, F.J., Padín, J.F., Muñoz-Rodríguez, J.R., Serrano-Oviedo, L., López-Juárez, P., Porras Leal, M.L., González Gasca, F.J., Rodríguez Martínez, M., Pérez Serrano, R., Sánchez Cadena, A., Bejarano-Ramírez, N., Muñoz Hornero, C., Barberá Farré, J.R., Domínguez-Quesada, I., Sepúlveda Berrocal, M.A., Villegas Fernández-Infantes, M.D., Manrique Romo, M.I., Parra Comino, A., Pérez-Ortiz, J.M., Gómez-Romero, F.J., ATAC team, 2022. Aprotinin treatment against SARS-CoV-2: a randomized phase III study to evaluate the safety and efficacy of a pan-protease inhibitor for moderate COVID-19. *Eur. J. Clin. Invest.* 52, e13776 <https://doi.org/10.1111/eci.13776>.
- Schmidt, F., Weisblum, Y., Muecksch, F., Hoffmann, H.-H., Michailidis, E., Lorenzi, J.C.C., Mendoza, P., Rutkowska, M., Bednarski, G., Gaebler, C., Agudelo, M., Cho, A., Wang, Z., Gazumyan, A., Cipolla, M., Caskey, M., Robbiani, D.F., Nussenzweig, M.C., Rice, C.M., Hatzioannou, T., Bieniasz, P.D., 2020. Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. *J. Exp. Med.* 217, e20201181 <https://doi.org/10.1084/jem.20201181>.
- Seccia, T.M., Shagja, T., Mörpurgo, M., Caroccia, B., Sanga, V., Faoro, S., Venturini, F., Iadiccio, G., Lococo, S., Mazzitelli, M., Farnia, F., Fiorello, P., Kobayashi, Y., Gregori, D., Rossi, G.P., 2023. Randomized clinical trial of Nafamostat mesylate, A potent transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2) inhibitor, in patients with COVID-19 pneumonia. *J. Clin. Med.* 12, 6618. <https://doi.org/10.3390/jcm12206618>.
- Shapira, T., Monreal, I.A., Dion, S.P., Buchholz, D.W., Imbiakha, B., Olmstead, A.D., Jager, M., Désilets, A., Gao, G., Martins, M., Vandal, T., Thompson, C.A.H., Chin, A., Rees, W.D., Steiner, T., Nabi, I.R., Marsault, E., Sahler, J., Diel, D.G., Van de Walle, G.R., August, A., Whittaker, G.R., Boudreaux, P.-L., Leduc, R., Aguilar, H.C., Jean, F., 2022. A TMPRSS2 inhibitor acts as a pan-SARS-CoV-2 prophylactic and therapeutic. *Nature* 605, 340–348. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04661-w>.
- Shin, W.-J., Seong, B.L., 2017. Type II transmembrane serine proteases as potential target for anti-influenza drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 12, 1139–1152. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1372417>.
- Shirato, K., Kawase, M., Matsuyama, S., 2013. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection mediated by the transmembrane serine protease TMPRSS2. *J. Virol.* 87, 12552–12561. <https://doi.org/10.1128/JVI.01890-13>.
- Shulla, A., Heald-Sargent, T., Subramanya, G., Zhao, J., Perlman, S., Gallagher, T., 2011. A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry. *J. Virol.* 85, 873–882. <https://doi.org/10.1128/JVI.02062-10>.
- Steinhauer, D.A., 1999. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258, 1–20. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9716>.
- Svoboda, P., Di Cara, A., 2006. Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 901–908. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5558-5>.
- Szabot, M., Loret, D., Czapiak, T., Tomaszewska, M., Kierzek, E., Kierzek, R., 2020. RNA secondary structure as a first step for rational design of the oligonucleotides towards inhibition of influenza A virus replication. *Pathog. Basel Switz* 9, 925. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110925>.
- Szabo, R., Wu, Q., Dickson, R.B., Netzel-Arnett, S., Antal, T.M., Bugge, T.H., 2003. Type II transmembrane serine proteases. *Thromb. Haemostasis* 90, 185–193. <https://doi.org/10.1160/TH03-02-0071>.
- Tarnow, C., Engels, G., Arendt, A., Schwalm, F., Sediri, H., Preuss, A., Nelson, P.S., Garten, W., Klenk, H.-D., Gabriel, G., Böttcher-Friebertshäuser, E., 2014. TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice. *J. Virol.* 88, 4744–4751. <https://doi.org/10.1128/JVI.03799-13>.
- Toback, E., Degroote, S., Buysse, S., Delesie, L., Van Dooren, L., Vanherrewewe, S., Barbezange, C., Hutse, V., Romano, M., Thomas, I., Padalko, E., Callens, S., De Scheerder, M.-A., 2022. Efficacy and safety of camostat mesylate in early COVID-19 disease in an ambulatory setting: a randomized placebo-controlled phase II trial. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 122, 628–635. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.06.054>.
- Uhlenbeck, O.C., 1990. Tetraloops and RNA folding. *Nature* 346, 613–614. <https://doi.org/10.1038/346613a0>.
- Xia, T., SantaLucia, J., Burkard, M.E., Kierzek, R., Schroeder, S.J., Jiao, X., Cox, C., Turner, D.H., 1998. Thermodynamic parameters for an expanded nearest-neighbor model for formation of RNA duplexes with Watson–Crick base pairs. *Biochemistry* 37, 14719–14735. <https://doi.org/10.1021/bi9809425>.
- Yuan, Y., Jiao, B., Qu, L., Yang, D., Liu, R., 2023. The development of COVID-19 treatment. *Front. Immunol.* 14, 1125246 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1125246>.
- Zettl, F., Meister, T.L., Vollmer, T., Fischer, B., Steinmann, J., Krawczyk, A., V'kovski, P., Todt, D., Steinmann, E., Pfaender, S., Zimmer, G., 2020. Rapid quantification of SARS-CoV-2-neutralizing antibodies using propagation-defective vesicular stomatitis virus pseudotypes. *Vaccines* 8, 386. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030386>.
- Zhirnov, O.P., Klenk, H.D., Wright, P.F., 2011. Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. *Antivir. Res.* 92, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.07.014>.
- Zhuravel, S.V., Khmel'nikitskiy, O.K., Burlaka, O.O., Gritsan, A.I., Goloshchekin, B.M., Kim, S., Hong, K.Y., 2021. Nafamostat in hospitalized patients with moderate to severe COVID-19 pneumonia: a randomised Phase II clinical trial. *EclinicalMedicine* 41, 101169. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101169>.

- Zmora, P., Blazejewska, P., Moldenhauer, A.-S., Welsch, K., Nehlmeier, I., Wu, Q., Schneider, H., Pöhlmann, S., Bertram, S., 2014. DESC1 and MSPL activate influenza A viruses and emerging coronaviruses for host cell entry. *J. Virol.* 88, 12087–12097. <https://doi.org/10.1128/JVI.01427-14>.
- Zmora, P., Hoffmann, M., Kollmus, H., Moldenhauer, A.-S., Danov, O., Braun, A., Winkler, M., Schughart, K., Pöhlmann, S., 2018. TMPRSS11A activates the influenza A virus hemagglutinin and the MERS coronavirus spike protein and is insensitive against blockade by HAI-1. *J. Biol. Chem.* 293, 13863–13873. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001273>.
- Zmora, P., Moldenhauer, A.-S., Hofmann-Winkler, H., Pöhlmann, S., 2015. TMPRSS2 isoform 1 activates respiratory viruses and is expressed in viral target cells. *PLoS One* 10, e0138380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138380>.
- Zupin, L., Fontana, F., Clemente, L., Ruscio, M., Ricci, G., Crovella, S., 2022. Effect of short time of SARS-CoV-2 infection in caco-2 cells. *Viruses* 14, 704. <https://doi.org/10.3390/v14040704>.
- Zur, M., Peselev, T., Yanko, S., Rotshild, V., Matok, I., 2024. Efficacy and safety of antiviral treatments for symptomatic COVID-19 outpatients: systematic review and network meta-analysis. *Antivir. Res.* 221, 105768 <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2023.105768>.

Organometallic–Erlotinib Conjugates Active against Lung Cancer Cells and as Emerging Virus Entry Inhibitors

Przemysław Biegański,[#] Monika Gazecka,[#] Rafał Nowak, Aleksander Gorski, Natalia Dutkiewicz, Daniel Fábio Kawano, Paweł Zmora,^{*} and Konrad Kowalski^{*}



Cite This: *Organometallics* 2024, 43, 2505–2519



Read Online

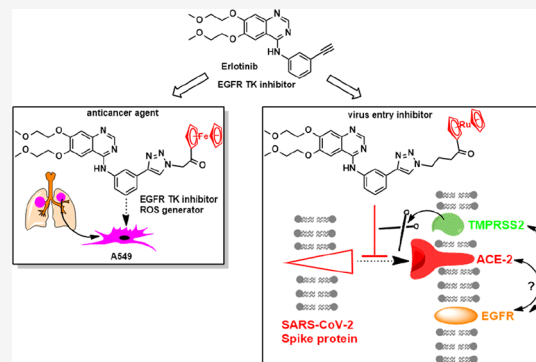
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Conjugation of organometallic entities to drug molecules is a strategy that often results in products with new biological activity profiles compared to those of their progenitors. In this study, we utilized CuAAC and RuAAC reactions to synthesize a series of organometallic–erlotinib conjugates. Erlotinib is an important anti-non-small cell lung cancer drug with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase (EGFR TK) inhibitory activity. Our studies show that ferrocenyl–erlotinib conjugates are more anticancer active than their ruthenocenyl and $[\text{Re}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{CO})_6(\mu\text{-1,2-diazine})]$ counterparts against lung cancer A549 and Calu3 cells. Our most active conjugate, **3**, demonstrates an IC_{50} value of $2.33 \pm 0.94 \mu\text{M}$ against erlotinib-resistant A549 cells. Its mechanism of anticancer action involves a combination of EGFR TK inhibitory activity and the capability to generate reactive oxygen species in lung cancer cells. Interestingly, one of the anticancer-inactive ruthenocenyl–erlotinib conjugates showed inhibitory activity toward the replication of influenza virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) in MDCK cells. Furthermore, the same compound inhibits the entry of coronavirus SARS-CoV-1 and -2 into host human HEK293T cells expressing ACE-2 and TMPRSS2. We showed that this anticoronavirus activity results from the inhibition of ACE-2/TMPRSS2-driven spike protein proteolytic activation. The question of whether the discovered virus entry inhibition mechanism involves direct binding of the conjugate to ACE-2 or involves additional mediators, such as EGFR, remains open.



INTRODUCTION

Among more than 200 types of cancers, lung cancer accounts for >11% of all cases, making it one of the most commonly diagnosed types of cancer overall. On the basis of histopathological classification, lung cancers are subdivided into small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC) groups, with the latter comprising 80% and the former 20% of lung cancer cases in total.¹

Beyond surgery, the most frequently recommended lung cancer treatment options include radiation therapy, radio-frequency ablation, immunotherapy, and chemotherapy. Classic anticancer drugs such as cisplatin, carboplatin, paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, etoposide, or pemetrexed are utilized alone or in combinations to treat early stage NSCLC.^{2–9} For the treatment of more advanced stages of the disease, these drugs are combined or entirely replaced by targeted drug therapy. Targeted NSCLC therapy is primarily based on kinase inhibitors that block the signaling cascade activating proliferation pathways, thereby preventing tumor growth, spread, and differentiation.¹⁰ Accordingly, targeted drug therapy utilizes drugs designed to target tumor cells harboring mutations in specific genes such as *KRAS*,¹¹ *ALK*,¹² *ROS1*,¹³ *BRAF*,¹⁴ *RET*,¹⁵ and *HER2*.¹⁶ An important molecular

target is the epidermal growth factor receptor (EGFR), a transmembrane tyrosine kinase (TK) overexpressed in NSCLC¹⁷ as well as in other cancer types.¹⁸ It belongs to the ErbB family, which activates several pathways involved in cellular proliferation, including the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and the phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway, and plays a significant role in signal transduction and activation of transcription (STAT) recruitment and phosphorylation.¹⁹

Four generations of anticancer-active EGFR TK inhibitors can be distinguished,^{20,21} with many belonging to the 4-anilinoquinoline derivatives, such as the gefitinib and erlotinib drugs,^{21,22} which are part of the first generation of TK inhibitors. Genetic studies have shown that the susceptibility of NSCLC cells to gefitinib and erlotinib is associated with deletion mutations in exon 19 (resulting in the elimination of

Special Issue: Applied Organometallic Chemistry

Received: April 15, 2024

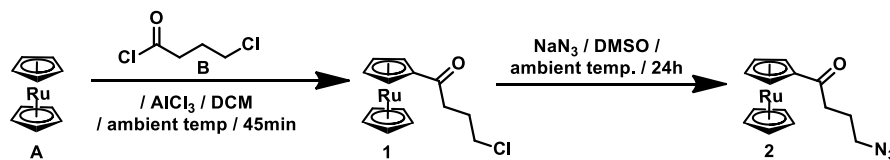
Revised: June 17, 2024

Accepted: July 8, 2024

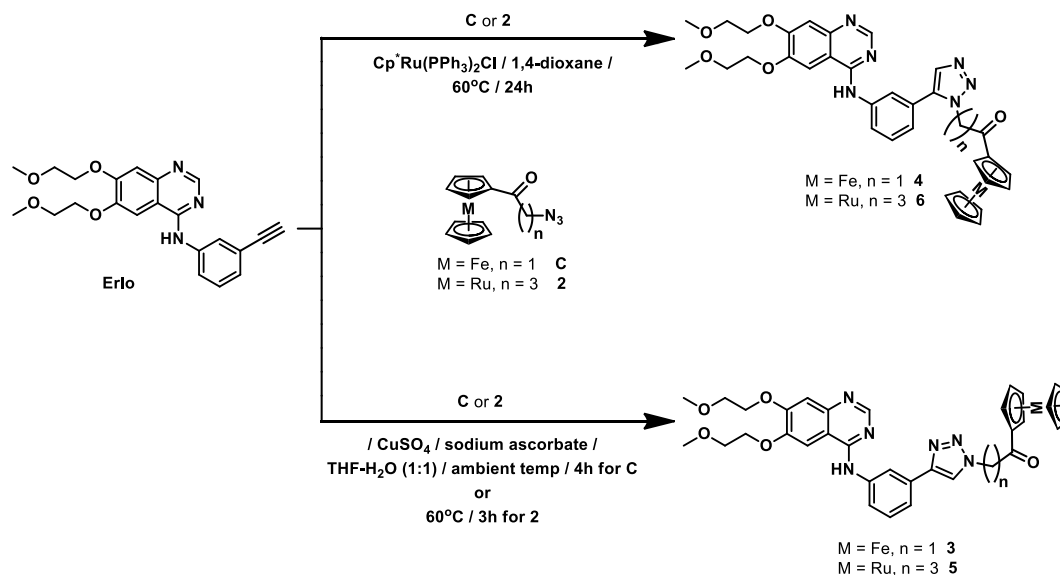
Published: July 22, 2024



Scheme 1. Synthesis of Compound 2



Scheme 2. Synthesis of Compounds 3–6



the LREA amino acids close to the K745 ATP binding site), point mutations in exon 21, and nucleotide substitutions in exons 18–21 of the TK domain.²³ Both drugs act as ATP-competitive inhibitors and are more cytostatic than cytotoxic. The X-ray crystal structure of the EGFR TK domain in complex with erlotinib confirmed that it binds in the ATP binding pocket between the N-terminal and C-terminal lobes.^{24,25} Unfortunately, patients treated with erlotinib rapidly develop resistance due to mutations in the ATP binding pocket of the TK domain, highlighting the constant need for novel drugs for lung cancer treatment.

