

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Biochemistry**

Doktorský studijní program:
Ph.D. study program:

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



Modulace aktivity HIV-1 proteasy

Modulation of HIV-1 Protease Activity

Ing. Jana Pokorná

Školitel/Supervisor: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

Praha 2013

Abstrakt

HIV-1 proteasa hraje zásadní roli v pozdní fázi životního cyklu HIV viru, kdy štěpí virové polyproteinové prekursory na strukturní a funkční proteiny. Pokud je účinně inhibována, HIV partikule zůstávají nezralé a neinfekční. Použití vysoce účinné antiretrovirové léčby (HAART) zahrnující proteasové inhibitory může snížit hladinu HIV-1 v plasmě pacientů pod detekční limit, a tak velmi významně zlepšit prognózu jejich onemocnění. Použití prvních inhibitorů bylo poznamenáno vážnými vedlejšími účinky, nízkou biologickou dostupností, nutnými vysokými dávkami léčiv a především rychlým rozvojem virové rezistence pod selekčním tlakem léčiv. Ve snaze překonat tyto komplikace byla vyvinuta druhá generace inhibitorů. Navzdory nespornému zlepšení, které přinesly do antiretrovirové léčby, je další vývoj nových velmi účinných HIV-1 proteasových inhibitorů s optimálními farmakokinetickými vlastnostmi, vysokou metabolickou stabilitou, minimalizovanými vedlejšími účinky a především s příznivým rezistenčním profilem vysoce žádoucí.

V předkládané disertační práci je uveden přehled léků k léčbě HIV spolu s vývojem substituovaných metallakboranů, nové třídy účinných, neobvyklých, nepeptidických inhibitorů HIV proteasy s terapeutickým potenciálem.

Dále je analyzován vliv substitucí v protease na vývoj rezistence vůči maturačnímu inhibitoru bevirimatu. Podle našich poznatků viry s mutovanou proteasou vykazují rozmanitější rezistenční profil k bevirimatu než viry s divokým typem proteasy. Toto pozorování může být vysvětleno různou účinností štěpení Gag substrátu různými proteasami.

Konečně, důležitou roli v mnoha biologických procesech hraje regulace enzymové aktivity malými alkalickými kationty. Jejich specifický účinek na aktivitu HIV proteasy byl studován kombinací experimentálních a výpočetních metod. Naše simulace molekulární dynamiky potvrzují, že afinita alkalických kationtů k povrchu HIV proteasy sleduje Hofmeisterovu řadu, především díky interakcím s karboxylovými skupinami aspartátů a glutamátů. V souladu s tímto pozorováním naše experimentální výsledky ukazují, že počáteční rychlost hydrolýzy peptidového substrátu v přítomnosti různých alkalických kationtů v principu sleduje Hofmeisterovu řadu, s výjimkou cesia. Vyšší katalytická účinnost (k_{cat}/K_M) v přítomnosti K^+ iontů ve srovnání s ostatními alkalickými kationty byla zjištěna v odpovídajících koncentracích solí. Překvapivě byla také pozorována vyšší rychlost štěpení specifického substrátu ve velmi malých koncentracích solí.

Abstract

HIV-1 protease plays a crucial role in the late state of the life cycle of HIV virus when it cleaves the viral polyprotein precursors into the structural and functional proteins. If it is effectively inhibited, HIV particles remain immature and noninfectious. The application of highly active antiretroviral therapy (HAART) including protease inhibitors can reduce plasma HIV-1 levels below the detection limit in adherent patients and thus dramatically change their life expectancy. The clinical utility of the first inhibitors was limited by severe side effects, low bioavailability, high pill burdens, and rapid development of viral resistance under the selection pressure of HIV antiretrovirals. To overcome these difficulties, second-generation inhibitors were developed. Despite an indisputable improvement they brought to antiretroviral therapy, the development of new highly active HIV-1 protease inhibitors with optimal pharmacokinetic properties, higher metabolic stability, little off-target activity, and particularly, more favorable resistance profiles is still of high importance.

This thesis provides an overview of anti-HIV- drugs including development of substituted metallocarboranes, a new class of potent, unusual, nonpeptidic HIV protease inhibitors with therapeutic potential.

Next, the impact of protease background on the development of resistance of maturation inhibitor bevirimat is analyzed. Our data suggest that the mutations in the protease influence the level of antiviral resistance towards bevirimat. The viruses with mutated proteases show more diverse resistance profiles compared to those with wild-type protease. These observations can be explained by the different efficiencies of the Gag substrate cleavage by the different proteases.

Finally, regulation of enzymatic activity by small alkali cations has an important role in many biological processes. Their specific effects on the HIV protease activity were studied by a combination of experimental and computational techniques. Our molecular dynamic simulations confirm that the affinity of alkali cations to the HIV protease surface follows the Hofmeister series, mostly due to interactions with carboxylate side chain groups of aspartates and glutamates. Accordingly, our experimental data also showed that the initial velocity of peptide substrate hydrolysis in the presence of different alkali cations generally follows the Hofmeister series, with the exception of caesium. The higher catalytic efficiencies (k_{cat}/K_M) in the presence of K^+ ions in comparison to other alkali cations were observed at corresponding salt concentrations. Furthermore, we observed an unexpected increase in the hydrolysis of a specific substrate at very low salt concentration.

