

## Statusartikel

Ugeskr Læger 2022;184:V02220103

# Viroporiners potentiale som lægemiddeltargets med fokus på SARS-CoV-2

Jon D. Sund<sup>1, 2</sup>, Signe Bollerup<sup>1</sup>, Jakob B. Glamann<sup>1</sup>, Caroline A.N. Vinten<sup>1</sup>, Louise R. Jensen<sup>1</sup>, Trine L. Toft-Bethelsen<sup>3</sup>, Bo H. Bentzen<sup>2</sup>, Thomas Kledal<sup>4</sup>, Nina Weis<sup>1, 5</sup> & Mette Rosenkilde<sup>2, 4</sup>

1) Infektionsmedicinsk Afdeling, Københavns Universitetshospital – Hvidovre Hospital, 2) Biomedicinsk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, 3) Institut for Neurovidenskab, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet, 4) Synklino, 5) Institut for Klinisk Medicin, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet

Ugeskr Læger 2022;184:V02220103

### HOVEDBUDSKABER

- Der er behov for præparater til behandling af COVID-19, som er effektive, sikre, billige og nemme at administrere.
- Blokering af viroporinet protein E med amantadin i SARS-CoV-2 kan muligvis bremse sygdomsprogression.
- Targetering og forskning i viroporiner kan være et nyt antiviralt terapiregime.

Efter år med varierende smittetal og status for SARS-CoV-2-pandemien som samfundskritisk sygdom er denne status nu afblæst. Men pandemien har ført til, at verdenssamfundet igen har erfaret, hvordan en virusinfektion kan belaste, og at behovet for nye antivirale midler er stort. En mulig strategi mod både SARS-CoV-2 og fremtidens pandemier er genanvendelse af allerede lanceret medicin, såkaldt drug repurposing, hvor et lægemiddel anvendes til et andet formål, end det oprindeligt blev godkendt til. En strategi, som med fordel kan udforskes ved akut behov for effektive lægemidler. Denne statusartikel vil med udgangspunkt i nyligt publicerede in vitro-data diskutere, om en veletableret, såkaldt viroporinblokker, amantadin, potentielt kan anvendes mod SARS-CoV-2, samt gennemgå generel targetering af viroporiner som antiviral strategi.