In addition to cancer, viral respiratory infections are major causes of lung diseases, most commonly caused by influenza A viruses (IAVs), respiratory syncytial virus (RSV), and coronaviruses such as the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) and severe acute respiratory syndrome coronaviruses (SARS-CoVs).^{26,27} Recently, a new lung-targeting betacoronavirus, SARS-CoV-2, caused a global pandemic outbreak of coronavirus disease 2019 (COVID-19).²⁸ The spread of the pandemic was controlled due to a global vaccination campaign, alongside the launch of new drug development and drug repurposing campaigns against SARS-CoV-2, yielding more or less promising compounds.^{29–34} Currently, three low-molecular weight drugs have been formally approved by the Food and Drug Administration for the treatment of COVID-19: remdesivir, molnupiravir, and paxlovid (ritonavir/nirmatrelvir).³⁵ The first is an inhibitor of the viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp); the second stops viral replication at the genome level, while the third inhibits the virus's 3C-like protease (3CLpro). Other clinically used or recommended treatment options include, for example, the repurposed drugs favipiravir, lopinavir, chloroquine, and ivermectin.³⁵

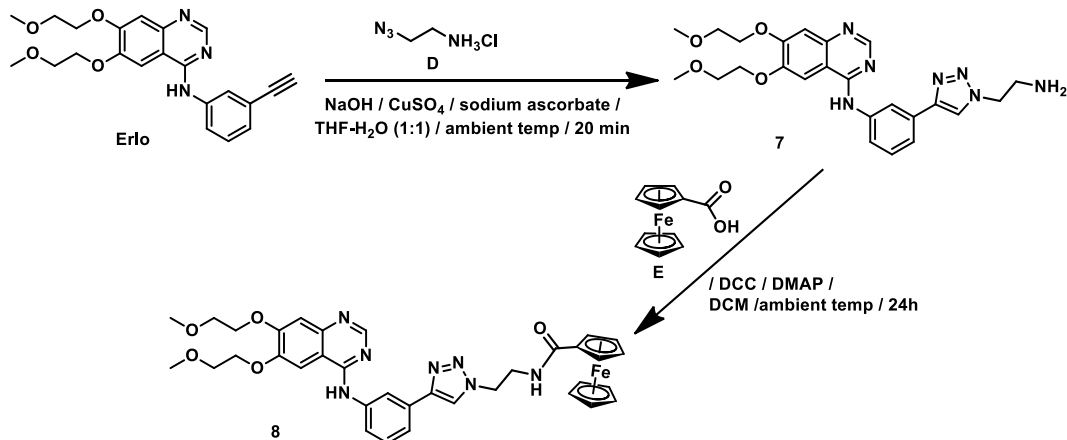
Erlotinib has also been considered as an anti-SARS-CoV-2 agent in drug repurposing programs. Virtual screening and molecular docking simulations identified it as an inhibitor of 3CLpro.³⁶ However, in real bioassays, erlotinib did not suppress entry of the virus into Calu-3 cells and demonstrated no antiviral activity in Calu-3 and Vero E6 cell models.³⁷ Conversely, when used in combination with sunitinib, erlotinib showed weak inhibitory activity against SARS-CoV-2 infection.³⁷

The organometallic modification of anticancer drugs is a well-established strategy for the development of new antitumoral agents,^{38–42} and erlotinib is no exception. It has been shown that a gold(I)–erlotinib complex shows pronounced activity against triple-negative breast cancer, erlotinib–boron conjugates displayed at least 3.3 times higher anticancer activity against glioma cells than erlotinib itself,^{44,45} and the ¹⁷⁷Lu- and ⁶⁸Ga-radiolabeled erlotinib conjugates^{46,47} are attractive scaffolds for nuclear medicine applications.⁴⁷

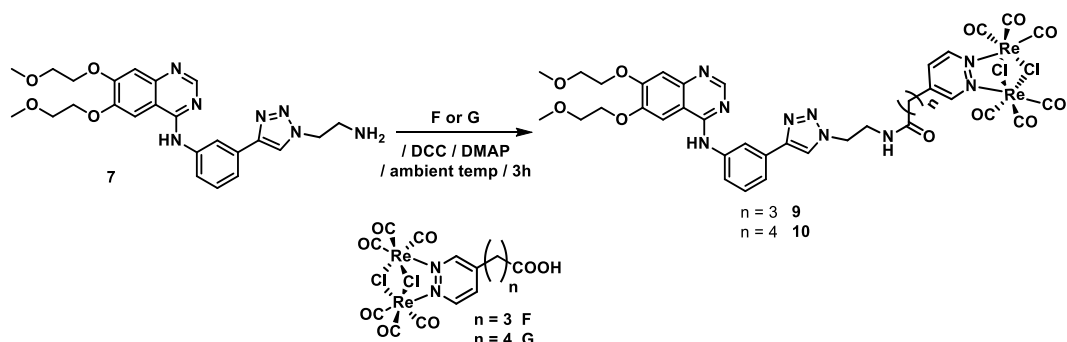
As part of our research program focused on organometallic–drug conjugates,^{48–50} we have recently reported on ferrocenyl–1,2,3-triazolyl–erlotinib conjugates.⁵¹ Some of them were more active than erlotinib against H1650, H1975, H1395, and A549 NSCLC cells and showed no toxic effect against nontumoral bronchial epithelium BEAS-2B cells. The anticancer mechanism of action of these conjugates was related to oxidative stress and apoptosis induction.⁵¹

The goals of this study were to combine the erlotinib drug with two novel organometallic fragments, namely, the ruthenocenyl (Rc) and [Re₂(μ-Cl)₂(CO)₆(μ-1,2-diazine)] entities, to modify the linker between the ferrocenyl (Fc) and erlotinib units, and to test these new constructs against model lung cancer cells. Anticancer activity studies were augmented by EGFR kinase assay and docking studies.

Scheme 3. Synthesis of Compounds 7 and 8



Scheme 4. Synthesis of Compounds 9 and 10

Table 1. Photophysical Data for Compounds 9 and 10 in Air-Equilibrated CH_2Cl_2 and $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ (denoted with an asterisk) at Ambient Temperature

compound	λ_{abs} (nm) [ϵ ($\times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)]	λ_{PL} (nm)	λ_{abs}^* (nm)	λ_{PL}^* (nm)	Φ_{PL} ($\pm 10\%$)	τ (ns)	τ (ns)*
9	380 (7.4)	590	420	515	5.4	486	605
10	380 (8.0)	590	420	515	6.2	596	596

Moreover, the photoluminescence of rhenium complexes was investigated using steady-state spectroscopy. Due to the increasing importance of organometallic compounds as antiviral agents,^{52–56} we also report herein on IAV replication and SARS-CoVs entry inhibition studies for newly obtained organometallic erlotinib conjugates.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis. Target compounds of this study are shown in Schemes 2–4 and comprise ferrocenyl (3, 4, and 8), ruthenocenyl (5 and 6), and rhenium (9 and 10) conjugates of erlotinib (Erlo), respectively. In the preliminary stage of work thus far unreported, 4-azidobutanoylruthenocene 2 was obtained via the Friedel–Crafts reaction of ruthenocene (A) and 4-chlorobutyl chloride (B) followed by substitution of chloride with azide in ketone 1 according to Scheme 1.

To obtain metallocene conjugates 3 and 5, both bearing a 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole moiety, the copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) of azide C⁵⁷ or 2 with Erlo was applied.^{51,58} Likewise, 1,5-isomers 4 and 6 were synthesized with the ruthenium-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (RuAAC) reaction of Erlo and C or 2 with Cp*RuCl(PPh₃)₂ as the catalyst (Scheme 2).⁵⁹

Conjugates 3–6 were obtained as orange (3 and 4) or yellow (5 and 6) crystalline solids in 78%, 68%, 70%, and 74% yields, respectively.

To obtain conjugate 8, a two-step synthetic approach was applied (Scheme 3). The first step involved the CuAAC reaction of Erlo with 2-azidoethylamine hydrochloride (D), which afforded amine 7 in 61% yield. In the second step, intermediate 7 was reacted with ferrocenecarboxylic acid (E) under Steglich reaction conditions⁶⁰ to afford amide 8 as a yellow crystalline solid in 61% yield.

Amine 7 was also utilized as the starting material for the conjugation with dirhenium carboxylic acid F⁶¹ and G⁶² to afford compounds 9 and 10 as yellow crystalline solids in 48% and 74% yields, respectively (Scheme 4).

All synthesized compounds were characterized by ¹H nuclear magnetic resonance (NMR), ¹³C NMR, and Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, high-resolution mass spectrometry, and elemental analysis. The resulting analytical data confirmed the proposed structures. The ¹H NMR, ¹³C NMR, and HRMS spectra of 1–10 are shown in Figures S1–S30.

Photophysical Characterization. The photophysical data for compounds 9 and 10 in air-equilibrated CH_2Cl_2 and $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ (fluid solutions at ambient temperature) are listed

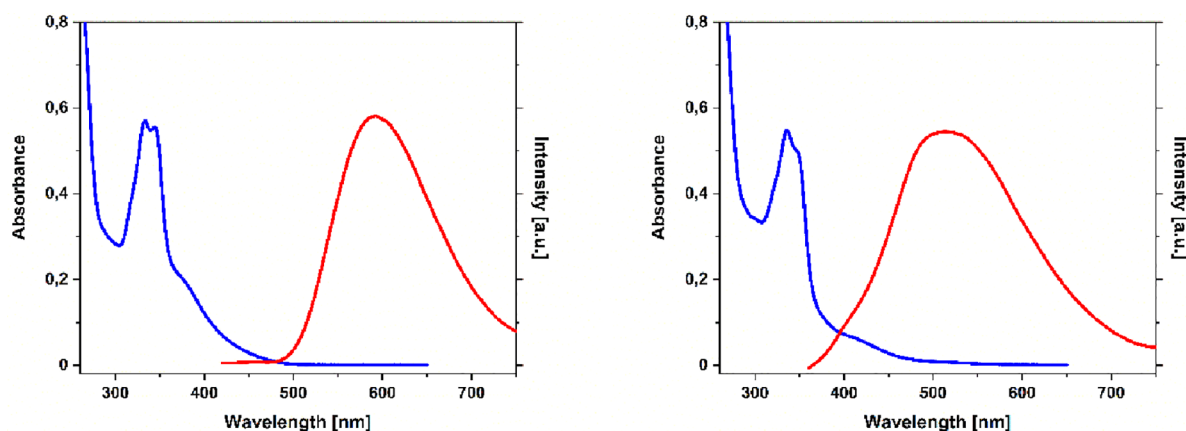


Figure 1. Electronic absorption (blue line) and luminescence (red line) spectra of **9** in CH_2Cl_2 (left) and $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ (right).

Table 2. Cytotoxicity of Compounds **3–6**, **8–10**, and **Erlo** against Lung Cancer (A549 and Calu3) and Nontumorigenic (HEK293T and MDCK) Cells^a

compound	IC_{50} (μM)			
	HEK293T	MDCK	A549	Calu3
Erlo	>100	>100	>100 15.70 ± 1.95^b	0.69 ± 0.23
3	2.83 ± 0.89	2.37 ± 3.25	2.33 ± 0.94	44.60 ± 18.81
4	3.46 ± 2.04	2.49 ± 3.33	6.56 ± 5.87	6.13 ± 0.35
5	>100	>100	>100	>100
6	16.93 ± 1.23	2.04 ± 2.09	>100	>100
8	33.12 ± 6.29	>100	13.96 ± 2.13	>100
9	>100	>100	>100	>100
10	>100	>100	>100	>100

^aCells were treated with compounds for 24 h. ^bDetermined after a 48 h treatment time.

in Table 1. The representative ultraviolet–visible absorption and emission spectra of **9** are shown in Figure 1. Both examined $[\text{Re}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{CO})_6(\mu\text{-pyridazine})]$ conjugates feature absorption bands at ~ 380 nm (in CH_2Cl_2) or ~ 420 nm [in $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$]. These bands are attributed to metal-to-ligand $[\text{d}\pi(\text{Re})-\pi^*(\text{pyridiazine})]$ charge transfer states ($^3\text{MLCT}$).^{61–64} At higher energies (~ 330 nm), an intense absorption band assigned to the pyridazine intraligand $\pi-\pi^*$ transitions is present. Compounds **9** and **10** display a broad unstructured emission with emission maxima around 590 and 515 nm in CH_2Cl_2 and $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, respectively (Table 1). This emission was assigned to phosphorescence from the lowest $^3\text{MLCT}$.^{63,64} Consistent with this assignment are long emission decay times (τ) (Table 1).

Anticancer Activity. The cytotoxic activity of conjugates **3–6** and **8–10** was determined in human NSCLC A549 and Calu-3 cells. The former cells were less susceptible to erlotinib,^{65,66} while the latter cells were sensitive to it (Table 2). Furthermore, the antiproliferative activity of compounds was examined in nontumorigenic human embryonic kidney (HEK293T) and canine kidney (MDCK) cells. Cell viability was determined with the CellTiter-Glo 2.0 assay after treatment for 24 h, and the results were expressed as IC_{50} values (Table 2). The choice of a 24 h treatment time was motivated by the pharmacokinetic/pharmacodynamic properties of erlotinib in a human tumor model.⁶⁷ The most cytotoxic were ferrocenyl conjugates **3** and **4**, both of which showed better activity against A549 cells than did **Erlo**. Noticeably, the IC_{50} of **3** against A549 cells was 2.33 ± 0.94 μM , which was

much lower than that of **Erlo** (>100 μM) in the same cancer cells. In the case of erlotinib-sensitive Calu3 cells, only compound **4** competes with **Erlo** in terms of activity. The third ferrocenyl conjugate tested was **8**. It showed moderate anticancer activity in only A549 cells. This result emphasizes the amide linker as an antitumoral unfavorable structural motif in cells assayed herein. Another undesirable result was that all ferrocenyl conjugates and ruthenocenyl compound **6** showed acute toxicity against nontumorigenic HEK293T and MDCK cells. Ruthenocenyl compound **5** and $[\text{Re}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{CO})_6(\mu\text{-pyridazine})]$ conjugates **9** and **10** were not active in either set of cells tested.

EGFR TK Inhibition. Erlotinib is a noncovalent EGFR TK inhibitor. Thus, we investigated the inhibitory activity of the three most anticancer active ferrocenyl conjugates (**3**, **4**, and **8**) with the EGFR kinase assay (Figure 2). We observed that all assayed compounds inhibit the EGFR kinase activity in a dose-dependent manner. All three ferrocenes showed inhibitory activity already at the lowest concentration of 1 μM , while **Erlo** was not active at the same concentration. The strongest suppressions of enzymatic activity were found for compound **3**, and the weakest for amide conjugate **8**. At a concentration of 10 μM , compound **3** inhibited $\sim 80\%$ and **8** $\sim 40\%$ of kinase activity. Kinase assay results show that all assayed ferrocenyl conjugates are weaker inhibitors than erlotinib. However, their inhibitory activity differs with the structure of the linker connecting the erlotinib and the ferrocenyl end groups. We investigated this problem with docking studies.