Úvod

Epidemie viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) se od jejího rozpoznání v roce 1981 vyvinula v nejméně vážnější pandemii v moderních dějinách s přibližně 34 miliony lidí žijících s HIV a 2,5 miliony nově infikovaných lidí v roce 2011 (1). Přestože první pacienti s AIDS (Syndrom získaného selhání imunity) patřili do homosexuální komunity MSM (Muži mající sex s muži) ve Spojených státech a západní Evropě, dnes tvoří téměř polovinu nakažených lidí ženy a dvě třetiny nových případů pochází ze sub-saharské Afriky a k nákaze dochází většinou cestou heterosexuálního přenosu.

Díky intenzivním kampaním věnujícím se prevenci, testování darované krve na přítomnost HIV a zavedení úspěšné antiretrovirální léčby bránící přenosu infekce z matky na dítě, došlo k poklesu nových infekcí o více než pětinu ve srovnání s rokem 1997, kdy epidemie vrcholila. Prevence sexuálního přenosu HIV se ukázala být komplikovanější. Přes optimismus vyplývající z rozšiřující se dostupnosti léčby a preventivním programům, několik západních zemí opět čelí vzrůstajícímu počtu nově diagnostikovaných případů HIV; především v komunitě MSM, kde se toto číslo v posledních letech neustále zvyšuje (2) a kde se HIV přestala věnovat odpovídající pozornost.

Okamžitě po identifikaci HIV jako původce onemocnění AIDS začalo mnoho výzkumných týmů studovat možnosti léčby. Současně používané léky mohou být rozděleny do pěti různých tříd podle fáze životního cyklu viru, kterou blokují. Jsou to inhibitory vstupu/přichycení, reversní transkriptasy, integrasy, proteasy a zrání (3).

HIV proteasa je retrovirální aspartátová proteasa, která hraje nezbytnou roli během HIV zrání. Štěpí nově syntetizované virové polyproteinové prekursory Gag a Gag-Pol v devíti různých místech v definovaném pořadí na strukturní proteiny a funkční virové enzymy (4). Pokud je tento krok účinně blokován, HIV viriony zůstávají nezralé a neinfekční (5). Deset kompetitivních proteasových inhibitorů (PIs) bylo dosud uvedeno do klinické praxe, jeden byl stažen (3, 6-11). Vývoj a klinické uplatnění PIs je považováno za jeden z příkladů úspěšného racionálního návrhu léčiv v dějinách medicíně chemie. Zavedení PIs do terapeutických možností významně zlepšilo výsledky léčby AIDS. Nicméně je stále potřebný vývoj nových bezpečných antivirových inhibitorů s minimálními vedlejšími účinky, postihujících jak divoký typ HIV tak i rezistentní varianty a umožňující menší lékovou zátěž.

Cíle práce

Cílem předkládané práce bylo analyzovat dostupnou literaturu na téma HIV proteasa a její inhibitory a charakterizovat vztah jejich strukturních parametrů a inhibiční aktivity, mechanismus účinku a rezistenční profil dvou nových typů HIV virostatik: inhibitorů nového strukturního typu založených na metallakarboranech a inhibitoru zrání blokujícího štěpení proteinového prekursoru v určitém štěpném místě.

Druhým cílem práce bylo analyzovat vliv malých alkalických iontů na aktivitu a inhibici HIV proteasy.

Výsledky jsou shrnuty v pěti odborných článcích uvedených v práci jako příloha.

První článek zahrnutý v práci poskytuje přehled třídy proteasových inhibitorů od jejich uvedení do klinické praxe v roce 1995 k současným látkám v klinickém vývoji. Popisuje jejich mechanismus účinku, chemické struktury, farmakokinetické vlastnosti, vedlejší a nežádoucí účinky a vývoj HIV rezistence vůči těmto lékům.

Testování řady organických a anorganických látek v naší laboratoři vedlo k identifikaci metallakarboranů jako slibných farmakoforů pro nepeptidické proteasové inhibitory (12-13). Druhá část práce je zaměřená na studium vztahu strukturních parametrů a aktivity těchto látek jako inhibitorů HIV proteasy a jejich rezistentních variant.

Bevirimat (14) je jeden z inhibitorů nové experimentální třídy antiretrovirotik, které postihují nezbytný krok v životním cyklu HIV - zrání virové partikule. Třetím cílem práce bylo studovat vliv proteasových mutací způsobujících rezistenci vůči proteasovým inhibitorům na vývoj rezistence vůči bevirimatu a objasnit komplikovanou interakci mezi virovou proteasou a jejím polyproteinovým substrátem.