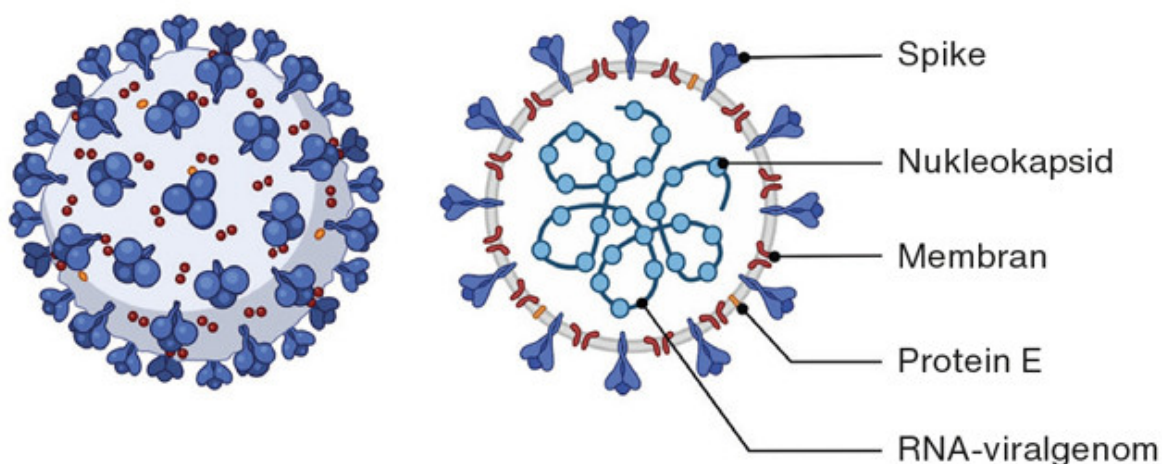
### MANGLER I DEN VIRALE TERAPI

I kampen mod SARS-CoV-2, som i 2019 gav anledning til en global pandemi, har den hurtige udvikling af vacciner skabt håb om ingen eller mildere sygdomsudvikling. Men der er fortsat et stort behov for at undersøge, om man til dem, som bliver syge med COVID-19, kan genanvende allerede lancerede lægemidler til at forebygge og/eller bekæmpe systemisk SARS-CoV-2-progression. Især hos personer, som grundet deres alder, komorbiditeter eller ringe adgang til sundhedstilbud befinder sig i risikogruppe for et alvorligt forløb. Nye lægemidler er ofte dyre og kan være underlagt produktionsbegrænsninger, som gør, at de kan være svært tilgængelige, specielt for økonomisk bebyrdede samfund [1, 2]. Denne genanvendelse har f.eks. været forsøgt med remdesivir til behandling af COVID-19 [3].

Der er derfor behov for billige lægemidler, som kan masseproduceres, let distribueres, og som er relativt bivirkningsfrie i behandlingen af COVID-19. Tidligere i pandemiens forløb har der været foreslået både glukokortikoidderivater og antivirale stoffer, men oftest til allerede progredierede forløb eller med potentielle bivirkninger, som gør, at anvendelse er kontraindiceret [4]. Ydermere bremses udviklingen af nye antivirale

stoffer ofte af virus' genetiske diversitet. Virus kommer i mange udgaver med forskellige typer af arvemateriale, accessoriske proteiner og patofysiologi. Blandt virale kendetegn, såsom kapsel- og spikeproteiner, er de virale ionkanaler, viroporinerne, blevet identificeret som endnu et protein at targetere i behandlingsøjemed (Figur 1) [5, 3]. Netop virus' mange genetiske udgaver er for viroporinerne i SARS-CoV-1 og SARS-CoV-2 ikke for nuværende et problem, idet de væsentlige viroporiner i disse virus er sekventielt identiske (præservede) [6], hvorfor de hypotetisk kan være mulige behandlingsmål. Rationalet for nedenstående er, om man med antiviral terapi kan targetere viroporiner direkte og tidligt i forløbet for at undgå progression.