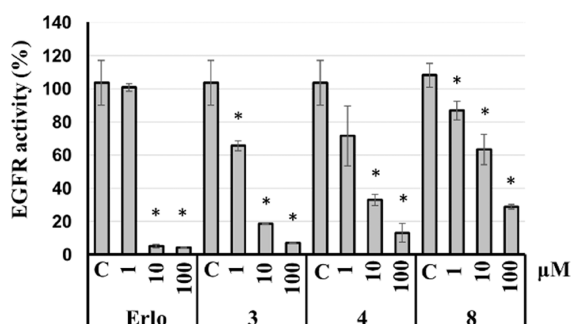


Figure 2. Inhibitory effect of Erlo, 3, 4, and 8 on EGFR TK activity. Error bars represent standard deviations (SD), and * $P < 0.05$ in comparison with the control.

Docking Studies. The Erlo binding site in the EGFR TK domain lies at the junction between the N-lobe (above) and C-lobe (below) (Figure 3A), where the ether substituents of quinazoline are directed toward the solvent, while the ethynylbenzeneamine moiety is buried within a small hydrophobic pocket. Upon addition of a bulky “barrel”-shaped ferrocenyl moiety in 3 (Figure 3B), despite displaying an orientation of the quinazoline nuclei similar to that of Erlo, the aniline now projects toward an adjacent, broader cleft. This

conformation facilitates the formation of new π – π and cation– π interactions with the triazole ring of compound 3 (Figure 3F). However, because the new interactions are made at the expense of the loss of the most prominent interaction of the quinazoline ring, a hydrogen bond with Met⁷⁶⁹ (Figure 3E), the overall effect is unfavorable, as reflected by the docking score of compound 3 (72.0) being lower than that of Erlo [74.5, for a docked pose with a root-mean-square deviation (RMSD) of 1.31 Å relative to the crystallographic structure]. For compound 4, the 1,5-substitution pattern prevents the aniline and the quinazoline ring from aligning as in the original position of Erlo (Figure 3C). This orientation results in a hydrogen bond forming between one of the ether oxygens and Cys⁷⁷³, while the aniline (not the triazole, as seen with compound 3) engages in a π – π interaction with Phe⁶⁹⁹ (Figure 3G). Overall, this modification appears to be even less favorable for activity compared to the 1,4-substitution pattern found in compound 3, with a resulting docking score of 67.0. For compound 8, although the hydrogen bond with Met⁷⁶⁹ is maintained as seen in Erlo and the H-bond between the triazole and Lys⁷²¹ (Figure 3H) is present, the resulting score is significantly lower (63.2) than those for the other compounds. This probably results from penalties applied by the scoring function, because the docking program will account for steric

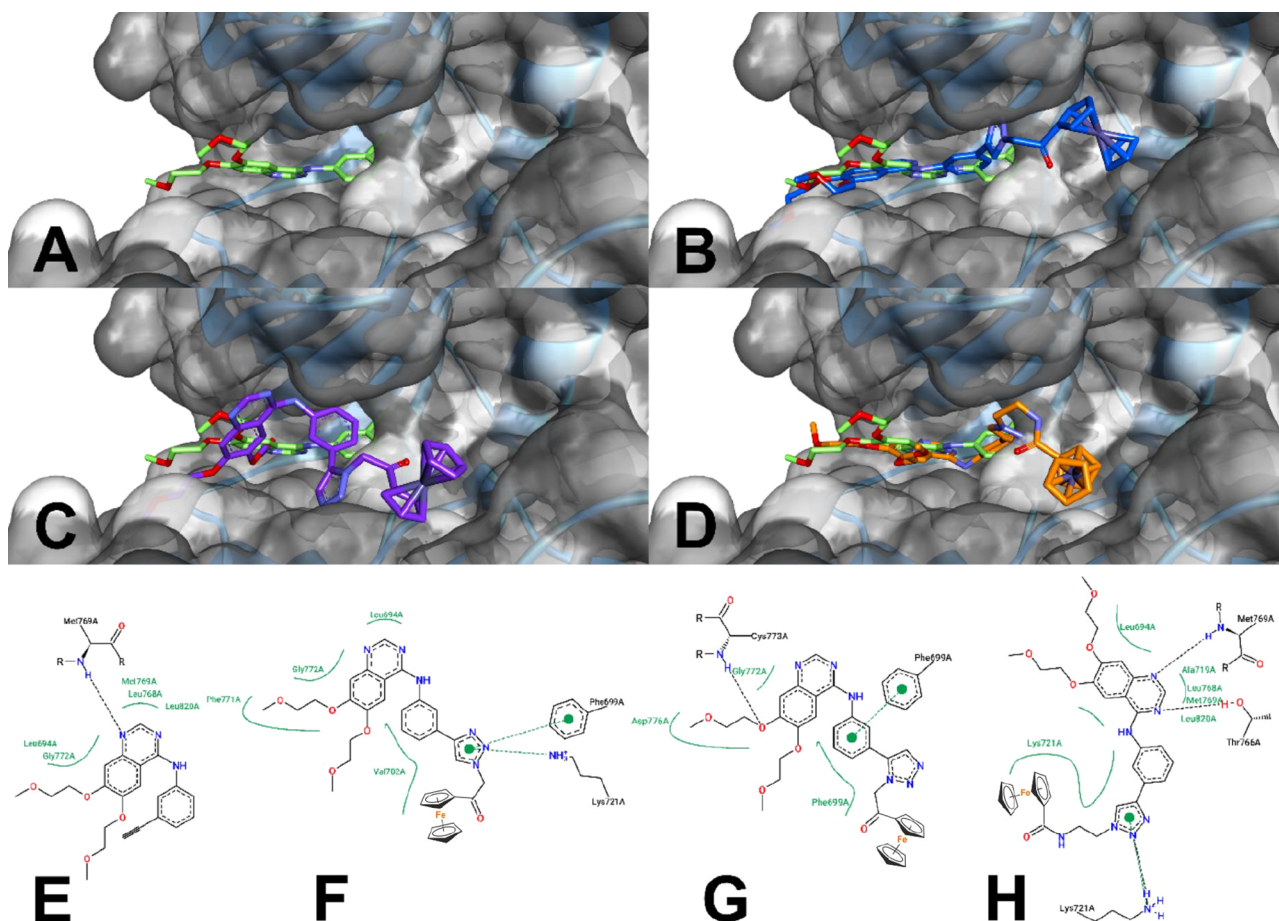


Figure 3. Surface representation of the kinase domain of the epidermal growth factor receptor (Protein Data Bank entry 1M17), highlighting the superposition of the crystallographic pose of (A) Erlo (green carbons), (B) 3 (blue carbons), (C) 4 (purple carbons), and (D) 8 (orange carbons). Two-dimensional diagrams of the ligand–EGFR interactions for (E) Erlo, (F) 3, (G) 4, and (H) 8. Diagrams were generated from the three-dimensional docked/crystallographic poses at the ligand site of EGFR using PoseView.⁶⁹ Dashed black lines correspond to hydrogen bonds, green dashed lines to π – π or cation– π interactions, and solid green arches to hydrophobic interactions.

clashes/internal torsion strains to express a poor geometry in the predicted binding mode.⁶⁸ As depicted in Figure 3D, in contrast to the other compounds, the triazole of compound 8 partially overlaps with the surface model of the EGFR protein. This could be due to the more restricted rotation of the amide bond, necessitated to better accommodate the bulky ferrocenyl group in the protein binding site. In line of evidence provided by the kinase inhibitory assay, docking results suggest that replacing a ketone-containing linker with an amide-containing one is less favorable for the binding to the TK domain.

Influence of ROS Generation on Anticancer Activity.

Ferrocenyl compounds often act as generators of reactive oxygen species (ROS) for cancer cells. An increased ROS concentration induces oxidative stress, which results in cell death.^{39,51,70,71} Free radical scavengers such as *N*-acetyl cysteine (NAC) are known to circumvent the deleterious effects of ROS. Therefore, we used a CellTiter-Glo 2.0 cell viability assay to investigate whether the cytotoxic activity of ferrocenyl–erlotinib conjugates 3, 4, and 8 can be suppressed by the NAC in A549 cells (Figure 4). Because the mechanism

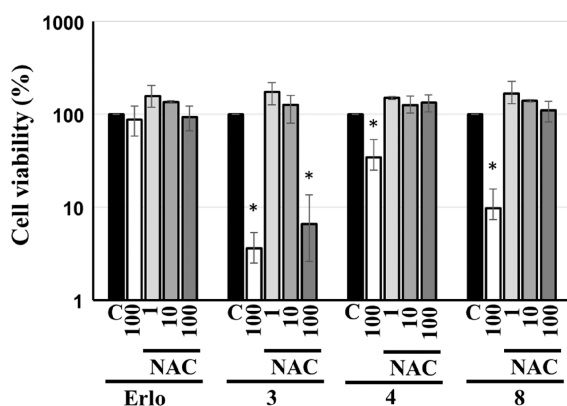


Figure 4. Influence of NAC (3 mM) on the cell viability of lung cancer A549 cells treated with Erlo, 3, 4, and 8. Increased (1, 10, and 100 μ M) concentrations of ferrocenyl conjugates were used. Error bars represent standard deviations (SD), and $*P < 0.05$ in comparison with the control (C) treated cells.

of action of Erlo is not based on ROS generation, the presence of NAC did not influence cell viability. Unlike that of Erlo, the activity of 4 and 8 was decreased at each concentration by NAC (Figure 4). In the case of 3, the protective effect of NAC can be seen only at complex concentrations of 1 and 10 μ M. At the highest concentration tested (100 μ M), the activity of 3 was so high that NAC could not prevent it. In summary, we can conclude that the cytotoxic effect of ferrocenyl–erlotinib conjugates in tested lung cancer cells has a contribution related to ROS and oxidative stress generation. This observation is consistent with the literature.⁵¹

Antiviral Activity of Organometallic–Erlotinib Conjugates. Recent reports have shown that erlotinib exerts some activity against SARS-CoV-2³⁷ and hepatitis B virus.⁷² Additionally, various classes of organometallic compounds have been reported to exhibit anti-SARS-CoV-2 activity.^{52–56} Inspired by these findings, we selected noncytotoxic conjugates 5, 9, and 10 for further evaluation as antiviral agents against influenza A and SARS-CoV-1 and -2 viruses. Our initial investigation focused on the impact of these compounds on the replication of the replication-competent influenza virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) in MDCK cells. At concentrations

of 10 and 100 μ M, both Erlo and ruthenocenyl conjugate 5 reduced the IAV PR8 virus titer in MDCK cells (Figure 5).

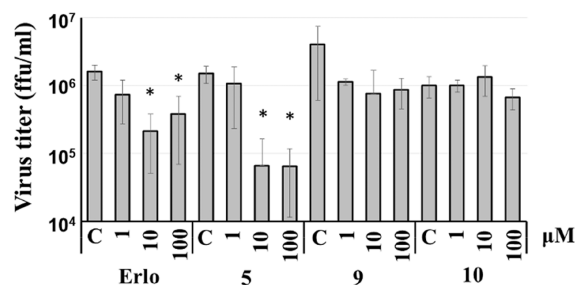


Figure 5. Effect of Erlo, 5, 9, and 10 on the replication of IAV PR8 virus in MDCK cells. Error bars represent standard deviations (SD), and $*P < 0.05$ in comparison with the control (C) treated cells. FFU, focus forming units.

Notably, compound 5 was significantly more effective as a virus replication inhibitor than Erlo, reducing the virus titer by >10-fold compared to that of the control. In contrast, rhenium conjugates showed no inhibitory activity.

A recent report showed that EGFR-mediated signaling is activated by the SARS-CoV-2 spike protein (S).⁷³ This compelling discovery prompted us to investigate the effects of Erlo and conjugates 5, 9, and 10 on the entry of SARS-CoV-1 and -2 coronaviruses into HEK293T host cells. In our assays, we used pseudotypes of the vesicular stomatitis virus (VSV) that carried either the SARS-CoV-1/2 S or VSV-G protein.⁷⁴ These VSV pseudotypes served as vectors to transduce EGFR-expressing HEK293T cells. In addition, the transduced HEK293T cells also expressed angiotensin-converting enzyme receptor 2 (ACE-2) and transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2), two proteins that are crucial for the entry of the virus into host cells.⁷⁵ Our observations revealed that Erlo and ruthenocenyl compound 5 selectively reduced the level of entry of SARS-CoVs, without affecting VSV-G-driven transduction (Figure 6). Simultaneously, rhenium conjugates 9 and 10 reduced luciferase activity in cells transduced with SARS-CoV-1 and VSV pseudotypes but did not affect cells transduced with SARS-CoV-2. These findings suggest that Erlo and compound 5 may possess antiviral potential, which is specific to emerging coronaviruses and likely related to their interaction with the essential host cell proteins ACE-2 and TMPRSS2 required for viral entry.

Examination of S–ACE-2 Interaction in the Presence of Erlotinib Conjugates. The early pathway⁷⁶ of the entry of the SARS-CoV particle into host cells involves binding of the receptor binding domain (RBD) of the viral spike (S) protein to the N-terminal helix of the ACE-2 receptor. This step is followed by the proteolytic activation of the S protein, facilitated by TMPRSS2 and furin, leading to the fusion of the virus with the host cell cytoplasm.⁷⁵ To examine whether Erlo, 5, 9, and 10 may inhibit the S–ACE-2 interaction, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used.⁵² Among these compounds, 5, 9, and 10 were all found to be inactive in these experiments while Erlo displayed ~40% inhibitory activity at the highest concentration tested (100 μ M) (Figure 7).

Study of the Proteolytic Cleavage of the S and HA Protein by TMPRSS2. The fusion between the viral and host cell membranes is mediated by the SARS-CoV S protein or the hemagglutinin (HA) of IAV. Both proteins belong to the class

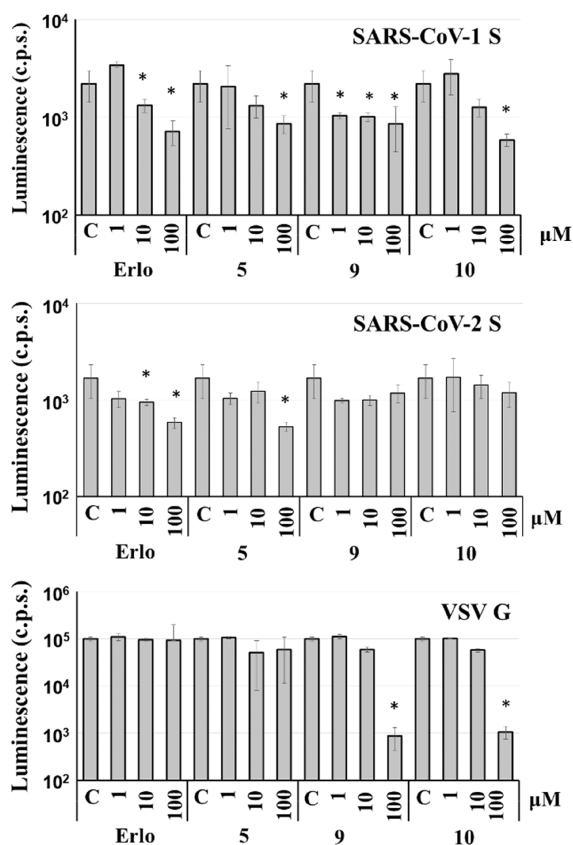


Figure 6. Inhibition of the entry of SARS-CoV spike protein-driven virus into HEK293T cells by Erlo as well as conjugates 5, 9, and 10. Error bars represent standard deviations (SD), and * $P < 0.05$ in comparison with the control (C) treated cells. c.p.s., counts per second.