Interakce iontů s biomolekulami hraje důležitou roli v mnoha přírodních procesech. Jejich účinky jsou tradičně popisovány lyotropickou neboli Hofmeisterovou řadou (15). Jejich původ na molekulární úrovni však nebyl dosud plně vysvětlen. Malé molekuly včetně iontů by mohly hrát regulační roli v dosud neobjasněném mechanismu aktivace HIV proteasy v retrovirové partikuli. Specifické účinky kationtů na enzymovou aktivitu HIV proteasy byly studovány kombinací experimentálních a výpočetních metod.

Materiál a metodika

Příprava enzymů

Pro enzymové testy byla použita HIV proteasa divokého typu a její rezistentní varianty. Ty byly připraveny buď cílenou mutagenezí nebo selektovány pod tlakem klinicky používaných inhibitorů. Expres, refoldování a čištění HIV-1 PR bylo provedeno, jak bylo popsáno (16). Ve stručnosti, pro heterologní bakteriální expresi byl použit pET24a plasmidový vektor a hostitelský kmen *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen). HIV-1 PR byla čištěna z inkusních tělísek solubilizací kyselinou octovou, následovanou chromatografií na Mono S-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech). Koncentrace HIV-1 PR byla v závěru určena titrací aktivních míst pevně se vážajícím inhibitorem brecanavirem (17) a zmrazené alikvoty enzymu byly uloženy do -20 °C.

Inhibiční testy

Analýzy inhibice byly provedeny pomocí spektrofotometrických testů s použitím chromogenního peptidového substrátu KARVNle*NphEANle-NH₂, jak bylo popsáno (18). Substrát byl přidán do konečné koncentrace blízké K_m enzymu do 1 ml 0,1 M acetátového pufru, pH 4,7 s 0,3 M NaCl obsahujícího 6-8 pmol PR a různou koncentrací inhibitoru rozpuštěného v DMSO. Konečná koncentrace DMSO nepřekročila 2,5% (v/v). Hydrolýza substrátu byla sledována jako pokles absorbance při 305 nm s použitím UNICAM UV500 UV-VIS spektrofotometru (Thermo, Cambridge, USA). Výsledky byly zpracovány s použitím rovnice pro kompetitivní inhibici podle Williamse a Morrisona. Hodnoty IC₅₀ byly stanoveny pro daný inhibitor s pomocí GraFit 5 softwaru jako koncentrace nutná ke snížení původní počáteční rychlosti štěpení HIV-1 proteasou na polovinu. Mechanismus účinku inhibitoru byl stanoven pomocí výnosu Lineweavera-Burka. Dvojitě reciproké grafy počátečních rychlostí v závislosti na koncentraci substrátu pro tři různé koncentrace inhibitoru poskytly charakteristické schéma pro určitý typ mechanismu inhibice.

Kinetická analýza vlivu alkalických kationtů na aktivitu HIV-1 PR

Všechny kinetické testy byly provedeny s chromogenním peptidovým substrátem KARVNle*NphEANle-NH₂ v 50 mM pufru MES, HEPES nebo fosfátovém pufru, pH 6,0. Analýzy byly provedeny jak bylo popsáno (18), s několika modifikacemi. Typicky bylo přidáno 16 nmol substrátu do 1 ml odpovídajícího pufru obsahujícího 6-7 nmol PR a různé koncentrace

solí. Hydrolýza substrátu byla sledována jako pokles absorbance při 305 nm s použitím UNICAM UV500 UV-VIS spektrofotometru. Měření bylo provedeno v duplikátech. Hodnoty K_M a k_{cat} pro peptidový substrát byla stanoveny pomocí rovnice Michaelis-Mentenové (GraFit 5 software).

Účinnost štěpení CA/p2 místa HIV-1 proteasou divokého typu a její mutovanou formou

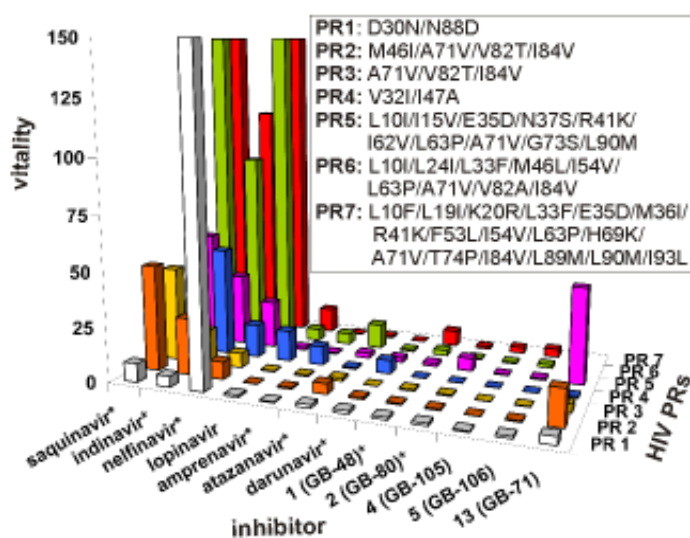
Proteolytická aktivita těchto enzymů byla testována se substráty odvozenými z Gag polyproteinu divokého typu, GagV362I a GagA364V, reprezentovanými těmito nonapeptidy: KARVL↓AEANle-NH₂, KARIL↓AEANle-NH₂ a KARVL↓VEANle-NH₂, jak bylo popsáno. Substráty (200 μM) byly inkubovány 25 min buď s proteasou divokého typu nebo s její mutovanou formou; 75 nM enzym v 50 mM pufru MES (300 mM NaCl, pH 6,0) při 37°C. Šipka označuje štěpené místo. Štěpení bylo zastaveno přidáním koncentrované kyseliny mravenčí. Reakční směs byla v triplikátech dělena na reverzní fázi HPLC kolony Zorbax SB-C18 (4,6 × 150 mm, velikost částic 1,8 μm, Agilent Technologies, USA).