**FIGUR 1** Overordnet struktur af humant SARS-CoV-2, inklusive protein E.

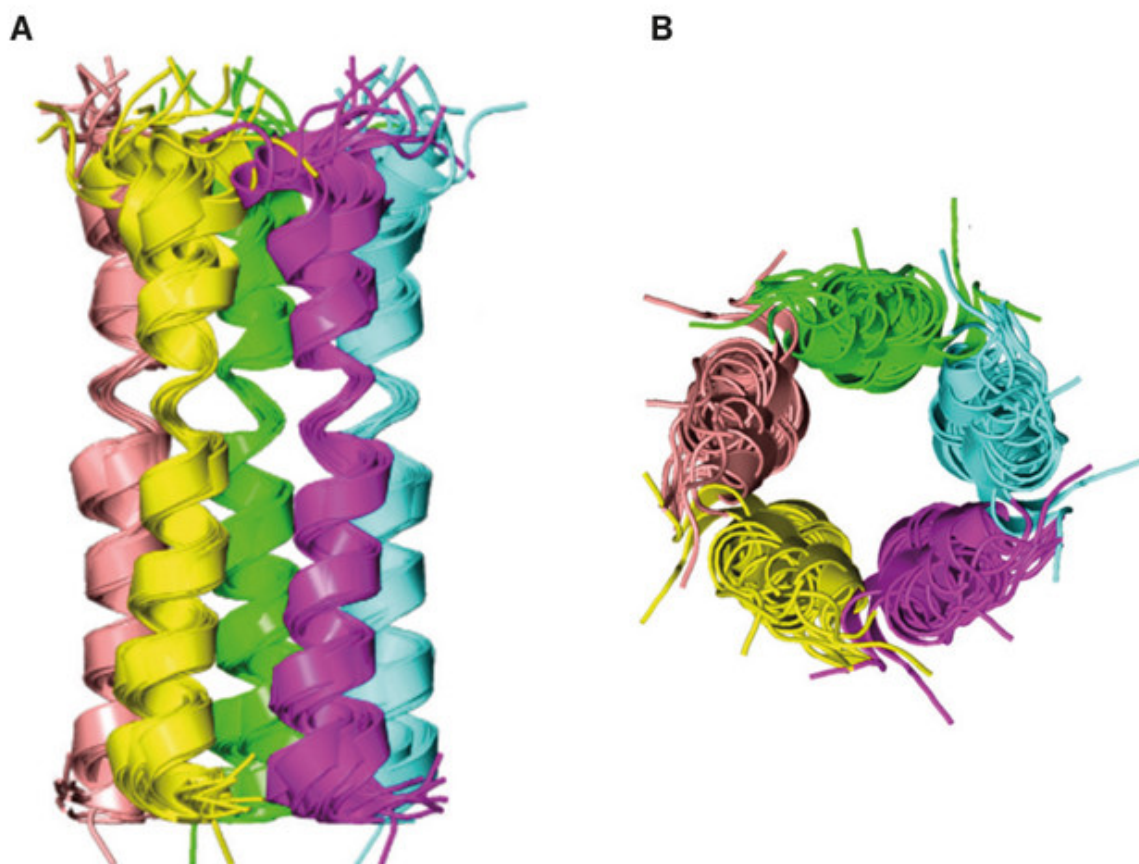


Figuren er lavet med BioRender.com

## VIROPORINER: SMÅ I STØRRELSE – STORE AF BETYDNING

Som Figur 2 illustrerer, består viroporiner oftest af færre end 120 aminosyrer og indeholder en eller flere hydrofobe sekvenser, der danner en eller flere transmembrane alfa-helices. De besidder evnen til at oligomerisere ved, at de enkelte komponenter, monomerer, går sammen og danner en transmembran ionkanal. I forskellige organeller, som f.eks. mitokondrier med en eller flere specialiserede funktioner, assisterer ionstrømmene et virusfavorabelt miljø, der bidrager til replikation, proteinsyntese, virusspredning m.m. [7, 8, 9]. Netop viroporinernes lille størrelse og relativt simple funktion gør dem til en kvalificeret kandidat i terapeutisk regi ved fastlægnelse af struktur, interaktion og ionstrømsmålinger. Ionkanaler er i dag mål for lægemidler inden for mange ikkeinfektøse terapeutiske regimer, bl.a. inden for kardiologi og neurologi [10], og håbet er, at de også vil kunne gøre gavn som led i ny antiviral terapi.

**FIGUR 2** SARS-CoV-2/protein E set fra siden (A) og oppefra (B). De fem alfahelices ses markeret med forskellige farver, og det er disse, som konstituerer ionkanalen med den hydrofobe pore i membraner, hvorigennem ionerne kan passere.



Figuren er lavet med BioRender.com

Opdagelsen af viroporinmedierede ionstrømme i flere virus, som f.eks. respiratorisk syncytialvirus, ebolavirus, hiv, humant papillomavirus, cytomegalovirus og SARS-CoV-2, åbner for nye behandlingsmuligheder [11-13]. Ved hjælp af nutidens teknologi er håbet at opbygge viden om viroporiner som mål for lægemidler. Det undersøges derfor i skrivende stund, om viroporinblokkeren amantadin, som tidligere har været anvendt mod influenzavirus med tvivlsom effekt [14, 15], har effekt mod SARS-CoV-2.