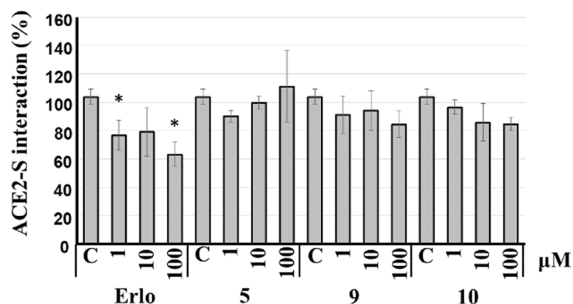


Figure 7. Inhibition of the S-ACE-2 interaction by Erlo, 5, 9 and 10 at concentrations of 0, 1, 10, and 100 μM . Error bars represent standard deviations (SD), and * $P < 0.05$ in comparison with the control (C) treated cells.

I fusion proteins. This classification signifies, among other characteristics, that S and HA are initially synthesized as single-chain precursors, which need to be proteolytically activated (cleaved) to gain their fusogenic activities.^{75,76} Without activation, S and HA proteins cannot mediate membrane fusion because they lack the liberated fusion peptide (FP). Activation pertains to cleavage at specific sites such as S1/S2, S2', and HA1/2 by the respective host cell proteases.⁷⁶ For SARS-CoVs, the so-called early entry pathway is mediated by TMPRSS2 and furin proteases, which cleave the spike protein close to the cell surface. Notably, the entry of TMPRSS2-mediated SARS-CoV-2 is crucial for virus infectivity and

preferred by the SARS-CoV-2 omicron genetic variant. Similar to coronaviruses, IAVs do not encode any proteases, and HAS do not undergo autocatalytic activation; thus, the IAVs also depend completely on the host cell proteases.⁷⁷ With regard to the information presented above, we next examined the TMPRSS2-driven proteolytic cleavage of the S and HA protein in HEK293T cells in the presence of conjugates 5, 9, and 10 using Western blot analysis (Figure 8). We observed that only

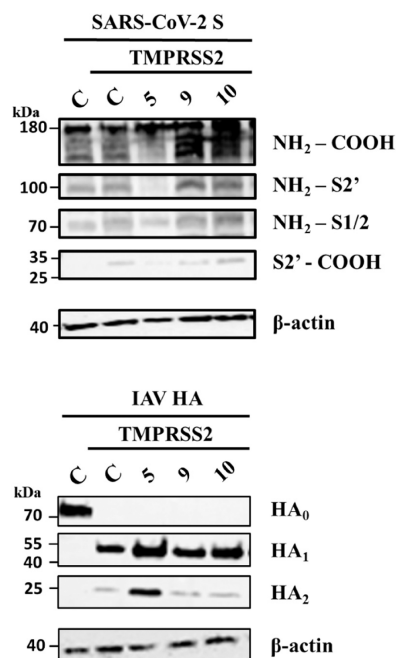


Figure 8. Influence of 5, 9, and 10 conjugates on the proteolytic activation of SARS-CoV-2 S protein (top) and influenza A virus hemagglutinin (bottom) in comparison to control (C) treated cells. Expression of the S protein was detected by staining with anti-SARS-CoV-2 S polyclonal antibodies, and IAV HA cleavage was detected by staining with anti-FLUAV polyclonal antibodies. As a loading control, the expression of β -actin was detected. Only the SARS-CoV-2 S/IAV HA specific bands are shown. NH₂ and COOH refer to the N-terminus and C-terminus of the S protein, respectively. S2' and S1/2 refer to the sites of cleavage by TMPRSS2 and furin, respectively. HA₁ and HA₂ represent subunits A₁ and A₂, respectively, of hemagglutinin.

compound 5 inhibits the proteolytic cleavage of the S protein (Figure 8, top panel), while the TMPRSS2-driven IAV HA cleavage was not inhibited by any of the compounds (Figure 8, bottom panel). Recently, it was shown that ACE-2 can modulate TMPRSS2 activity.⁷⁸ In line with this observation, our results suggest that ruthenocetyl conjugate 5 can inhibit the ACE-2 receptor's ability to facilitate TMPRSS2-driven spike protein cleavage. This hypothesis is supported by the results of the TMPRSS2-driven IAV HA protein processing, in which ACE-2 does not play a key role, and compound 5 showed no inhibitory activity. The nature of the interaction between compound 5 and the ACE-2 receptor could involve direct binding or be mediated by EGFR TK. This mechanistic issue will be examined in follow-up studies.

CONCLUSION

Seven new organometallic-erlotinib (anti-lung cancer drug) conjugates were prepared with the CuAAC and RuAAC reactions as the key synthetic tools. The obtained compounds contain the ferrocenyl, ruthenocetyl, or $[\text{Re}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{CO})_6(\mu\text{-$

1,2-diazine)] organometallic entity. All compounds were characterized by NMR, HRMS, FTIR, and elemental analysis. Rhenium compounds show phosphorescence emission around 590 and 515 nm in CH_2Cl_2 and $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, respectively. Anticancer activity studies identified the ferrocenyl conjugates as active agents against erlotinib-resistant A549 and erlotinib-susceptible Calu3 human lung cancer cells. The most active against A549 cells was compound 3. Its mechanism of action involves the inhibition of EGFR TK and ROS generation in cancer cells. Here, we also present a study in which we examined the antiviral activity of non-anticancer active ruthenocenyl and rhenium compounds. In that respect, it was found that ruthenocenyl conjugate 5 is an effective inhibitor of the replication of the influenza virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) in MDCK cells. Furthermore, we found that 5 acts as an inhibitor of the entry of SARS-CoV-1 and -2 virus into human HEK293T cells. The detailed mechanism of the entry inhibitory activity needs further studies. However, in this work, we already have shown that it pertains to the interaction of 5 with the ACE-2 receptor and inhibition of TMPRSS2-driven spike protein cleavage. Our results demonstrate that organometallic modifications of anti-lung cancer drugs can be a valuable tool for the development of new antiviral agents.

EXPERIMENTAL SECTION

General Considerations. All preparations were carried out using standard Schlenk techniques. Chromatographic separations were carried out using silica gel 60 (Merck, 230–400 mesh ASTM) and preparative TLC plates (Merck Silica gel 60). THF was distilled over sodium/benzophenone prior to use. Other solvents were of reagent grade and were used without prior purification. Erlotinib (Erlo), ferrocenecarboxylic acid (E), 2-azidoethylamine hydrochloride (D), $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$, 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP), N,N' -dicyclohexylcarbodiimide (DCC), and sodium ascorbate were purchased from a commercial supplier and used without further purification. 1,2,4,5-Tetrazine, $[\text{Re}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{CO})_6(\mu\text{-1,2-diazine})]$ rhenium carboxylic acids F and G, and azide C were prepared according to refs 57, 61, and 62. Yields refer to the isolated products. The NMR spectra were recorded on a Bruker AV600 Kryo (600 MHz) spectrometer. Chemical shifts (δ) are reported in parts per million using residual DMSO (^1H , $\delta = 2.50$ ppm; ^{13}C , $\delta = 39.52$ ppm) and CDCl_3 (^1H , $\delta = 7.26$ ppm) as references. Mass spectra were recorded using electrospray ionization MS on a Synapt G2-Si mass spectrometer (Waters). High-resolution mass spectrometry (HRMS) measurements were carried out using a Synapt G2-Si mass spectrometer (Waters) equipped with an ESI source and a quadrupole time-of-flight mass analyzer. The mass spectrometer was operated in the positive and negative ion detection modes. The measurement was performed with a capillary voltage set to 2.7 kV and a sampling cone set to 20 V. The source temperature was 110 °C. The results of the measurements were processed using MassLynx version 4.1 (Waters) incorporated in the instrument. Infrared spectra were recorded on an FTIR Nexus Nicolet apparatus. Microanalyses were performed by the Analytical Services of the Polish Academy of the Sciences (Łódź, Poland). HPLC separations were carried out with a Shimadzu Prominence system equipped with a PDA detector and an analytical Phenomenex Lux 5 μm silica (2) 100 Å (150 mm $\times$ 21.2 mm) column. Detection was accomplished at 254 nm. A flow rate of 7 mL/min was applied.

Synthesis of 1. Ruthenocene (A) (451 mg, 1.95 mmol, 1.0 equiv) in dichloromethane (10 mL) was treated with 4-chlorobutyl chloride (B) (0.10 mL, 0.89 mmol, 0.5 equiv) and aluminum chloride (312 mg, 2.34 mmol, 1.2 equiv). After being stirred for 45 min at ambient temperature, the reaction mixture was poured into water (25 mL). The resulting dichloromethane and water phases were separated. The organic phase was dried over Na_2SO_4 and evaporated to dryness. The residue was subjected to column chromatography on

SiO_2 [30:1 (v/v) dichloromethane/*n*-hexane]. Chromatography gave 1 as a yellow solid in 90% (269 mg) yield: ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ = 5.12 (pt, $J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, 2H, C_5H_4), 4.78 (pt, $J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, 2H, C_5H_4), 4.60 (s, 5H, C_5H_5), 3.62 (t, $J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, 2H, CH_2), 2.82 (t, $J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, 2H, CH_2), 2.12 (quin, $J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, 2H, CH_2); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 201.1, 83.9, 73.6, 72.1, 70.7, 44.8, 35.3, 27.2; HRMS (ESI+) m/z 336.9940 ($\text{M} + \text{H}^+$) (calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{OClRu}$ 336.9933); FTIR (KBr ν , cm^{-1}) 3320, 3097, 2975, 2958, 2932, 2906, 1671, 1457, 1410, 1377, 1352, 1248, 1084, 1050, 1030, 996, 878, 810, 723. Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{OClRu}$: C, 50.08; H, 4.50. Found: C, 50.03; H, 4.68.

Synthesis of 2. Sodium azide (203 mg, 3.12 mmol, 4.0 equiv) was added to a solution of 4-chlorobutanoylruthenocene 1 (262 mg, 0.78 mmol, 1.0 equiv) in dimethyl sulfoxide (5 mL). The resulting reaction mixture was stirred at ambient temperature under argon for 24 h. Then, 25 mL of water was added, and the mixture was extracted with diethyl ether. After the separation, the organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, and evaporated to dryness, affording a yellow oily residue. The residue was subjected to column chromatography on SiO_2 [5:1 (v/v) *n*-hexane/ethyl acetate]. After evaporation of the eluent, crude compound 2 was obtained as a yellow oil. Purification of 2 was carried out by normal phase HPLC with a Luna 5u silica (2) 100Å, AXIA Packed (150 mm $\times$ 21.1 mm) preparative column. A mixture of *n*-hexane (98%) and ethyl acetate (2%) with a total flow pump of 7 mL/min was used. After evaporation of the eluent, complex 2 was obtained as a yellow solid in 48% (128 mg) yield: ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 5.11 (bs, 2H, C_5H_4), 4.78 (bs, 2H, C_5H_4), 4.59 (s, 5H, C_5H_5), 3.36 (t, $J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, 2H, CH_2), 2.72 (t, $J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, 2H, CH_2), 1.94 (quin, $J_{\text{H,H}} = 6.6$ Hz, 2H, CH_2); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 201.2, 83.8, 73.7, 72.1, 70.7, 50.9, 35.4, 23.8; HRMS (ESI+) m/z 366.0163 ($\text{M} + \text{Na}^+$) (calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{ONaRu}$ 366.0156); FTIR (KBr ν , cm^{-1}) 3303, 3095, 3084, 2977, 2961, 2931, 2903, 2880, 2080, 1657, 1452, 1414, 1372, 1290, 1246, 1221, 1044, 985, 904, 821, 738. Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{ORu}$: C, 49.12; H, 4.42; N, 12.27. Found: C, 49.13; H, 4.24; N, 12.06.

Synthesis of 3. The 2-azidoacetyl ferrocene (C) (40 mg, 0.15 mmol, 1.0 equiv), sodium ascorbate (24 mg, 0.12 mmol, 0.8 equiv), and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (7 mg, 0.03 mmol, 0.2 equiv) were added to a solution of erlotinib (59 mg, 0.15 mmol, 1.0 equiv) in 2 mL of a 1:1 (v/v) THF/ H_2O mixture. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. Then, H_2O (25 mL) was added, and the mixture was extracted with a 10:1 (v/v) chloroform/methanol mixture (3 $\times$ 25 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous Na_2SO_4 , and evaporated to dryness under reduced pressure. The remaining oil was subjected to column chromatography on SiO_2 [30:7:3 (v/v/v) ethyl acetate/chloroform/methanol]. Chromatographically purified 3 was crystallized from a dichloromethane/*n*-hexane mixture to afford a pure sample as an orange crystalline solid in 78% (77 mg) yield: ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.56 (s, 1H, NH), 8.60 (s, 1H, H 1,2,3-triazole), 8.49 (s, 1H, N=CH-N), 8.32 (t, $J_{\text{H,H}} = 1.2$ Hz, 1H, C_6H_4), 7.93 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 7.90 (dd, $J_{\text{H,H}} = 8.4$, 1.2 Hz, 1H, C_6H_4), 7.62 (dt, $J_{\text{H,H}} = 7.8$, 1.2 Hz, 1H, C_6H_4), 7.48 (t, $J_{\text{H,H}} = 7.8$ Hz, 1H, C_6H_4), 7.23 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 5.87 (s, 2H, CH_2), 4.99 (pt, $J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, 2H, C_5H_4), 4.73 (pt, $J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, 2H, C_5H_4), 4.39 (s, 5H, C_5H_5), 4.32 (m, 2H, CH_2), 4.29 (m, 2H, CH_2), 3.79 (m, 2H, CH_2), 3.75 (m, 2H, CH_2), 3.38 (s, 3H, CH_3), 3.36 (s, 3H, CH_3); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 195.2, 156.3, 153.5, 152.8, 148.0, 146.9, 146.1, 140.0, 131.0, 128.9, 123.3, 121.7, 120.2, 118.8, 108.9, 108.2, 103.3, 75.5, 72.9, 70.1, 70.0, 70.0, 69.1, 68.3, 68.0, 58.3, 58.2, 55.8; HRMS (ESI+) m/z 663.2018 ($\text{M} + \text{H}^+$) (calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{35}\text{N}_6\text{O}_3\text{Fe}$ 663.2018); FTIR (KBr ν , cm^{-1}) 3360, 3100, 2929, 2891, 1680, 1621, 1579, 1524, 1503, 1452, 1428, 1242, 1206, 1125, 1068, 925, 863, 787. Anal. Calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_3\text{Fe}$: C, 61.64; H, 5.17; N, 12.69. Found: C, 61.64; H, 5.24; N, 12.65.