Výsledky a diskuse

V předkládané disertační práci je uveden přehled HIV proteasových inhibitorů, které patří mezi nejúčinnější léky proti HIV. Proteasa hraje nezbytnou roli v pozdní fázi životního cyklu HIV. Její inaktivace genetickou mutací nebo chemickou inhibicí vede k tvorbě neinfekčních virionů, a tak se zpomaluje nebo dokonce zastavuje šíření HIV. Od r. 1987, kdy byl identifikován první antagonist HIV proteasy, bylo vyvinuto mnoho různých tříd proteasových inhibitorů, z nichž některé vykazují vynikající antivirové účinky. V současné době se v klinické praxi používá devět HIV PIs schválených FDA (Food and Drug Administration, nejvyšší orgán pro schvalování léčiv v USA) jako antivirové léky. Obvykle jsou předepisovány v kombinaci s dalšími léky, aby se dosáhlo maximálního možného účinku při co nejmenší zátěži pacienta a aby se minimalizovalo riziko vzniku rezistentních kmenů HIV. Jednotlivé třídy PIs, jejich vývoj, farmakokinetické vlastnosti, nejčastější vedlejší a nežádoucí účinky a rezistenční profily jsou uvedeny v Článku I.

Při testování schopnosti řady látek s nekonvenčními strukturálními motivy inhibovat HIV proteasu jsme identifikovali ikosahedrální borany a karborany jako účinné a selektivní inhibitory tohoto enzymu. Látky byly enzymologicky charakterizovány pomocí spektrofotometrické eseje. Krystalová struktura základního karboranu série - kobalt bis(dikarbollidu) s HIV PR ukázala vazbu dvou kobaltokarboranových klecí do aktivního místa proteasy. Tento komplex (vyřešený v

laboratoři Dr. Řezáčové) představoval vůbec první získanou krystalovou strukturu kobaltokarboranové klece v komplexu s proteinem. Abychom zvýšili vazebnou afinitu k virové protease, spojili jsme dvě mateřské klece hydrofilním spojovacím článkem umožňujícím substituci ve střední části molekuly. Skutečně, výsledná řada látek s dvojitým karboranovým klastrem vykázala hodnoty IC_{50} v submikromolární oblasti a pro neúčinnější inhibitory byly stanoveny nanomolární inhibiční konstanty. Rtg struktura divokého typu proteasy v komplexu s inhibitorem obsahujícím dva metallakarboranové klastry byla analyzována a vyřešena v rozlišení 1.7 Å. Protože pro spojovací článek chyběla experimentální elektronová hustota, jeho možné polohy byly modelovány pomocí výpočetních technik. Několik testovaných látek prokázalo schopnost účinně inhibovat panel multi-rezistentních variant HIV PR (obr. 1).



Obr. 1: Graf vitalit (relat. *in vitro* rezistence) pro sedm klinicky užívaných inhibitorů a pět metallakarboranů a sedm mutovaných HIV-1 proteas. Mutace v jednotlivých proteasách jsou uvedeny vedle grafu.

Zbývá zodpovědět otázku, do jaké míry tyto objevy otevrou cestu novým terapeutickým možnostem AIDS a farmakologickému využití karboranových inhibitorů v humánní medicíně obecně. Ačkoliv jsou tyto látky specifickými a účinnými inhibitory virového enzymu, je tu stále řada překážek. První z nich je testování karboranů v tkáňových kulturách. Technikou rozptylu světla a mikroskopickými technikami bylo pozorováno shlukování kobaltokarboranů ve vodných roztocích a tvorba nanočástic s průměrem měnícím se s koncentrací, iontovou silou a stářím roztoku (19). Kvantově mechanické výpočty naznačují, že síly, které přitahují metallakarboranové anionty v implicitním solventu k sobě, jsou relativně slabé, jen o málo silnější než příspěvek elektrostatického odpuzování (20). Tato agregace ve vodných roztocích může být vysvětlena

amfifilním charakterem kobaltokarboranů. Protože jejich celkový negativní náboj je delokalizován, vykazují tyto látky superaciditu a jejich soli jsou ve vodě plně disociovány. Bylo publikováno, že amfifilicita souvisí s povrchovou aktivitou a je všeobecně přijímán fakt, že povrchově aktivní látky mohou tvořit multimolekulární agregáty a micely ve vodných roztocích (21-24). Tyto zajímavé jevy však způsobují nereprodukovatelnost a časově závislé chování COSANů v biologických testech.