#### GENANVENDELSE AF AMANTADIN SOM LÆGEMIDDEL TIL BEHANDLING AF SARS-COV-2

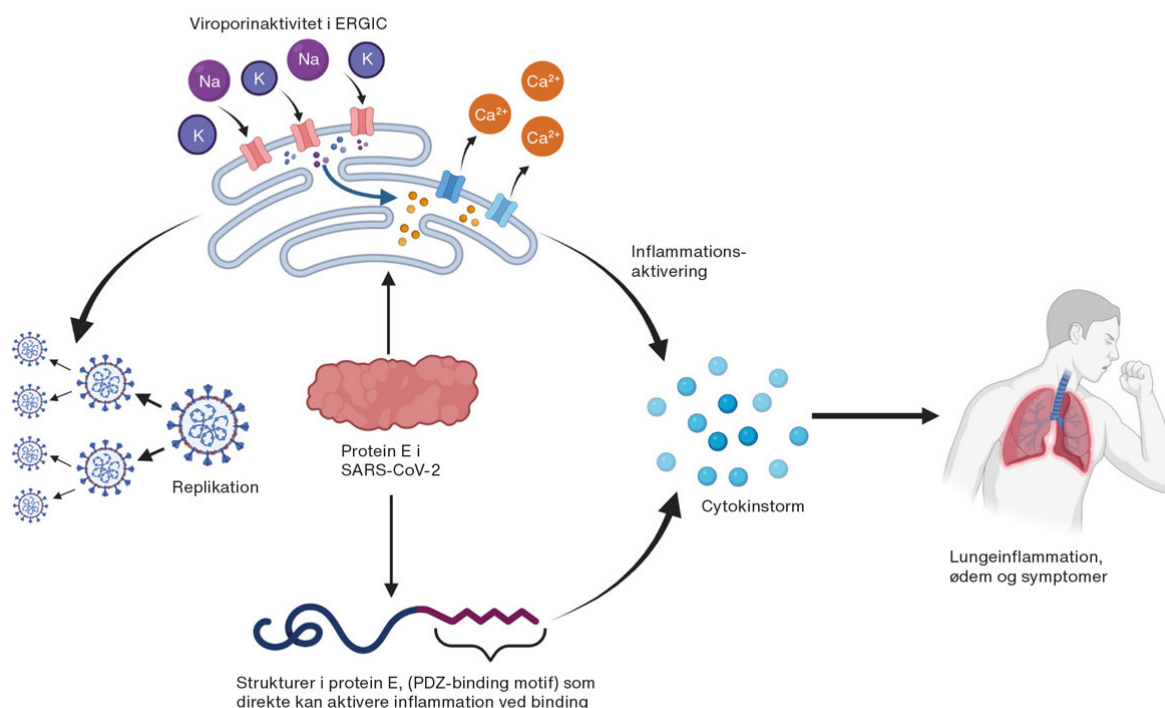
Amantadins antivirale egenskaber blev første gang beskrevet i 1960'erne [14]. Præparatet har en fortid i behandling af influenza A, men anvendes i dag hovedsageligt som antiparkinsonismemiddel, hvor det dæmper dyskinesier ved at blokere inotrope N-methyl-D-aspartatsyre-glutamatreceptorer i hjernen [16]. Ved blokering af et velbeskrevet viroporin, influenza A's M2-protonkanal [6, 8, 15] forhindres en strøm af hydrogenioner gennem

proteinets pore. M2 er afgørende for pH-ækvivalens over virusmembranen ved virusinternalisering, dvs. initial infektion af værtscellen, samt over transgolgiembranen i værtscellens cytoplasma. Begge processer er vitale for virus' replikation og sygdomsprogression [8]. Amantadin kan desværre ikke længere anvendes mod influenza A, fordi der i løbet af årtiers anvendelse er udviklet resistens [17]. Men interaktioner, binding til M2 og strukturer for amantadin-M2-komplekset er velbeskrevne, bivirkningerne undersøgt, opbevaringsspørgsmålet besvaret, og prisen er lav [15].

Da COVID-19-pandemien brød ud, blev det hurtigt kendt, at spikeproteinet havde central betydning for etablering af SARS-CoV-2-infektion, men viroporinerne, som også er isoleret i SARS-CoV-2, har ligeledes været genstand for interesse. Blandt flere beskrevne viroporiner i SARS-CoV-2 er særligt én interessant: envelopeproteinet (protein E), som er betydeligt præserveret fra SARS-CoV-1 [6].

Protein E danner et alfahelikalt transmembrant protein af fem monomerer – en pentamer – som danner selve poren, der bl.a. indsættes i endoplasmatic reticulum-golgi intermediate compartment (ERGIC). Herigennem kan natrium og kalium passere og bidrage til et virusfavorabelt miljø og til inflammation (**Figur 3**) [6, 18].

**FIGUR 3** Protein E's rolle i sygdomsudvikling og progression. Viroporinet indsættes i ERGIC (endoplasmatic reticulum-golgi intermediate compartment) og lækker herfra kationer, som bidrager til inflammation og replikation. Ydermere koder protein E for et afgørende motiv (PDZ-bindende motiv), som via en direkte interaktion menes at bidrage til inflammation.