Synthesis of 4. $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{PPh}_3)_2$ (6 mg, 0.008 mmol, 0.02 equiv) was added to a solution of 2-azidoacetyl ferrocene (161 mg, 0.60 mmol, 1.5 equiv) and erlotinib (157 mg, 0.40 mmol, 1.0 equiv) in 5 mL of 1,4-dioxane. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 24 h. Then, 1,4-dioxane and all of the volatiles were evaporated to afford an

oily residue. The residue was subjected to column chromatography on SiO₂ [30:7:2 (v/v) ethyl acetate/chloroform/methanol]. Chromatographically purified **4** was crystallized from a dichloromethane/*n*-hexane mixture to give a pure sample as an orange crystalline solid in 68% (180 mg) yield: ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.57 (s, 1H, NH), 8.34 (s, 1H, N=CH–N), 8.10 (t, *J*_{H,H} = 1.8 Hz, 1H, C₆H₅), 7.99 (s, 1H, H 1,2,3-triazole), 7.86 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 7.83 (ddd, *J*_{H,H} = 8.1, 1.8, 1.2 Hz, 1H, C₆H₄), 7.53 (t, *J*_{H,H} = 7.8 Hz, 1H, C₆H₄), 7.26 (dt, *J*_{H,H} = 7.8, 1.2 Hz, 1H, C₆H₄), 7.21 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 5.90 (s, 2H, CH₂), 4.95 (pt, *J*_{H,H} = 1.8 Hz, 2H, C₅H₄), 4.68 (pt, *J*_{H,H} = 1.8 Hz, 2H, C₅H₄), 4.28 (m, 4H, CH₂), 4.18 (s, 5H, C₅H₅), 3.77 (m, 2H, CH₂), 3.74 (m, 2H, CH₂), 3.36 (s, 3H, CH₃), 3.35 (s, 3H, CH₃); ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 195.2, 156.0, 153.6, 152.6, 148.0, 146.9, 140.0, 138.9, 132.3, 129.2, 126.6, 123.0, 122.5, 121.5, 108.8, 108.2, 103.2, 75.4, 72.9, 70.0, 69.9, 69.8, 69.0, 68.3, 68.0, 58.3, 58.2, 54.4; HRMS (ESI+) *m/z* 663.2017 (M + H⁺) (calcd for C₃₄H₃₅N₆O₅Fe 663.2018); FTIR (KBr ν, cm^{−1}) 3380, 3096, 2933, 2889, 1682, 1622, 1581, 1524, 1504, 1456, 1426, 1390, 1253, 1210, 1125, 1070, 1030, 925, 858, 827, 788. Anal. Calcd for C₃₄H₃₄N₆O₅Fe: C, 61.64; H, 5.17; N, 12.69. Found: C, 61.45; H, 5.12; N, 12.50.

Synthesis of 5. 4-Azidobutanoylruthenocene **2** (99 mg, 0.29 mmol, 1.0 equiv), sodium ascorbate (46 mg, 0.23 mmol, 0.8 equiv), and CuSO₄·5H₂O (15 mg, 0.06 mmol, 0.2 equiv) were added to a solution of erlotinib (114 mg, 0.29 mmol, 1.0 equiv) in 4 mL of a 1:1 (v/v) THF/H₂O mixture. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 3 h. Then, H₂O (25 mL) was added, and the mixture was extracted with chloroform (3 × 25 mL). The organic layer was separated, dried over anhydrous Na₂SO₄, and filtered, and subsequently, all of the volatiles were evaporated. The remaining oil was subjected to column chromatography on SiO₂ [30:7:4 (v/v) ethyl acetate/chloroform/methanol]. Chromatographically purified **5** was crystallized from a dichloromethane/*n*-hexane mixture to afford a pure sample as a pale yellow crystalline solid in 70% (149 mg) yield: ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.54 (s, 1H, NH), 8.63 (s, 1H, H 1,2,3-triazole), 8.47 (s, 1H, N=CH–N), 8.28 (t, *J*_{H,H} = 1.8 Hz, 1H, C₆H₄), 7.92 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 7.89 (ddd, *J*_{H,H} = 7.8, 1.8, 1.2 Hz, 1H, C₆H₄), 7.56 (dt, *J*_{H,H} = 7.8, 1.2 Hz, 1H, C₆H₄), 7.45 (t, *J*_{H,H} = 7.8 Hz, 1H, C₆H₄), 7.22 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 5.10 (pt, *J*_{H,H} = 1.8 Hz, 2H, C₅H₄), 4.83 (pt, *J*_{H,H} = 1.8 Hz, 2H, C₅H₄), 4.60 (s, 5H, C₅H₅), 4.44 (t, *J*_{H,H} = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 4.31 (m, 2H, CH₂), 4.29 (m, 2H, CH₂), 3.79 (m, 2H, CH₂), 3.75 (m, 2H, CH₂), 3.37 (s, 3H, CH₃), 3.36 (s, 3H, CH₃), 2.70 (t, *J*_{H,H} = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 2.15 (quin, *J*_{H,H} = 7.2 Hz, 2H, CH₂); ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 200.3, 156.3, 153.5, 152.8, 148.0, 146.9, 146.3, 140.0, 131.0, 128.9, 121.6, 121.3, 120.2, 118.7, 108.9, 108.2, 103.3, 83.5, 73.4, 71.8, 70.4, 70.1, 70.0, 68.3, 68.0, 58.3, 58.3, 48.9, 34.5, 24.6; HRMS (ESI+) *m/z* 737.2037 (M + H⁺) (calcd for C₃₆H₃₉N₆O₅Ru 737.2025); FTIR (KBr ν, cm^{−1}) 3345, 3101, 2931, 2890, 2821 1669, 1621, 1579, 1504, 1452, 1427, 1392, 1241, 1205, 1126, 925, 864, 788. Anal. Calcd for C₃₆H₃₈N₆O₅Ru: C, 58.76; H, 5.21; N, 11.42. Found: C, 58.53; H, 5.13; N, 11.27.

Synthesis of 6. Cp^{*}RuCl(PPh₃)₂ (7 mg, 0.009 mmol, 0.02 equiv) was added to a solution of 4-azidobutanoylruthenocene **2** (237 mg, 0.69 mmol, 1.5 equiv) and erlotinib (181 mg, 0.46 mmol, 1.0 equiv) in 6 mL of 1,4-dioxane. The resulting reaction mixture was stirred at 65 °C for 24 h. Then, 1,4-dioxane and all of the volatiles were evaporated under reduced pressure to afford an oily residue. The residue was subjected to column chromatography on SiO₂ [30:7:2 (v/v) ethyl acetate/chloroform/methanol]. Chromatographically purified **6** was crystallized from a dichloromethane/*n*-hexane mixture to afford a pure sample as a pale yellow crystalline solid in 74% (252 mg) yield: ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.59 (s, 1H, NH), 8.50 (s, 1H, N=CH–N), 8.13 (t, *J*_{H,H} = 1.8 Hz, 1H, C₆H₄), 7.93 (s, 1H, H 1,2,3-triazole), 7.91 (ddd, *J*_{H,H} = 8.4, 1.8, 1.2 Hz, 1H, C₆H₄), 7.89 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 7.56 (t, *J*_{H,H} = 8.4 Hz, 1H, C₆H₄), 7.30 (dt, *J*_{H,H} = 7.8, 1.2 Hz, 1H, C₆H₄), 7.24 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 4.99 (pt, *J*_{H,H} = 1.8 Hz, 2H, C₅H₄), 4.75 (pt, *J*_{H,H} = 1.8 Hz, 2H, C₅H₄), 4.52 (s, 5H, C₅H₅), 4.51 (t, *J*_{H,H} = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 4.29 (m, 4H, CH₂), 3.78 (m, 2H, CH₂), 3.75 (m, 2H, CH₂), 3.37 (s, 3H, CH₃), 3.35 (s, 3H,

CH₃), 2.63 (t, *J*_{H,H} = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 2.04 (quin, *J*_{H,H} = 7.2 Hz, 2H, CH₂); ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 200.1, 156.1, 153.7, 152.7, 148.1, 147.0, 140.1, 137.2, 132.6, 129.2, 126.7, 123.0, 122.4, 121.6, 108.9, 108.2, 103.4, 83.3, 73.3, 71.7, 70.3, 70.0, 70.0, 68.4, 68.0, 58.3, 58.2, 47.3, 34.7, 24.4; HRMS (ESI+) *m/z* 737.2028 (M + H⁺) (calcd for C₃₆H₃₉N₆O₅Ru 737.2025); FTIR (KBr ν, cm^{−1}) 3370, 3099, 2930, 2891, 2820, 1670, 1622, 1577, 1523, 1505, 1452, 1435, 1424, 1246, 1208, 1126, 1031, 925, 894, 788. Anal. Calcd for C₃₆H₃₈N₆O₅Ru: C, 58.76; H, 5.21; N, 11.42. Found: C, 58.71; H, 5.11; N, 11.40.

Synthesis of 7. Sodium hydroxide (20 mg, 0.50 mmol, 1 equiv) was added to a solution of 2-azidoethylamine hydrochloride (61 mg, 0.50 mmol, 1 equiv) in 3 mL of a 1:1 (v/v) THF/H₂O mixture. The resulting mixture was stirred at room temperature for 20 min. Then, erlotinib (197 mg, 0.50 mmol, 1 equiv), sodium ascorbate (79 mg, 0.40 mmol, 0.8 equiv), and CuSO₄·5H₂O (25 mg, 0.10 mmol, 0.2 equiv) were added to a stirred solution. The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. Then, dichloromethane was added, and anhydrous Na₂SO₄ was added to remove the residual water. The organic layer was filtered, and the Na₂SO₄ remaining on the Schott funnel was washed with 3 × 30 mL of methanol. The organic layer was evaporated under reduced pressure. The remaining oil was subjected to column chromatography on SiO₂ (5:1 dichloromethane/methanol). A pure sample was obtained by preparative TLC (5:2 dichloromethane/methanol). Then, compound **7** was crystallized from a 10:1 (v/v) dichloromethane/methanol mixture and *n*-hexane as a colorless crystalline solid in 61% (147 mg) yield: ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.56 (s, 1H, NH), 8.55 (s, 1H, H 1,2,3-triazole), 8.47 (s, 1H, N=CH–N quinazoline), 8.26 (t, *J*_{H,H} = 1.8 Hz, 1H, C₆H₄), 7.94 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 7.89 (ddd, *J*_{H,H} = 7.8, 1.8, 0.6 Hz, 1H, C₆H₄), 7.54 (dt, *J*_{H,H} = 7.8, 1.8 Hz, 1H, C₆H₄), 7.45 (t, *J*_{H,H} = 7.8 Hz, 1H, C₆H₄), 7.22 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 4.37 (t, *J*_{H,H} = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 4.31 (m, 2H, CH₂), 4.29 (m, 2H, CH₂), 3.79 (m, 2H, CH₂), 3.75 (m, 2H, CH₂), 3.38 (s, 3H, CH₃), 3.36 (s, 3H, CH₃), 3.02 (t, *J*_{H,H} = 6.0 Hz, 2H, CH₂); ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156.3, 153.5, 152.9, 148.0, 146.9, 146.0, 140.0, 131.1, 128.9, 121.6, 121.6, 120.2, 118.7, 108.9, 108.2, 103.2, 70.1, 70.0, 68.3, 68.0, 58.3, 58.3, 52.9, 41.7; HRMS (ESI+) *m/z* 480.2355 (M + H⁺) (calcd for C₂₄H₃₀N₇O₄ 480.2359); FTIR (KBr ν, cm^{−1}) 3292, 2928, 2889, 1621, 1580, 1523, 1505, 1447, 1428, 1393, 1242, 1206, 1125, 927, 864, 788.

Synthesis of 8. Ferrocenecarboxylic acid (**E**) (37 mg, 0.16 mmol, 1 equiv) was added to a solution of amine **7** (77 mg, 0.16 mmol, 1 equiv) in 8 mL of dichloromethane. Then, *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (50 mg, 0.24 mmol, 1.5 equiv) and 4-dimethylaminopyridine (2 mg, 0.016 mmol, 0.1 equiv) were added to the stirred solution. The reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. Then, all of the volatiles were evaporated. The remaining oil was subjected to column chromatography on SiO₂ [12:1 (v/v) dichloromethane/methanol]. Chromatographically purified **8** was crystallized from a dichloromethane/*n*-hexane mixture as a yellow crystalline solid in 61% (68 mg) yield: ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.54 (s, 1H, NH), 8.60 (s, 1H, H 1,2,3-triazole), 8.47 (s, 1H, N=CH–N quinazoline), 8.29 (t, *J*_{H,H} = 1.8 Hz, 1H, C₆H₄), 7.98 [t, *J*_{H,H} = 6.0 Hz, 1H, C(O)NH], 7.92 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 7.87 (ddd, *J*_{H,H} = 7.8, 1.8, 1.2 Hz, 1H, C₆H₄), 7.53 (dt, *J*_{H,H} = 7.8, 1.2 Hz, 1H, C₆H₄), 7.44 (t, *J*_{H,H} = 7.8 Hz, 1H, C₆H₄), 7.22 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 4.73 (pt, *J*_{H,H} = 1.8 Hz, 2H, C₅H₄), 4.60 (t, *J*_{H,H} = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 4.31 (pt, *J*_{H,H} = 1.8 Hz, 2H, C₅H₄), 4.29 (m, 4H, CH₂), 4.09 (s, 5H, C₅H₅), 3.78 (m, 2H, CH₂), 3.75 (m, 2H, CH₂), 3.71 (q, *J*_{H,H} = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 3.37 (s, 3H, CH₃), 3.35 (s, 3H, CH₃); ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 169.5, 156.3, 153.5, 152.9, 148.0, 146.9, 146.2, 140.0, 131.1, 128.9, 121.6, 120.2, 118.6, 108.2, 108.2, 103.2, 76.1, 70.1, 70.0, 69.9, 69.3, 68.3, 68.1, 68.0, 58.3, 58.3, 49.1; HRMS (ESI+) *m/z* 692.2279 (M + H⁺) (calcd for C₃₅H₃₈N₇O₅Fe 692.2284); FTIR (KBr ν, cm^{−1}) 3323, 3094, 2930, 2888, 1622, 1580, 1526, 1506, 1447, 1427, 1391, 1296, 1241, 1206, 1126, 925, 863, 788. Anal. Calcd for C₃₅H₃₇N₇O₅Fe: C, 60.79; H, 5.39; N, 14.18. Found: C, 60.68; H, 5.25; N, 14.00.