Druhou překážkou na cestě “z laboratorního stolu na lůžko” je farmakokinetika a biodostupnost testovaných látek. O biodostupnosti metallakarboranů nejsou v literatuře téměř žádné informace, nicméně povzbuzující jsou výsledky Prof. Hajdúcha z University Palackého v Olomouci, které naznačují orální dostupnost několika testovaných COSANů a jejich pomalou eliminaci z plasmy testovaných myší (Hajdúch, M., Grüner, B. a další, nepublikované výsledky).

Třetím a možná nejvýznamnějším problémem je ekonomické hledisko. Na farmaceutickém trhu je v současnosti 26 různých léků proti HIV. Další antivirotikum by muselo nejenom splňovat velmi přísná kritéria FDA o bezpečnosti a efektivnosti léčiv, ale také vykázat vyšší účinnost než látky, které jsou již dostupné. Navíc, finanční krize a probíhající reformy ve zdravotnictví vytváří tlak na snížení ceny vývoje léčiv, které šplhají k 1 miliardě dolarů na jednu látku. Výsledkem je snižující se počet nových léků uvedených ročně na trh.

Je obtížné spekulovat, jestli se COSANy stanou novým lékem proti HIV. Co je však jisté, rozšířily “chemický prostor” a reprezentují nový typ farmakoforu, který by měl být brán do úvahy jak při kombinatoriálních přístupech tak při racionálním návrhu léčiv pro nové terapeutické cíle, dokonce mimo pole HIV. Nedávné poznatky ukazují, že sulfamidové deriváty karboranových a metallakarboranových klastrů inhibují enzymovou aktivitu několika lidských karbonických anhydrasových isoenzymů (Brynda, J., Cigler, P., Grüner, B., nepublikované výsledky), z nichž jeden, transmembránový isoenzym CAIX, souvisí s rakovinným bujením (25).

V další části práce jsme analyzovali vývoj virové rezistence k novému typu antivirotika, bevirimatu. V rámci nové experimentální třídy inhibitorů zrání viru je tato látka nejpokročilejší. Postihuje poslední nejpomalejší štěpení Gag polyproteinu tak, že blokuje samotné štěpné místo, které pak není přístupné hydrolýze proteasou. Dále bylo publikováno, že bevirimat stabilizuje strukturu nezralé partikule (26). Výsledky selekčních studií našich kolegů z university v Utrechtu ukázaly, že viry s mutovanou proteasou vykazují rozmanitější rezistenční profil k bevirimatu než viry s divokým typem proteasy. Byly identifikovány a analyzovány čtyři hlavní typy mutací: Gag V362I, A364V, S368N a V370A. Naše výsledky ukazují, že různá účinnost štěpení CA/p2 místa proteasou divokého typu a mutovanou proteasou může vysvětlit závislost virové rezistence k bevirimatu a replikační rychlost na typu proteasy.

Klinické testy ukázaly, že bevirimat je účinný pouze u 50% pacientů, kteří nejsou infikováni virem se specifickou skupinou mutací v glutamin-valin-threonin (QVT) motivu nalezeném v C-koncové Gag oblasti (27). Nový mechanismus vývoje rezistence identifikovaný naší studií představuje další překážku na cestě ke klinickému využití této látky. Nicméně tyto poznatky mohou pomoci při vývoji nových inhibitorů zrání viru, v ideálním případě působících synergicky s proteasovými inhibitory.

Konečně, specifické účinky alkalických kationtů na HIV-1 proteasu byly studovány pomocí molekulárních dynamických simulací a enzymové kinetiky. Výpočetní analýzy ukázaly vyšší afinitu sodíku a lithia než draslíku a cesia k povrchu HIV-1 proteasy, především díky silným interakcím s karboxylovými skupinami aspartátů a glutamátů. Experimentální studie ukázaly, že proteolytická aktivita HIV-1 proteasy v zásadě sleduje Hofmeisterovu řadu, s výjimkou cesia. Efektivnější vazba substrátu (K_M) a vyšší číslo přeměny (k_{cat}) jsou pozorovány v přítomnosti K^+ iontů ve srovnání se Na^+ nebo Li^+ ionty v odpovídajících koncentracích solí. Dále byl pozorován neočekávaný pokles K_M pro určitý substrát a pufr ve velmi nízkých koncentracích solí. V současné době nemáme pro tento překvapivý jev vysvětlení. Domníváme se však, že by mohlo docházet ke tvorbě semistabilního komplexu substrátu s aniontem pufru, který se váže do aktivního místa proteasy pevněji než samotný substrát. Tuto hypotézu se budeme snažit ověřit pomocí dalších strukturních analýz. Nicméně naše pozorování ukázala, jak málo dosud rozumíme regulaci proteolysy v komplexních biologických systémech a jak mnoho ještě zbývá objasnit.