Figuren er lavet med BioRender.com

## PROTEIN E SOM MÅL FOR AMANTADINBASERET BEHANDLING AF SARS-COV-2

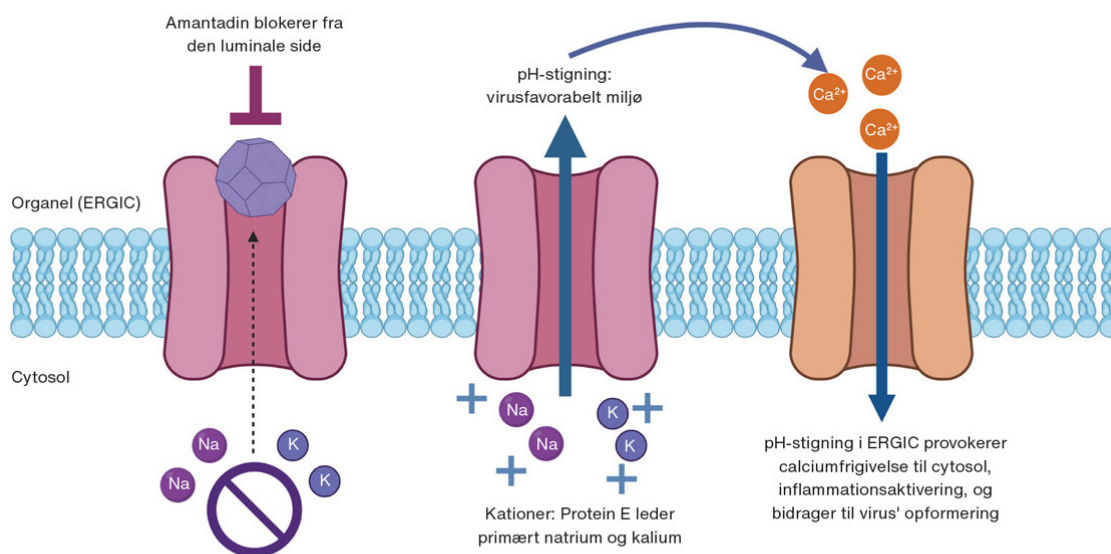
SARS-CoV-1-pandemien i 2003, omend beskeden i forhold til SARS-CoV-2, gav anledning til en del forskningsaktivitet [19]. Det blev bl.a. vist, at viroporinerne protein E og 3a, som begge findes i SARS-CoV-1, fremmer replikation og virulens, og at deletion af særligt protein E-genet inhiberer virus [20]. Konkret er det vist, at et knockout af protein E's ionkanalaktivitet og konduktans (passage af ioner) i SARS-CoV-1 øger overlevelsen



blandt populationer af mus og hæmmer udviklingen af lungeødem samt den væsentlige infektiøse komplikation acute respiratory distress syndrome (ARDS) [21, 22].

På cellulært niveau ses ved knockout af protein E en reduktion i inflammasomaktivering og inflammationsmarkørerne IL-1 $\beta$  og NF- $\kappa$ B, som har betydning for virulens, inflammation og dermed sygdomsbyrde [21, 22]. Det er ved SARS-CoV-1 påvist in vitro og i mus, at amantadin binder til den transmembrane alfahelixregion af protein E og blokerer denne effektivt [8, 23, 24]. Med udgangspunkt i den store sekventielle lighed mellem protein E i SARS-CoV-1 og SARS-CoV-2 er det derfor blevet undersøgt, om interaktionen var tilsvarende i SARS-CoV-2. Ved analyse af binding, ionkonduktans og 3D-strukturfremstilling er det blevet vist, at amantadin også her binder, interagerer og blokerer protein E effektivt (**Figur 4**) [21]. Vores hypotese er derfor, at targetering og inhibition af protein E i SARS-CoV-2 hos mennesker vil kunne begrænse sygdomsprogression [6, 20, 21, 22]. Dette er understøttet af antivirale studier i celler, hvor amantadin blokerer SARS-CoV-2-replikation [25, 26]. Amantadins søsterstof, rimantadin, der betragtes som mindre toksisk og har udvist god effekt mod SARS-CoV-2 i in vitro-studier, blokerer ikke viroporiner i SARS-CoV-2, og er derfor ikke undersøgt in vivo [6].