Synthesis of 9. An acid (F) (81 mg, 0.10 mmol, 1 equiv) was added to a stirred solution of amine 7 (50 mg, 0.10 mmol, 1 equiv) in 5 mL of dichloromethane. Then, *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (31 mg, 0.15 mmol, 1.5 equiv) and 4-(dimethylamino)pyridine (1.2 mg, 0.01 mmol, 0.1 equiv) was added to the stirred solution. The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. Then, all of the volatiles were evaporated under reduced pressure. The remaining oil was subjected to column chromatography on SiO₂ [11:1 (v/v) dichloromethane/methanol]. Chromatographically purified **9** was crystallized from a dichloromethane/*n*-hexane mixture as a yellow crystalline solid in 48% (60 mg) yield: ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.12 (d, *J*_{H,H} = 2.4 Hz, 1H, H-pydz), 9.99 (dd, *J*_{H,H} = 6.0, 0.6 Hz, 1H, H-pydz), 9.52 (s, 1H, NH), 8.54 (s, 1H, H 1,2,3-triazole), 8.47 (s, 1H, N=CH–N quinazoline), 8.28 (t, *J*_{H,H} = 1.8 Hz, 1H, C₆H₄), 8.13 (dd, *J*_{H,H} = 6.0, 2.4 Hz, 1H, H-pydz), 8.07 [t, *J*_{H,H} = 6.0 Hz, 1H, C(O)NH], 7.91 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 7.82 (dd, *J*_{H,H} = 7.8, 1.2 Hz, 1H, C₆H₄), 7.51 (dt, *J*_{H,H} = 7.8, 1.2 Hz, 1H, C₆H₄), 7.41 (t, *J*_{H,H} = 7.8 Hz, 1H, C₆H₄), 7.22 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 4.49 (t, *J*_{H,H} = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 4.30 (m, 4H, CH₂), 3.79 (m, 2H, CH₂), 3.75 (m, 2H, CH₂), 3.57 (q, *J*_{H,H} = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 3.37 (s, 3H, CH₃), 3.36 (s, 3H, CH₃), 2.84 (t, *J*_{H,H} = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 2.18 (t, *J*_{H,H} = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 1.91 (quin, *J*_{H,H} = 7.2 Hz, 2H, CH₂); ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 190.3, 190.1, 171.9, 164.1, 162.2, 156.4, 153.6, 152.8, 150.3, 148.1, 146.2, 140.0, 133.0, 131.0, 128.9, 121.7, 120.2, 118.8, 108.1, 108.1, 103.3, 70.1, 70.0, 68.4, 68.0, 58.4, 58.3, 49.1, 38.8, 34.2, 31.0, 24.8; HRMS (ESI+) *m/z* 1240.1208 (M + H⁺) (calcd for C₃₈H₃₈N₉O₁₁Cl₂Re₂ 1240.1183); FTIR (KBr ν, cm^{−1}) 3322, 3067, 2930, 2047, 2029, 1937, 1911, 1668, 1621, 1594, 1581, 1522, 1506, 1450, 1428, 1390, 1241, 1205, 1125, 926, 864, 788. Anal. Calcd for C₃₈H₃₇N₉O₁₁Cl₂Re₂: C, 36.84; H, 3.01; N, 10.17. Found: C, 36.77; H, 3.11; N, 10.02.

Synthesis of 10. Acid **G** (103 mg, 0.13 mmol, 1 equiv) was added to a stirred solution of amine 7 (62 mg, 0.13 mmol, 1 equiv) in 5 mL of dichloromethane. Then, *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (41 mg, 0.20 mmol, 1.5 equiv) and 4-(dimethylamino)pyridine (1.6 mg, 0.013 mmol, 0.1 equiv) were added to the stirred solution. The resulting reaction mixture was stirred at ambient temperature for 3 h. Then, all of the volatiles were evaporated. The remaining oil was subjected to column chromatography on SiO₂ [12:1 (v/v) dichloromethane/methanol]. Chromatographically purified **10** was crystallized from a dichloromethane/*n*-hexane mixture as a yellow crystalline solid in 74% (121 mg) yield: ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.13 (d, *J*_{H,H} = 2.4 Hz, 1H, H-pydz), 10.01 (dd, *J*_{H,H} = 6.0, 0.6 Hz, 1H, H-pydz), 9.53 (s, 1H, NH), 8.54 (s, 1H, H 1,2,3-triazole), 8.47 (s, 1H, N=CH–N quinazoline), 8.28 (t, *J*_{H,H} = 1.2 Hz, 1H, C₆H₄), 8.16 (dd, *J*_{H,H} = 6.0, 2.4 Hz, 1H, H-pydz), 8.03 [t, *J*_{H,H} = 6.0 Hz, 1H, C(O)NH], 7.91 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 7.83 (dd, *J*_{H,H} = 7.8, 1.2 Hz, 1H, C₆H₄), 7.51 (dt, *J*_{H,H} = 7.8, 1.2 Hz, 1H, C₆H₄), 7.42 (t, *J*_{H,H} = 7.8 Hz, 1H, C₆H₄), 7.22 (s, 1H, CH Ar quinazoline), 4.48 (t, *J*_{H,H} = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 4.30 (m, 4H, CH₂), 3.79 (m, 2H, CH₂), 3.75 (m, 2H, CH₂), 3.57 (q, *J*_{H,H} = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 3.37 (s, 3H, CH₃), 3.36 (s, 3H, CH₃), 2.87 (t, *J*_{H,H} = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 2.13 (t, *J*_{H,H} = 7.2 Hz, 2H, CH₂), 1.66–1.55 (m, 4H, CH₂); ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ 190.3, 190.1, 172.3, 164.1, 162.2, 156.3, 153.6, 152.8, 150.7, 148.0, 146.8, 146.2, 140.0, 132.9, 131.0, 128.9, 121.7, 121.6, 120.2, 118.7, 108.9, 108.1, 103.2, 70.1, 70.0, 68.3, 68.0, 58.3, 58.3, 49.0, 38.7, 34.7, 31.3, 28.4, 24.5; HRMS (ESI+) *m/z* 1254.1317 (M + H⁺) (calcd for C₃₉H₄₀N₉O₁₁Cl₂Re₂ 1254.1339); FTIR (KBr ν, cm^{−1}) 3324, 3067, 2933, 2047, 2030, 1937, 1912, 1666, 1621, 1581, 1523, 1505, 1450, 1428, 1390, 1241, 1125, 926, 863, 788. Anal. Calcd for C₃₉H₃₉N₉O₁₁Cl₂Re₂: C, 37.38; H, 3.14; N, 10.06. Found: C, 37.40; H, 3.09; N, 10.01.

Photophysical Characterization. Electronic absorption spectra were recorded with a Shimadzu UV 2700 spectrophotometer. Stationary emission spectra were recorded with an Edinburgh FS 900 CDT spectrofluorometer. The quantum yield of luminescence (Φ_{PL}) was determined through a reference method using quinine sulfate in 0.05 mol dm^{−3} H₂SO₄ (Φ_f = 0.51) as a standard.⁷⁹ Luminescence decay lifetimes were determined by time-resolved single-photon counting (SPC) on an Edinburgh FL 900 CDT

spectrofluorometer, equipped with an IBH Nanoled emitting diode (297 nm, pulse width of <750 ps). Luminescence decays were analyzed using FAST Advanced Analysis of Fluorescence Kinetics software (Edinburgh Instruments, version 3).

Docking Studies. The three-dimensional structures of the synthesized ligands were obtained by modifying the crystallographic structure of *S*-[*N*-(ferrocenylmethyl)carbamoylmethyl]-glutathione [Protein Data Bank (PDB) entry 5L6X], followed by energy minimization with Merck Molecular Force Field⁸⁰ but keeping the geometry of the ferrocene subunit constrained, as we have previously reported.⁵¹ The potential missing side chains in the residues of the tyrosine kinase domain of the EGFR in a complex with erlotinib (PDB entry 1M17, resolution of 2.60 Å)²⁴ were completed using Dunbrack's rotamer library,⁸¹ followed by the attribution of the proper ionization states (physiological pH) to all residues using UCFS Chimera.⁸² Molecular docking simulations were performed using GOLD, as we described in our previous paper.⁵¹ Briefly, in this software, the degrees of freedom of the imputed ligands are encoded as binary strings called genes that make up a chromosome, thus representing the pose of the ligand. Subsequently, a genetic algorithm is used to select the fittest docked poses (i.e., the ones that best interact with the target) to be carried on to the next generation, where random/biased mutations are applied to further increase the genetic (conformational) diversity.⁸³ Our model was set to evaluate 100 generations of poses for each imputed ligand, and then the top 10 poses, ranked using the GoldScore fitness function,⁶⁸ were selected for visual inspection and definition of the most probable binding mode on the basis of both the docking scores and their relative position to the crystallographic pose of erlotinib. Simulations were performed in a 15 Å radius docking sphere starting at the geometric center of the crystallographic ligand, for which the redocking runs yielded an RMSD of heavy atoms of 1.31 Å.

Cell Lines, Viruses, and Pseudotypes. The HEK293T (CRL-3216, ATCC), MDCK.2 (CRL-2936, ATCC), A549 (CCL-185, ATCC), Calu-3 (HTB-55, ATCC), and BHK-21 (G43) cells (generously provided by G. Zimmer, Institute of Virology and Immunology, Bern, Switzerland) were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Carlsbad, CA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco) and 100 units/mL penicillin and streptomycin (P/S, Gibco). The BHK-21 (G43) cells were further supplemented every third or fourth passage with 0.5 μg/mL hygromycin B and 100 μg/mL zeocin. Ii-hybridoma cells (CRL-2700, ATCC) were cultured in Minimal Essential Medium (MEM, Gibco) supplemented with 15% FBS and 100 units/mL P/S. The A/Puerto Rico/8/34 (IAV PR8) influenza virus was reconstituted from the previously described eight-plasmid system and propagated on the MDCK.2 cells.

For the analysis of the impact of organometallic compounds on the entry of coronaviruses, we employed a surrogate system based on VSV*ΔG-FLuc pseudotypes bearing the S proteins of SARS-CoV-1 and -2, as well as the VSV G protein as a control. These pseudotypes, encoding GFP and firefly luciferase, were propagated in transgenic BHK-21 (G43) cells, which express the VSV G protein upon induction with mifepristone. To produce VSV pseudotypes carrying the SARS-CoV S proteins, VSV pseudotypes expressing the VSV G protein were used to transduce HEK293T cells that had been previously transfected with plasmids encoding the S proteins of SARS-CoV-1 and -2, specifically pCAGGS-SARS-CoV-1-S and pCG1-SARS-2-S, respectively (courtesy of S. Pöhlmann, German Primate Center-Leibniz Institute for Primate Research, Göttingen, Germany). Following a 1 h incubation of the transfected HEK293T cells with the VSV pseudotypes, the supernatant was removed, cells were washed gently with warm PBS, and fresh culture medium supplemented with anti-VSV G antibodies produced by Ii-hybridoma cells was added. The supernatants containing the VSV-SARS-CoVs S pseudotypes were collected 48 h after transduction.

Anticancer Activity of Organometallic–Erlotinib Compounds. The A549, Calu3, HEK293T, and MDCK cells were cultured in 96-well plates at a concentration of 2 × 10⁵ cells/mL and incubated overnight at 37 °C with 5% CO₂. Following incubation, the

medium was removed, and the cells were washed with warm PBS. Subsequently, a medium containing serial dilutions of organometallic–erlotinib conjugates at final concentrations of 1, 10, and 100 μ M or a control medium containing DMSO was added to the cells. The final concentration of DMSO was 1%. After a 24 h incubation period at 37 $^{\circ}$ C, cytotoxic effects were assessed using the CellTiter-Glo 2.0 Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI), according to manufacturer's instructions. The Cell Titer-Glo 2.0 assay quantitating the amount of ATP present indicates the presence of metabolically active cells. The assay is based on chemical oxidation of luciferin by thermostable luciferase using ATP and O₂ to produce an emissive oxidation product. It does not involve any light-induced excitation of luminescent probe(s). To perform the assay, the culture medium was gently removed, and 50 μ L of the reagent was added per well. The plates were then incubated for 10–15 min at room temperature. After incubation, the lysates were transferred to white 96-well plates, and the luminescence was measured using a Hidex (Turku, Finland) Sense Plate Reader.

Identification of EGFR Kinase Activity Inhibitors. To evaluate the inhibition of EGFR kinase activity by selected organometallic conjugates, we utilized the ADP-Glo EGFR Kinase Assay (Promega) conducted in 96-well plates according to the manufacturer's protocol. In each well, we combined 10 μ L of EGFR (50 ng), 10 μ L of a substrate/ATP mixture containing 1 μ g of poly(Glu4Tyr1) and 50 μ M ATP, and 5 μ L of the organometallic compounds being tested at final concentrations of 1, 10, and 100 μ M or DMSO as a control. The ADP-Glo Kinase Assay is a luminescent kinase assay that quantitates the amount of ADP formed from a kinase-catalyzed transformation of ADP into ATP, which is a substrate in the following reaction catalyzed by Ultra-Glo Luciferase that generates a luminescent signal. The signal positively correlates with ADP concentration and kinase activity. The mixture was incubated at room temperature for 60 min. Subsequently, 25 μ L of ADP-Glo Reagent was added to each well, followed by incubation for 40 min at room temperature. Then, 50 μ L of kinase detection reagent was added to each well, and the plate was incubated for an additional 30 min at room temperature. Finally, the luminescence was measured using a Hidex Sense Plate Reader.

Influence of ROS Generation on Anticancer Activity. A549 cells were seeded in a 96-well plate at a concentration of 2×10^5 cells/mL and incubated overnight at 37 $^{\circ}$ C in a 5% CO₂ atmosphere. Following overnight incubation, the medium was replaced with fresh medium containing 3 mM NAC (NAC; Merck, Darmstadt, Germany), and the cells were incubated for 1 h. Subsequently, the medium was supplemented with the ferrocenyl compounds being investigated at final concentrations of 1, 10, and 100 μ M or DMSO as a control. The final concentration of DMSO was 1%. Following a 24 h incubation period at 37 $^{\circ}$ C and 5% CO₂, the medium was removed and cytotoxicity was assessed using the CellTiter-Glo 2.0 Cell Viability Assay (Promega), according to the manufacturer's instructions.

Antiviral Activity Assays. To analyze the effect of organometallic–erlotinib conjugates on the replication of the influenza A virus, MDCK cells were cultured at a density of 2×10^5 cells/mL in 96-well plates. Following the removal of the culture medium and a wash with warm PBS, the cells were incubated in infection medium (DMEM supplemented with 0.2% BSA, 100 units/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin) containing A/PR/8/34 (H1N1) at a multiplicity of infection of 0.01. After 1 h at 37 $^{\circ}$ C and 5% CO₂, the medium containing the virus was replaced with fresh infection medium supplemented with 0.5 μ g/mL N-acetylated trypsin (Merck) and the studied organometallic–erlotinib conjugates at various concentrations (0, 1, 10, and 100 μ M). After incubation for 48 h at 37 $^{\circ}$ C and 5% CO₂, the supernatants were collected and centrifuged to eliminate the remains of the cells. The viral titers in culture supernatants were determined by a focus formation assay, as described previously. In brief, serial 10-fold dilutions of samples were prepared and added to MDCK cells. After incubation for 1 h, the medium was replaced with an infection medium containing an Avicel overlay and 0.5 μ g/mL N-acetylated trypsin (Merck). After

incubation for 24 h, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, washed twice with warm PBS, and subsequently incubated with a quencher (0.5% Triton, 20 mM glycine, and PBS) for 10 min at ambient temperature. Then, the cells were washed again and incubated with mouse anti-influenza A virus nucleoprotein antibodies (Merck) for 1 h. Subsequently, the cells were washed and incubated for 1 h with rabbit FITC conjugated anti-mouse antibodies (Merck). Finally, foci were counted under the fluorescence microscope, and viral titers were calculated as focus forming units (FFU) per milliliter of culture supernatant.