Závěr

První část předkládané disertační práce podává přehled současné literatury zabývající se proteasovými inhibitory. Dále byly identifikovány metallakarborany jako účinné a specifické inhibitory HIV-1 proteasy. Komplexní interakce HIV-1 proteasy s jejím polyproteinovým substrátem Gag a jejich vliv na vývoj rezistence k inhibitoru zrání viru bevirimatu objasňuje další část práce. Tyto poznatky by mohly pomoci ve vývoji nových generací proteasových a maturačních inhibitorů. Závěrem jsou studovány specifické účinky alkalických kationtů na katalytickou aktivitu HIV-1 proteasy.

Introduction

Since its recognition in 1981, the human immunodeficiency virus (HIV) epidemic has evolved in the most severe pandemic in modern times with estimated 34 million people living with HIV and 2.5 million newly infected worldwide in 2011 (1). Although the first patients with AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) were in MSM (Men who have sex with men) in the United States and Western Europe, today almost half of infected people are women and two third of all new cases come from sub-Saharan Africa, mostly via heterosexual transmission. More than 25 million people died of AIDS-related illnesses since the beginning of the epidemic, over 60 million people have been affected.

Intensive prevention campaigns, HIV screening of donated blood and successful use of antiretroviral therapy to prevent mother-to-child transmission resulted in the decline of new infections by more than one fifth compared to 1997, when the pandemic culminated. Prevention of sexual transmission has turned out to be more difficult. Despite the optimism about expanded access to treatment and prevention programs, several western countries face rising incidence of new HIV diagnoses again; particularly in the community of MSM the number has been increasing steadily in recent years (2) and the HIV has no longer appropriate collective attention there.

Immediately after the identification of HIV as the etiological agent for AIDS, many research teams both from academia and industry started to study possibilities of anti-HIV therapy. Currently used drugs can be divided into five different classes according to the phase of the HIV life-cycle that the drugs block: inhibitors of entry/attachment, reverse transcriptase, integrase, protease, and maturation (3).

HIV protease is a retroviral aspartic protease which plays an indispensable role in HIV maturation. It cleaves newly synthesized viral polyprotein precursors Gag and Gag-Pol at nine distinct sites in a defined order into structural proteins and functional viral enzymes (4). If this step is effectively blocked, HIV virions remain immature and noninfectious (5). So far, ten competitive protease inhibitors were introduced into clinical practice, one was withdrawn (3, 6-11). Development and clinical application of PIs represents the successful example of rational drug design in the history of medicinal chemistry. The inclusion of PIs to the therapeutic armamentarium has dramatically improved AIDS therapy. However, there is continuing need for novel safer and cheaper antiviral inhibitors targeting wild type as well as resistant strains of HIV, imposing low pill burden and little side-effect to the patient.

Aims of the study

The aim of this thesis was to analyze the available literature on the protease from HIV and its inhibitors and characterize the structure-activity relationship, mechanism of action, and resistance profile of two new types of anti HIV virostatics: novel structural type of HIV PR inhibitors based on metallocarborane scaffold and maturation inhibitors blocking a particular HIV protease processing site.

The second aim of the thesis was to analyze the influence of small alkali ions on the activity and inhibition of HIV PR.

The results are summarized in five full papers that are included in the thesis as enclosures.

The first paper included in the thesis provides an overview of the protease inhibitor class of anti-HIV- drugs, from their initial introduction in 1995 to the current compounds in clinical development. It describes their mechanisms of action, structures, patterns of HIV resistance development, pharmacokinetic properties, side-effects, and off-target activities.

Screening of a variety of organic and inorganic compounds in our lab led to identification of metallocarboranes as promising frameworks for nonpeptide protease inhibitors (*12-13*). The second part of the thesis aimed to explore structure-activity relationship of these compounds as inhibitors of HIV protease and its resistant mutants.

Bevirimat (*14*) is an inhibitor of a new experimental class of antiretrovirals that impede an essential step in the life-cycle of HIV, viral particle maturation. The third aim of the thesis was to study the impact of protease inhibitor resistance mutations on the development of bevirimat resistance and shed light on the complicated interactions between the viral protease and its polyprotein substrate.

The interactions of ions with biomolecules play an important role in many natural processes. These effects are traditionally described by lyotropic or Hofmeister series (*15*). However, the molecular origin of these effects is still not fully understood. Small molecules including ions might play regulatory role in the unexplored mechanism of the activation of HIV PR within retroviral particle. The cation-specific effects on the enzymatic activity of the HIV protease were investigated by a combination of experimental and computational techniques.