**FIGUR 4** Til venstre ses amantadins virkningsmekanisme: blokering af protein E. I midten ses, hvordan protein E bidrager til inflammation og virulens via iontransport. Den røde ionkanal repræsenterer protein E. Til højre repræsenteres de ionkanaler, som lækker calcium til cytosol, hvoraf protein E menes at indgå. De primære ioner, som ledes af protein E, er natrium og kalium.



ERGIC = endoplasmatic reticulum-golgi intermediate compartment.  
Figuren er lavet med BioRender.com

Strategien med targetering af netop protein E i SARS-CoV-2 er særligt relevant, fordi protein E har større indvirkning på levedygtighed og formåen af SARS-CoV-2 i forhold til virus' andre viroporiner (3a og open reading frame 10 (ORF10)) [6, 21]. Sidstnævnte er nyopdaget (2020), er ikke til stede i SARS-CoV-1, og dens patogenetiske funktion er ikke klarlagt, men der er vist en overudtrykkelse af viroporinet i svære COVID-19-tilfælde og en tilsvarende minimal ekspression i mildere tilfælde [27]. ORF10 er, ligesom protein E, væsentligt konserveret siden pandemiens udbrud mellem forskellige SARS-CoV-2-stammer og kan derfor være af potentiel terapeutisk interesse. Et andet perspektiv til targetering af viroporiner og den mulige effekt af amantadin og andre etablerede ionkanalblokkere er, at SARS-CoV-2 som nævnt indeholder flere viroporiner, men er langtfra det

eneste virus med disse ionkanaler, som potentielt kan blokeres. Resultater peger nemlig på, at andre viroporiner i bl.a. dengue-, chikungunya- og hepatitis C-virus også interagerer med amantadin [28-30].

## ACT-STUDIET – AMANTADIN TIL BEHANDLING AF COVID-19

I et samarbejde mellem Biomedicinsk Institut, Københavns Universitet, og Infektionsmedicinsk Afdeling, Hvidovre Hospital, undersøges det i et randomiseret, placebokontrolleret, dobbeltblindet, klinisk forsøg, om symptomer, sygdomsprogression og hospitalisering kan begrænses hos risikopatienter med påvist SARS-CoV-2 ved peroral administration af amantadin inden for fem dage efter positiv PCR-podning. Studiet er godkendt af Videnskabsetisk Komite (j.nr. H-21021001), Videnscenter for Dataanmeldelse (nr. P-2021-331) og Lægemiddelstyrelsen (EudraCt-nr. 2021-001177-22) og anmeldt på ClinicalTrial.gov (protokol-ID 02032021).

Forsøget bygger på inklusion af 242 borgere i risikogrupper, som enten får aktiv behandling med kapsel-amantadin eller placebo i forholdet 1:1. Borgere over 18 år modtager invitation via digital post inden for fem dage efter positiv PCR for SARS-CoV-2 med henblik på screening inden inklusion. Risikogrupper for svært COVID-19-forløb er borgere > 40 år eller > 18 år med mindst en af følgende komorbiditeter: kronisk hjerte-, lunge- eller nyresygdom (glomerulær filtrationsrate < 60 ml/min.), diabetes, hypertension eller BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>. En række eksklusionskriterier gennemgås, nyrefunktion måles for at sikre, at nyrerne kan eliminere amantadin tilstrækkeligt effektivt, og medicinsk prævention eller tilstedeværelse af menopause hos kvinder i den fertile alder sikres. Derudover gennemgås deltagernes medicin for at sikre, at de ikke indtager kontraindiceret medicin eller anden godkendt COVID-19-behandling sideløbende. Efter inklusion indtager forsøgsdeltagerne i alt ti kapsler amantadin 100 mg/placebo – 2 stk. dagligt i fem konsekutive dage. Effekt af behandling vurderes ud fra patientrapporterede data i form af dagligt fremsendte spørgeskemaer på dag 2-7 samt dag 14, 28 og 90. De primære effektmål er klinisk status vurderet ud fra selvudfyldte spørgeskemaer, herunder sygdomseftervirkninger, på dag 14. De sekundære effektmål er mortalitet, hospitalisering inklusive respiratorincidens og -varighed samt andelen af deltagere med en negativ PCR-test på dag 7. Sideløbende monitoreres bivirkninger, som forventes at være relativt få og milde grundet den lave dosis og den korte behandlingsperiode, i al fald relativt til de bivirkninger, der ses i behandling af dyskinesier, og de neurologiske bivirkninger, der er beskrevet ved behandling af influenza A [15].