In a separate experiment, HEK293T cells transfected with plasmids expressing ACE-2 and TMPRSS2 were treated with increasing concentrations of erlotinib and compounds **5**, **9**, and **10** and then transduced with VSV-SARS-CoVs S pseudotypes, using VSV pseudotypes bearing VSV-G protein as a control. The efficiency of pseudotype-mediated transduction was analyzed 24 h after transduction by determining luciferase activities. The result of a single experiment carried out in triplicate is shown. Similar results were obtained in two separate experiments. To examine the influence of erlotinib conjugates on coronavirus entry, HEK293T cells previously transfected with plasmids encoding ACE-2 and TMPRSS2 were incubated for 1 h at 37 $^{\circ}$ C with the respective organometallic conjugates (or erlotinib) at concentrations of 0, 1, 10, and 100 μ M, followed by transduction with VSV-SARS-CoVs S pseudotypes. After a 1 h incubation and a PBS wash, fresh culture medium was applied. The luminescence, indicative of transduction efficiency, was measured 24 h later using ONE-Glo substrate (Promega) on a Hidex Sense Plate Reader. Control experiments involved transduction with VSV pseudotypes expressing the VSV-G protein, with the efficiency assessed through luciferase activity measurements 24 h after transduction.

Examination of S–ACE-2 Interaction in the Presence of Erlotinib Conjugates. To identify the antiviral activity mechanism, we first examined the binding of the SARS-CoV-2 S receptor binding domain to its cellular receptor ACE-2 with a SARS-CoV-2 Inhibitory Screening Kit (Adipogen Life Sciences, San Diego, CA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, the 96-well ELISA plate was coated with SARS-CoV-2 S and left overnight at 4 $^{\circ}$ C. Next, the plate was blocked with a blocking buffer for 2 h at room temperature. Subsequently, the organometallic–erlotinib conjugates at concentrations of 0, 1, 10, and 100 μ M were added, and the mixture was incubated for 1 h at 37 $^{\circ}$ C. After the incubation, the plate was washed and then incubated with horseradish peroxidase (HRP)-labeled streptavidin for 1 h at room temperature. Finally, the TMB substrate was added, and the absorbance was measured at 450 nm with a Hidex Sense Plate Reader.

Study of the Proteolytic Cleavage of the S and HA Protein by TMPRSS2. For the inhibition of IAV HA and SARS-CoV-2 S proteolytic cleavage, HEK293T cells were seeded in six-well plates at a density of 2.8×10^5 cells/well and cultured for 24 h, and then Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) co-transfected with plasmids encoding IAV HA or SARS-CoV-2 S and plasmids encoding TMPRSS2 was added. Four hours after transfection, the medium was changed with fresh one containing 10 μ M of **5**, **9** or **10**. At 44 h after compounds addition (48 h after transfection), the cells were harvested in PBS and processed for Western blot analysis as described above. Expression of SARS-CoV-2 S protein was detected by staining with mouse anti-SARS-CoV-2 S antibodies (Invitrogen), followed by incubation with an HRP-coupled anti-mouse secondary antibody (Invitrogen). IAV HA cleavage was detected by staining with a goat anti-FLUAV polyclonal antibody (Millipore) raised against the H1 subtype. As a loading control, the expression of β -actin was detected with anti- β -actin antibodies (Sigma).

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.organomet.4c00145>.

¹H NMR, ¹³C NMR, HRMS, electronic absorption, and luminescence spectra (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Konrad Kowalski – University of Lodz, Faculty of Chemistry, Department of Organic Chemistry, 91-403 Lodz, Poland;

orcid.org/0000-0003-0600-3205;

Email: konrad.kowalski@chemia.uni.lodz.pl, kondor15@wp.pl

Paweł Zmora – Department of Molecular Virology, Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, 61-704 Poznan, Poland; Email: pzmora@ibch.poznan.pl

Authors

Przemysław Biegański – University of Lodz, Faculty of Chemistry, Department of Organic Chemistry, 91-403 Lodz, Poland

Monika Gazecka – Department of Molecular Virology, Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, 61-704 Poznan, Poland

Rafał Nowak – Department of Molecular Virology, Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, 61-704 Poznan, Poland

Aleksander Gorski – Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Sciences, 01-224 Warsaw, Poland; orcid.org/0000-0002-5182-5614

Natalia Dutkiewicz – Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Sciences, 01-224 Warsaw, Poland; orcid.org/0000-0001-7883-1531

Daniel Fábio Kawano – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas - UNICAMP, Campinas 13083-871 SP, Brazil

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.organomet.4c00145>

Author Contributions

*P.B. and M.G. contributed equally to this work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

P.B. thanks the National Science Centre in Cracow, Poland (Grant Preludium UMO-2021/41/N/ST4/00059), for financial support. The authors thank Gert Zimmer from the Institute of Virology and Immunology, Mittelhaeusern, Switzerland, and Stefan Pöhlmann from the German Primate Center - Leibniz Institute for Primate Research for providing the VSV*ΔG-FLuc pseudotype system and the plasmids encoding SARS-CoV S proteins.

REFERENCES

- (1) Sharma, S. V.; Bell, D. W.; Settleman, J.; Haber, D. A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 169–181.
- (2) Einhorn, L. H.; Fee, W. H.; Farber, M. O.; Livingston, R. B.; Gottlieb, J. A. Improved chemotherapy for small-cell undifferentiated lung cancer. *JAMA* **1976**, *235*, 1225–1229.
- (3) Boni, C.; Cocconi, G.; Bisagni, G.; Ceci, G.; Peracchia, G. Cisplatin and etoposide (VP-16) as a single regimen for small cell lung cancer. A phase II trial. *Cancer* **1989**, *63*, 638–642.
- (4) Sierocki, J. S.; Hilaris, B. S.; Hopfan, S.; Martini, N.; Barton, D.; Golbey, R. B.; Wittes, R. B. cis-Dichlorodiammineplatinum(II) and VP-16–213: an active induction regimen for small cell carcinoma of the lung. *Cancer Treat. Rep.* **1979**, *63*, 1593–1597.
- (5) Murray, N.; Turrisi, A. T. A review of first-line treatment for small-cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2006**, *1*, 270–278.
- (6) Clegg, A.; Scott, D. A.; Hewitson, P.; Sidhu, M.; Waugh, N. Clinical and cost effectiveness of paclitaxel, docetaxel, gemcitabine, and vinorelbine in non-small cell lung cancer: a systematic review. *Thorax* **2002**, *57*, 20–28.
- (7) Fuld, A. D.; Dragnev, K. H.; Rigas, J. R. Pemetrexed in advanced non-small-cell lung cancer. *Exp. Opin. Pharmacotherapy* **2010**, *11*, 1387–1402.
- (8) Comella, P.; Frasci, G.; Panza, N.; Manzione, L.; Lorusso, V.; Di Rienzo, G.; Cioffi, R.; De Cataldis, G.; Maiorino, L.; Bilancia, D.; Nicoletta, G.; Natale, M.; Carpagnano, F.; Pacilio, C.; De Lena, M.; Bianco, A.; Comella, G. Cisplatin, gemcitabine, and vinorelbine combination therapy in advanced non-small-cell lung cancer: a phase II randomized study of the southern Italy cooperative Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 1526–1534.
- (9) Comella, P.; Frasci, G.; Panza, N.; Manzione, L.; De Cataldis, G.; Cioffi, R.; Maiorino, L.; Micillo, E.; Lorusso, V.; Di Rienzo, G.; Filippelli, G.; Lamberti, A.; Natale, M.; Bilancia, D.; Nicoletta, G.; Di Nota, A.; Comella, G. Randomized trial comparing cisplatin, gemcitabine, and vinorelbine with either cisplatin and gemcitabine or cisplatin and vinorelbine in advanced non-small-cell lung cancer: interim analysis of a phase III trial of the southern Italy cooperative oncology group. *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 1451–1457.
- (10) Ayala-Aguilera, C. C.; Valero, T.; Lorente-Macias, A.; Baillache, D. J.; Croke, S.; Unciti-Broceta, A. Small molecule kinase inhibitor drugs (1995–2021): medical indication, pharmacology, and synthesis. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 1047–1131.
- (11) Skoulidis, F.; Li, B. T.; Dy, G. K.; Price, T. J.; Falchook, G. S.; Wolf, J.; Italiano, A.; Schuler, M.; Borghaei, H.; Barlesi, F.; Kato, T.; Curioni-Fontecedro, A.; Sacher, A.; Spira, A.; Ramalingam, S. S.; Takahashi, T.; Besse, B.; Anderson, A.; Ang, A.; Tran, Q.; Mather, O.; Henary, H.; Ngarmchamnanrith, G.; Friberg, G.; Velcheti, V.; Govindan, R. N. Sotorasib for lung cancers with KRAS p.G12C mutation. *Engl. J. Med.* **2021**, *384*, 2371–2381.
- (12) Kong, X.; Pan, P.; Sun, H.; Xia, H.; Wang, X.; Li, Y.; Hou, T. Drug discovery targeting anaplastic lymphoma kinase (ALK). *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 10927–10954.
- (13) Zhou, Y.; Xiang, S.; Yang, F.; Lu, X. Targeting gatekeeper mutations for kinase drug discovery. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 15540–15558.
- (14) Schneider, M.; Delfosse, V.; Gelin, M.; Grimaldi, M.; Granell, M.; Heriaud, L.; Pons, J.-L.; Cohen Gonsaud, M.; Balaguer, P.; Bourguet, W.; Labesse, G. Structure-based and knowledge-informed design of B-Raf inhibitors devoid of deleterious PXR binding. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 1552–1566.
- (15) Song, M. Progress in discovery of KIF5B-RET kinase inhibitors for the treatment of non-small-cell lung cancer. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3672–3681.
- (16) Matikonda, S. S.; McLaughlin, R.; Shrestha, P.; Lipshultz, C.; Schnermann, M. J. Structure-activity relationships of antibody-drug conjugates: a systematic review of chemistry on the Trastuzumab scaffold. *Bioconjugate Chem.* **2022**, *33*, 1241–1253.
- (17) Hirsch, F. R.; Varella-Garcia, M.; Bunn, P. A., Jr; Di Maria, M. V.; Veve, R.; Bremnes, R. M.; Barón, A. E.; Zeng, C.; Franklin, W. A. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 3798–3807.
- (18) Krause, D. S.; Van Etten, R. A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 172–187.
- (19) Jotte, R. M.; Spigel, D. R. Advances in molecular-based personalized non-small-cell lung cancer therapy: targeting epidermal growth factor receptor and mechanisms of resistance. *Cancer Med.* **2015**, *4*, 1621–1632.
- (20) Pawar, V. G.; Sos, M. L.; Rode, H. B.; Rabiller, M.; Heynck, S.; van Otterlo, W. A. L.; Thomas, R. K.; Rauh, D. Synthesis and Biological Evaluation of 4-Anilinoquinolines as Potent Inhibitors of

Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2892–2901.

(21) Ayati, A.; Moghimi, S.; Salarinejad, S.; Safavi, M.; Pouramiri, B.; Foroumadi, A. A review on progression of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors as an efficient approach in cancer targeted therapy. *Bioorg. Chem.* **2020**, *99*, 103811.

(22) Soria, J.-C.; Wu, Y.-L.; Nakagawa, K.; Kim, S.-W.; Yang, J.-J.; Ahn, M.-J.; Wang, J.; Yang, J. C.-H.; Lu, Y.; Atagi, S.; Ponce, S.; Lee, D. H.; Liu, Y.; Yoh, K.; Zhou, J.-Y.; Shi, X.; Webster, A.; Jiang, H.; Mok, T. S. K. Gefitinib plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy in EGFR-mutation-positive non-small-cell lung cancer after progression on first-line gefitinib (IMPRESS): a phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol.* **2015**, *16*, 990–998.

(23) Pao, W.; Miller, V.; Zakowski, M.; Doherty, J.; Politi, K.; Sarkaria, I.; Singh, B.; Heelan, R.; Rusch, V.; Fulton, L.; Mardis, E.; Kupfer, D.; Wilson, R.; Kris, M.; Varmus, H. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13306–13311.

(24) Stamos, J.; Sliwkowski, M. X.; Eigenbrot, C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 46265–46272.

(25) Park, J. H.; Liu, Y.; Lemmon, M. A.; Radhakrishnan, R. Erlotinib binds both inactive and active conformations of the EGFR tyrosine kinase domain. *Biochem. J.* **2012**, *448*, 417–423.

(26) Dyall, J.; Gross, R.; Kindrachuk, J.; Johnson, R. F.; Olinger, G. G.; Hensley, L. E.; Frieman, M. B.; Jahrling, P. B. Middle east respiratory syndrome and severe acute respiratory syndrome: current therapeutic options and potential targets for novel therapies. *Drugs* **2017**, *77*, 1935–1966.

(27) Rota, P. A.; Oberste, M. S.; Monroe, S. S.; Nix, W. A.; Campagnoli, R.; Icenogle, J. P.; Peñaranda, S.; Bankamp, B.; Maher, K.; Chen, M.-h.; Tong, S.; Tamin, A.; Lowe, L.; Frace, M.; DeRisi, J. L.; Chen, Q.; Wang, D.; Erdman, D. D.; Peret, T. C. T.; Burns, C.; Ksiazek, T. G.; Rollin, P. E.; Sanchez, A.; Liffick, S.; Holloway, B.; Limor, J.; McCaustland, K.; Olsen-Rasmussen, M.; Fouchier, R.; Günther, S.; Osterhaus, A. D. M. E.; Drosten, C.; Pallansch, M. A.; Anderson, L. J.; Bellini, W. J. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* **2003**, *300*, 1394.

(28) Zhou, P.; Yang, X.-L.; Wang, X.-G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.-R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.-L.; Chen, H.-D.; Chen, J.; Luo, Y.; Guo, H.; Jiang, R.-D.; Liu, M.-Q.; Chen, Y.; Shen, X.-R.; Wang, X.; Zheng, X.-S.; Zhao, K.; Chen, Q.-J.; Deng, F.; Liu, L.-L.; Yan, B.; Zhan, F.-X.; Wang, Y.-Y.; Xiao, G.-F.; Shi, Z.-L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **2020**, *579*, 270–273.

(29) Sarkar, A.; Mandal, K. Repurposing an antiviral drug against SARS-CoV-2 main protease. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 23492–23494.

(30) Wan, W.; Zhu, S.; Li, S.; Shang, W.; Zhang, R.; Li, H.; Liu, W.; Xiao, G.; Peng, K.; Zhang, L. High-throughput screening of an FDA-approved drug library identifies inhibitors against arenaviruses and SARS-CoV-2. *ACS Infect. Dis.* **2021**, *7*, 1409–1422.

(31) Cannalire, R.; Cerchia, C.; Beccari, A. R.; Di Leva, F. S.; Summa, V. Targeting SARS-CoV-2 proteases and polymerase for COVID-19 treatment: state of the art and future opportunities. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 2716–2746.

(32) Ghahremanpour, M. M.; Tirado-Rives, J.; Deshmukh, M.; Ippolito, J. A.; Zhang, C.-H.; Cabeza de Vaca, I.; Liosi, M.-E.; Anderson, K. S.; Jorgensen, W. J. Identification of 14 known drugs as inhibitors of the main protease of SARS-CoV-2. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 2526–2533.