Material and methods

Preparation of enzymes

For enzymatic assays wild-type HIV-1 PR and its resistant variants were used. Resistant proteases were prepared by site-directed mutagenesis or selected under pressure of clinically used protease inhibitors. The expression, refolding and purification of HIV-1 PR were performed as described previously (16). Briefly, the pET24a plasmid vector and host strain *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) were used for heterologous bacterial expression. HIV-1 PR was purified from inclusion bodies by solubilization in acetic acid, followed by chromatography on Mono S-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech). The active-site concentration of HIV-1 PR in the final preparation was determined by titration with specific tight binding inhibitor brecanavir (17) and frozen aliquots of the enzyme were stored at -20 °C.

Inhibition assays

The inhibition analyses were performed by spectrophotometric assay using the chromogenic peptide substrate KARVNle*NphEANle-NH₂ as previously described (18). Substrate was added to final concentration near the K_m of the enzyme to 1 ml of 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.7, 0.3 M NaCl containing 6-8 pmol of PR and various concentrations of inhibitor dissolved in DMSO. The final concentrations of DMSO were kept below 2.5% (v/v). Substrate hydrolysis was followed as a decrease in absorbance at 305 nm using a UNICAM UV500 UV-VIS spectrophotometer (Thermo, Cambridge, USA). The data were analyzed using the equation for competitive inhibition according to Williams and Morrison. IC₅₀ values were calculated for a given inhibitors by determining concentration needed to lower the initial HIV PR activity velocity to half using GraFit 5 software. The mechanism of inhibition was determined by Lineweaver-Burk plot. Double reciprocal fits of initial rates versus concentration of substrate carried out at three fixed inhibitor concentrations were overlaid and yielded a pattern of lines characteristic of a particular mode of inhibition.

Kinetic analysis of the influence of alkali cations on the activity of HIV-1 PR

All kinetic assays were performed with chromogenic peptide substrate KARVNle*NphEANle-NH₂ in 50 mM MES, HEPES or phosphate buffer, pH 6.0. Kinetic assays were conducted as previously described (18) with some modifications. Typically, 16 nmol of substrate was added to 1 ml of the corresponding buffer containing 6-7 nmol of PR and various concentrations of salt. The substrate hydrolysis was followed by the decrease in absorbance at 305 nm using a Unicam

UV 500 spectrophotometer. All PR activity points were determined in duplicate. The K_M and k_{cat} values for the peptide substrate were calculated using the Michaelis-Menten equation (GraFit 5 software).

CA/p2 processing efficiencies of the wild-type and mutated HIV-1 protease

The proteolytic activities of these enzymes were tested with substrates derived from Gag wt, GagV362I and GagA364V, represented by the following nonapeptides: KARVL↓AEANle-NH₂, KARIL↓AEANle-NH₂, and KARVL↓VEANle-NH₂ as previously described. Substrates (200 μM) were incubated for 25 min with either wild-type or mutated protease (75 nM) enzyme in 50 mM MES buffer (300 mM NaCl, pH 6.0) at 37°C. The arrow indicates the actual cleavage site. The cleavage reaction was stopped by adding concentrated formic acid. Enzymatic reaction mixtures were resolved in triplicates on a Zorbax SB-C18 reversed phase HPLC column (4.6 × 150 mm, particle size 1.8 μm, Agilent Technologies, USA).

Results and discussion

In this PhD thesis, HIV protease inhibitors that are among most effective anti-HIV drugs, are reviewed. The HIV protease plays indispensable role in the late phase of viral cycle. Its inactivation by genetic mutation or chemical inhibition leads to the formation of noninfectious virions, thus slowing or even stopping the spread of HIV. Many different classes of HIV-1 protease inhibitors have been developed, some of them showing excellent antiviral profiles, since the first protease antagonist was identified in 1987. At present, there are nine HIV PIs at clinical practice approved by the FDA (Food and Drug Administration) as antiviral drugs. They are usually taken in drug combination regimens to achieve the highest possible benefit, tolerability, and adherence and to diminish the risk of the development of drug-resistant HIV strains. Individual classes of PIs, their development, pharmacokinetic properties, most common side-effects, off-target activities, and resistance profiles are covered in Paper I.

While screening a number of unconventional structural motifs for their ability to inhibit HIV protease, we identified icosahedral boranes and carboranes as potent and selective inhibitors of this enzyme. The compounds were characterized enzymologically by spectrophotometric assay. The crystal structure of parental compound complexed to HIV PR revealed two cobaltacarborane cages bound into the HIV-1 PR active-site cleft. This complex (solved in the lab of Dr. Řezáčová) was the first crystal structure of a carborane-protein complex ever solved. To increase binding affinity to the viral protease we connected the two parental cages with a hydrophilic linker

enabling substitution of the central part of the molecule. Indeed, resulting series of double cluster compounds showed IC_{50} values in the submicromolar range and for most potent competitive inhibitors low nanomolar inhibition constants were determined. The X-ray structure of wild-type HIV-1 PR in complex with inhibitor containing two metallacarborane clusters was analyzed and refined to 1.7 Å resolution. Because there was no continuous experimental electron density for the disordered linker, its possible positions were modeled with help of computational procedures. Several tested compounds proved their ability to effectively inhibit a panel of multi-resistant HIV PR variants (Fig.1).