## KONKLUSION

Det er påvist, at amantadin in vitro kan blokere viroporinerne protein E og ORF10a i SARS-CoV-2 samt virusreplikation [6, 25, 26], hvilket åbner en teoretisk mulighed for, at præparatet kan genanvendes til behandling af COVID-19. Vi undersøger dette i ACT-studiet som beskrevet ovenfor.

Vi håber, at studiet kan vise, om amantadin er det første præparat til at lukke for ionstrømmen gennem protein E-poren i SARS-CoV-2 in vivo og derved have en terapeutisk effekt. Viroporiner synes alt andet lige at være mulige kandidater som mål for lægemidler i antiviral terapi.

**Korrespondance** *Mette Rosenkilde*. E-mail: rosenkilde@sund.ku.dk

**Antaget** 7. april 2022

**Publiceret på ugeskriftet.dk** 13. juni 2022

**Interessekonflikter** Der er anført potentielle interessekonflikter. Forfatterernes ICMJE-formularer er tilgængelige sammen med artiklen på ugeskriftet.dk

Referencer findes i artiklen publiceret på ugeskriftet.dk

Artikelreference Ugeskr Læger 2022;184:V02220103

## SUMMARY

### The antiviral targeting potential of viroporins

Jon D. Sund, Signe Bollerup, Jakob B. Glamann, Caroline A.N. Vinten, Louise R. Jensen, Trine L. Toft-Bethelsen, Bo H. Bentzen, Thomas N. Kledal, Nina Weis & Mette Rosenkilde

Ugeskr Læger 2022;184:V02220103

Viroporins are ion channels found in many viruses, where they contribute to virus life cycle and thereby pathogenesis. Viroporin targeting is a known, yet largely unexplored, therapeutic strategy so far only used in Influenza A with the drugs amantadine and rimantadine. In this review, we seek to utilize the inhibition by amantadine of the viroporin Protein E in SARS-CoV-2 in an attempt to treat COVID-19 in its early stages. We are executing a double-blinded placebo-controlled trial based on promising in vivo and in vitro work as a stepping-stone for establishing a therapeutic antiviral regime: blocking of viroporins.