(33) Wu, A.; Shi, K.; Wang, J.; Zhang, R.; Wang, Y. Targeting SARS-CoV-2 entry processes: the promising potential and future of host-targeted small-molecule inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2024**, *263*, 115923.

(34) Kushwaha, N. D.; Mohan, J.; Kushwaha, B.; Ghazi, T.; Nwabuike, J. C.; Koorbanally, N.; Chuturgoon, A. A. A comprehensive review on the global efforts on vaccines and repurposed drugs for combating COVID-19. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *260*, 115719.

(35) Aboul-Fotouh, S.; Mahmoud, A. N.; Elnahas, E. M.; Habib, M. Z.; Abdelraouf, S. M. What are the current anti-COVID-19 drugs? From traditional to smart molecular mechanisms. *Virology* **2023**, *20*, 241–251.

(36) dos Santos Nascimento, I. J.; de Aquino, T. M.; da Silva-Júnior, E. F. Repurposing FDA-approved drugs targeting SARS-CoV2 3CL^{pro}: a study by applying virtual screening, molecular dynamics, MM-PBSA calculations and covalent docking. *Lett. Drug Des. Discovery* **2022**, *19*, 637–653.

(37) Karim, M.; Saul, S.; Ghita, L.; Sahoo, M. K.; Ye, C.; Bhalla, N.; Lo, C.-W.; Jin, J.; Park, J.-G.; Martinez-Gualda, B.; East, M. P.; Johnson, G. L.; Pinsky, B. A.; Martinez-Sobrido, L.; Asquith, C. R. M.; Narayanan, A.; De Jonghe, S.; Einav, S. Numb-associated kinases are required for SARS-CoV-2 infection and are cellular targets for antiviral strategies. *Antiviral Res.* **2022**, *204*, 105367.

(38) Kowalski, K. A brief survey on the application of metal-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reactions to the synthesis of ferrocenyl-x-1,2,3-triazolyl-R (x = none or a linker and R = organic entity) compounds with anticancer activity. *Coord. Chem. Rev.* **2023**, *479*, 214996.

(39) Sharma, B.; Kumar, V. Has Ferrocene Really Delivered Its Role in Accentuating the Bioactivity of Organic Scaffolds? *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 16865–16921.

(40) Chellan, P.; Sadler, P. J. Enhancing the Activity of Drugs by Conjugation to Organometallic Fragments. *Chem. - Eur. J.* **2020**, *26*, 8676–8688.

(41) Sansook, S.; Hassell-Hart, S.; Ocasio, C.; Spencer, J. Ferrocenes in medicinal chemistry; a personal perspective. *J. Organomet. Chem.* **2020**, *905*, 121017.

(42) Jaouen, G.; Vessièrès, A.; Top, S. Ferrocifen type anti cancer drugs. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 8802–8817.

(43) Ortega, E.; Zamora, A.; Basu, U.; Lippmann, P.; Rodríguez, V.; Janiak, C.; Ott, I.; Ruiz, J. An Erlotinib gold(I) conjugate for combating triple-negative breast cancer. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, *203*, 110910.

(44) Couto, M.; Mastandrea, I.; Cabrera, M.; Cabral, P.; Teixidor, F.; Cerecetto, H.; Viñas, C. Small-Molecule Kinase-Inhibitors-Loaded Boron Cluster as Hybrid Agents for Glioma-Cell-Targeting Therapy. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23*, 9233–9238.

(45) Couto, M.; García, M. F.; Alamón, C.; Cabrera, M.; Cabral, P.; Merlino, A.; Teixidor, F.; Cerecetto, H.; Viñas, C. Discovery of Potent EGFR Inhibitors through the Incorporation of a 3D-Aromatic-Boron-Rich-Cluster into the 4-Anilinoquinazoline Scaffold: Potential Drugs for Glioma Treatment. *Chem. - Eur. J.* **2018**, *24*, 3122–3126.

(46) Jain, A.; Kumar, A.; Vasumathy, R.; Subramanian, S.; Sarma, H. D.; Satpati, D. Preparation of radiolabeled erlotinib analogues and analysis of the effect of linkers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2022**, *76*, 128995.

(47) Jain, A.; Kameswaran, M.; Pandey, U.; Prabhash, K.; Sarma, H. D.; Dash, A. ⁶⁸Ga labeled erlotinib: a novel PET probe for imaging EGFR over-expressing tumors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4552–4557.

(48) Lewandowski, E. M.; Skiba, J.; Torelli, N. J.; Rajnisz, A.; Solecka, J.; Kowalski, K.; Chen, Y. Antibacterial properties and atomic resolution X-ray complex crystal structure of a ruthenocene conjugated β -lactam antibiotic. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6186–6189.

(49) Lewandowski, E. M.; Szczupak, Ł.; Wong, S.; Skiba, J.; Guśpiel, A.; Solecka, J.; Vrček, V.; Kowalski, K.; Chen, Y. Antibacterial properties of metallocenyl-7-ADCA derivatives and structure in complex with CTX-M β -lactamase. *Organometallics* **2017**, *36*, 1673–1676.

(50) Skiba, J.; Kowalczyk, A.; Stączek, P.; Bernaś, T.; Trzybiński, D.; Woźniak, K.; Schatzschneider, U.; Czerwieniec, R.; Kowalski, K. Luminescent fac-[Re(CO)₃(phen)] carboxylato complexes with non-

steroidal anti-inflammatory drugs: synthesis and mechanistic insights into the *in vitro* anticancer activity of *fac*-[Re(CO)₃(phen)(aspirin)]. *New J. Chem.* **2019**, 43, 573–583.

(51) Biegański, P.; Godel, M.; Riganti, C.; Kawano, D. F.; Kopecka, J.; Kowalski, K. Click ferrocenyl-erlotinib conjugates active against erlotinib-resistant non-small cell lung cells *in vitro*. *Bioorg. Chem.* **2022**, 119, 105514.

(52) Gil-Moles, M.; Türck, S.; Basu, U.; Pettenuzzo, A.; Bhattacharya, S.; Rajan, A.; Ma, X.; Büssing, R.; Wölker, J.; Burmeister, H.; Hoffmeister, H.; Schneeberg, P.; Prause, A.; Lippmann, P.; Kusi-Nimarko, J.; Hassell-Hart, S.; McGown, A.; Guest, D.; Lin, Y.; Notaro, A.; Vinck, R.; Karges, J.; Cariou, K.; Peng, K.; Qin, X.; Wang, X.; Skiba, J.; Szczupak, Ł.; Kowalski, K.; Schatzschneider, U.; Hemmert, C.; Gornitzka, H.; Milaeva, E. R.; Nazarov, A. A.; Gasser, G.; Spencer, J.; Ronconi, L.; Kortz, U.; Cinatl, J.; Bojkova, D.; Ott, I. Metallo drug profiling against SARS-CoV-2 target proteins identifies highly potent inhibitors of the S/ACE2 interaction and the papain-like protease PL^{pro}. *Chem. - Eur. J.* **2021**, 27, 17928–17940.

(53) Gil-Moles, M.; Basu, U.; Büssing, R.; Hoffmeister, H.; Türck, S.; Varchmin, A.; Ott, I. Gold metallo drugs to target coronavirus proteins: inhibitory effects on the spike-ACE2 interaction and on PL^{pro} protease activity by auranofin and gold organometallics. *Chem. - Eur. J.* **2020**, 26, 15140–15144.

(54) Chuong, C.; DuChane, C. M.; Webb, E. M.; Rai, P.; Marano, J. M.; Bernier, C. M.; Merola, J. S.; Weger-Lucarelli, J. Noble Metal Organometallic Complexes Display Antiviral Activity against SARS-CoV-2. *Viruses* **2021**, 13, 980.

(55) de Paiva, R. E. F.; Marçal Neto, A.; Santos, I. A.; Jardim, A. C. G.; Corbi, P. P.; Bergamini, R. G. What is holding back the development of antiviral metallo drugs? A literature overview and implications for SARS-CoV-2 therapeutics and future viral outbreaks. *Dalton Trans.* **2020**, 49, 16004–16033.

(56) Karges, J.; Cohen, S. M. Metal complexes as antiviral agents for SARS-CoV-2. *ChemBioChem.* **2021**, 22, 2600–2607.

(57) Tárraga, A.; Molina, P.; Curiel, D.; López, J. L.; Velasco, M. D. Azawittig reactions of iminophosphoranes derived from ferrocenylazido ketones: preparation and electrochemical study of novel ferrocenyl-substituted azaheterocycles. *Tetrahedron* **1999**, 55, 14701–14718.

(58) Törnøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057–3064.

(59) Johansson, J. R.; Beke-Somfai, T.; Said Stålsmeden, A.; Kann, N. Ruthenium-catalyzed azide alkyne cycloaddition reaction: scope, mechanism, and applications. *Chem. Rev.* **2016**, 116, 14726–14768.

(60) Neises, B.; Steglich, W. Simple method for the esterification of carboxylic acids. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1978**, 17, 522–524.

(61) Proverbio, M.; Quartapelle Procopio, E.; Panigati, M.; Mercurio, S.; Pennati, R.; Ascagni, M.; Leone, R.; La Porta, C.; Sugni, M. Luminescent conjugates between dinuclear rhenium complexes and 17 α -ethynylestradiol: synthesis, photophysical characterization, and cell imaging. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, 17, 509–518.

(62) Skiba, J.; Kowalczyk, A.; Gorski, A.; Dutkiewicz, N.; Gapińska, M.; Strózek, J.; Woźniak, K.; Trzybiński, D.; Kowalski, K. Replacement of the phosphodiester backbone between canonical nucleosides with a dirhenium carbonyl “click” linker - a new class of luminescent organometallic dinucleoside phosphate mimics. *Dalton Trans.* **2023**, 52, 1551–1567.

(63) Ferri, E.; Donghi, M.; Panigati, G.; Prencipe, G.; D'Alfonso, L.; Zanoni, I.; Baldoli, C.; Maiorana, S.; D'Alfonso, G.; Licandro, E. Luminescent conjugates between dinuclear rhenium(I) complexes and peptide nucleic acids (PNA) for cell imaging and DNA targeting. *Chem. Commun.* **2010**, 46, 6255–6257.

(64) Palmioli, A.; Panigati, M.; Bernardi, A. Glycodendron-rhenium complexes as luminescent probes for lectin sensing. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, 16, 8413–8419.

(65) Simasi, J.; Schubert, A.; Oelkrug, C.; Gillissen, A.; Nieber, K. Primary and secondary resistance to tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. *Anticancer Res.* **2014**, 34, 2841–2850.

(66) Ikeda, R.; Vermeulen, L. C.; Lau, E.; Jiang, Z.; Kavanaugh, S. M.; Yamada, K.; Kolesar, J. M. Isolation and characterization of erlotinib-resistant human non-small cell lung cancer A549 cells. *Oncology Lett.* **2011**, 2, 91–94.

(67) Wu, Q.; Li, M.-y.; Li, H.-q.; Deng, C.-h.; Li, L.; Zhou, T.-y.; Lu, W. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the anticancer effect of erlotinib in a human non-small cell lung cancer xenograft mouse model. *Acta Pharm. Sin.* **2013**, 34, 1427–1436.

(68) Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins* **2003**, 52, 609–623.

(69) Stierand, K.; Rarey, M. PoseView - molecular interaction patterns at a glance. *J. Cheminformatics* **2010**, 2, P50.

(70) Biegański, P.; Kowalski, E.; Israel, N.; Dmitrieva, E.; Trzybiński, D.; Woźniak, K.; Vrček, Godel, M.; Riganti, C.; Kopecka, J.; Lang, H.; Kowalski, K. Electronic coupling in 1,2,3-triazole bridged ferrocenes and its impact on reactive oxygen species generation and deleterious activity in cancer cells. *Inorg. Chem.* **2022**, 61, 9650–9666.

(71) Hagen, H.; Marzenell, P.; Jentzsch, E.; Wenz, F.; Veldwijk, M. R.; Mokhir, A. Aminoferrrocene-based prodrugs activated by reactive oxygen species. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 924–934.

(72) Gan, C. J.; Li, W. F.; Li, C. N.; Li, L. L.; Zhou, W. Y.; Peng, X. M. EGF receptor inhibitors comprehensively suppress hepatitis B virus by downregulation of STAT3 phosphorylation. *Biochem. Biophys. Rep.* **2020**, 22, 100763.

(73) Palakkott, A. R.; Alneyadi, A.; Muhammad, K.; Eid, A. H.; Amiri, K. M. A.; Akli Ayoub, M.; Iratni, R. The SARS-CoV-2 spike protein activates the epidermal growth factor receptor-mediated signaling. *Vaccines* **2023**, 11, 768–779.

(74) Zettl, F.; Meister, T. L.; Vollmer, T.; Fischer, B.; Steinmann, J.; Krawczyk, A.; V'kovski, P.; Todt, D.; Steinmann, E.; Pfaender, S.; Zimmer, G. Rapid Quantification of SARS-CoV-2-Neutralizing Antibodies Using Propagation-Defective Vesicular Stomatitis Virus Pseudotypes. *Vaccines* **2020**, 8, 386.

(75) Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Schroeder, S.; Krüger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, T. S.; Herrler, G.; Wu, N.-H.; Nitsche, A.; Müller, M. A.; Drosten, C.; Pöhlmann, S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **2020**, 181, 271–280.

(76) Takeda, M. Proteolytic activation of SARS-CoV-2 spike protein. *Microbiol. Immunol.* **2022**, 66, 15–23.

(77) Kido, H.; Okumura, Y.; Yamada, H.; Le, T. Q.; Yano, M. Proteases Essential for Human Influenza Virus Entry into Cells and Their Inhibitors as Potential Therapeutic Agents. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, 13, 405–414.

(78) Heindl, M. R.; Rupp, A.-L.; Schwerdtner, M.; Bestle, D.; Harbig, A.; De Rocher, A.; Schmacke, L. C.; Staker, B.; Steinmetzer, T.; Stein, D. A.; Moulton, H. M.; Böttcher-Friebertshäuser, E. ACE2 acts as a novel regulator of TMPRSS2-catalyzed proteolytic activation of influenza A virus in airway cells. *J. Virol.* **2024**, 98, No. e0010224.

(79) Velapoldi, R. A.; Tonnesen, H. H. Corrected emission spectra and quantum yields for a series of fluorescent compounds in the visible spectral region. *J. Fluoresc.* **2004**, 14, 465–472.

(80) Halgren, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J. Comput. Chem.* **1996**, 17, 490–519.

(81) Shapovalov, M. V.; Dunbrack, R. L., Jr. A smoothed backbone-dependent rotamer library for proteins derived from adaptive kernel density estimates and regressions. *Structure* **2011**, 19, 844–858.

(82) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, 1605–1612.

(83) de Oliveira Neto, X. A.; Alves, A. C. S.; Dias Junior, R. A.; Rodrigues, R. P.; Lancellotti, M.; Almeida, W. P.; Kawano, D. F. Molecular docking reveals the binding modes of anticancer

alkylphospholipids and lysophosphatidylcholine within the catalytic domain of CTP:phosphocholine cytidyltransferase (CCT). *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2020**, *122*, 1900422.