## REFERENCER

1. Dance A. The challenges of antiviral treatments, 2021. <https://knowablemagazine.org/article/health-disease/2021/challenges-antiviral-treatments> (2. sep 2021).
2. Cash R & Patel V. Has COVID-19 subverted global health? *Lancet*. 2020;395(10238):1687-88.
3. Fally M. Remdesivir til behandling af COVID-19 – en »game changer«? Formentlig ikke, 2001. [ugeskriftet.dk/debat/remdesivir-til-behandling-af-covid-19-en-game-changer-formentlig-ikke](https://ugeskriftet.dk/debat/remdesivir-til-behandling-af-covid-19-en-game-changer-formentlig-ikke) (29. nov 2021).
4. Dansk Selskab for Infektionsmedicin. Retningslinje til behandling af voksne patienter med Covid-19, 2021. [www.infmed.dk/guidelines](http://www.infmed.dk/guidelines) (5. dec 2021).
5. Agarwal A, Rochweg B, Lamontagne F et al. A living WHO guideline on drugs for Covid-19. *BMJ* 2020;370:m3379.
6. Toft-Bertelsen TL, Jeppesen MG, Tzortzini E et al. Amantadine has potential for the treatment of COVID-19 because it inhibits known and novel ion channels encoded by SARS-CoV-2. *Commun Biol*. 2021;4(1):1347.
7. Scott C & Griffin S. Viroporins: structure, function and potential as antiviral targets. *J Gen Virol*. 2015;96(8), 2000-27.
8. Kozakov D, Chuang G-Y, Beglov D, Vajda D. Where does amantadine bind to the influenza virus M2 proton channel? *Trends Biochem Sci*. 2010;35(9):471-75.
9. Nieva JL, Madan V & Carrasco L. Viroporins: structure and biological functions. *Nat Rev Microbiol*. 2010;10(8):563-74.
10. Willumsen NJ, Bech M, Olesen S-P et al. High throughput electrophysiology: new perspectives for ion channel drug discovery. *Recept Channels*. 2003;9(1):3-12.
11. Gonzalez ME & Carrasco L. Viroporins. *FEBS Lett*. 2003;552(1):28-34.
12. He J, Melnik LI, Komin A et al. Ebola virus delta peptide is a viroporin. *J Virol*. 2017;91(16):e00438-17.
13. Sze CW, Tan Y-J. Viral membrane channels: role and function in the virus life cycle. *Viruses*. 2015;7(6):3261-84.
14. To J, Surya W, Torres J. Targeting the channel activity of viroporins. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2016;104:307-55.
15. Jefferson T, Demicheli V, Di Pietrantonj C, Rivetti D. Amantadine and rimantadine for influenza A in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;2006(2):CD001169.
16. Blanpied TA, Clarke RJ, Johnson JW. Amantadine inhibits NMDA receptors by accelerating channel closure during channel block. *J Neurosci*. 2005;25(13):3312-22.
17. Hussain M, Galvin HD, Haw TY et al. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management. *Infect Drug Resist*. 2017;10:121-34.
18. Mandala VS, McKay MJ, Shcherbakov AA et al. Structure and drug binding of the SARS-CoV-2 envelope protein transmembrane domain in lipid bilayers. *Nat Struct Mol Biol*. 2020;27(12):1202-1208.
19. Yang Y, Peng F, Wang R et al. The deadly coronaviruses: the 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic

- in China. *J Autoimmun.* 2020;109:102434.
20. Castaño-Rodríguez et al. Role of severe acute respiratory syndrome coronavirus viroporins E, 3a, and 8a in replication and pathogenesis. *mBio.* 2018;9(3):e02325-17.
  21. Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Verdiá-Báguena C et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2014;10(5), e1004077.
  22. DeDiego ML, Nieto-Torres JL, Regla-Nava JA et al. Inhibition of NF- $\kappa$ B-mediated inflammation in severe acute respiratory syndrome coronavirus-infected mice increases survival. *J Virol.* 2014;88(2):913-24.
  23. Wilson L, Gage P, Ewart G. Hexamethylene amiloride blocks E protein ion channels and inhibits coronavirus replication. *Virology.* 2006;353(2):294-306.
  24. Torres J, Maheswari U, Parthasarathy K et al. Conductance and amantadine binding of a pore formed by a lysine-flanked transmembrane domain of SARS coronavirus envelope protein. *Protein Sci.* 2007;16(9):2065-71.
  25. Zhou Y, Gammeltoft KA, Galli A et al. Efficacy of ion-channel inhibitors amantadine, memantine and rimantadine for the treatment of SARS-CoV-2 in vitro. *Viruses.* 2021;13(10):2082.
  26. Fink K, Nitsche A, Neumann M et al. Amantadine inhibits SARS-CoV-2 in vitro. *Viruses.* 2021;13(4):539.
  27. Pancer K, Milewska A, Owczarek K et al. The SARS-CoV-2 ORF10 is not essential in vitro or in vivo in humans. *PLoS Pathog.* 2020;16(12):e1008959.
  28. Premkumar A, Horan CR, Gage PW. Dengue virus M protein C-terminal peptide (DVM-C) forms ion channels. *J Membr Biol.* 2005;204(1):33-8.
  29. Dey D, Siddiqui SI, Mamidi P et al. The effect of amantadine on an ion channel protein from Chikungunya virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(7):e0007548.
  30. Griffin SDC, Beales LP, Clarke DS et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* 2003;535(1-3):34-8.