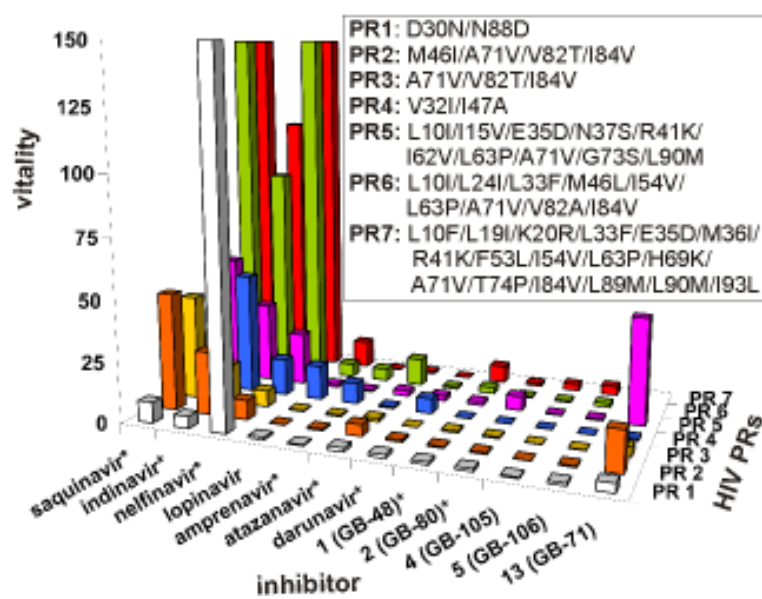


Fig. 1.: Vitality values (relat. *in vitro* resistance) of seven clinical inhibitors and five cobaltacarborane compounds analyzed with the panel of HIV-1 PR resistant species. Mutations in HIV-1 PR variants are shown in the figure inset.

It remains to be seen to what extent these findings open the way to novel treatment options for AIDS and pharmacologic use of carborane inhibitors in human medicine. Although the compounds are specific and potent inhibitors of viral enzyme, there are still numerous obstacles.

First one is the activity of tested carborane compounds in tissue cultures. The self-assembly of cobaltacarboranes in aqueous solutions and formation of the nanoparticles with the radius changing with concentration, ionic strength, and aging of solution were observed by light scattering and microscopy techniques (19). Quantum mechanic calculations suggest that the attraction of metallacarborane anions in the implicit solvent model is relatively weak, only slightly stronger than contribution of electrostatic repulsion (20). This aggregation behavior in aqueous solutions could be explained by amphiphilic character of cobaltacarboranes. Since the overall

negative charge of cobalt bis(dicarbollides) is delocalized, these compounds exhibit superacidity and their salts are fully dissociated in water. It has been shown that the amphiphilicity affects the surface activity and it is well-established fact that some of surface-active compounds can form multimolecular aggregates and micelles in aqueous solutions (21-24). These interesting phenomena in aqueous solutions, however, cause irreproducible and time-dependent behaviour of cosanes in biological tests.

Second obstacles on the way “from bench to bed” is pharmacokinetics and bioavailability of tested compounds. There are almost no data in the literature on the bioavailability of metallacarboranes, however encouraging unpublished data of Prof. Hajdúch from the Palacký University of Olomouc suggest oral availability of several of tested cosanes and their slow clearance from the plasma of tested mice (Hajdúch, M., Grüner, B. et al., unpublished observation).

The third and probably the most critical obstacle is economic consideration. There are 26 different anti-HIV agents on the market already. Another antiviral compound would have not only to meet very stringent FDA criteria of drug safety and efficacy, but also perform better than most of the compounds already on the market. Furthermore, the financial crisis and ongoing health care reforms generate pressure to reduce cost of drug development skyrocketing to 1 billion per compound. It results in decreasing number of new drugs introduced each year on the market. It is difficult to speculate whether or not cosanes will become new anti HIV drugs. What is, however, already clear is that this class of compounds enlarged the “chemical space” and represents new type of pharmacophore that should be taken into account in rational drug design as well as in combinatorial approaches for novel therapeutic targets, even outside HIV field. Recently, sulfamide derivatives of carborane and metallacarborane clusters were shown to inhibit enzymatic activity of several human carbonic anhydrase isoenzymes (Brynda, J., Cigler, P., Grüner, B., unpublished results). One of them, the transmembrane isoenzyme CAIX is associated with cancer and tumor progression (25).

In further part of the thesis, we analyzed the viral resistance development towards new type of antiviral drug, bevirimat. It is the most advanced compound of the novel experimental class of maturation inhibitors. It hampers the ultimate rate-limiting cleavage step during processing of the Gag polyprotein by targeting the structural protein itself. Furthermore, it was reported that bevirimat has a stabilizing effect on the immature Gag lattice (26). Resistance selection studies of our colleagues from University in Utrecht show that the protease background has impact on the resistance profile for the bevirimat, which becomes more diverse for viruses with a mutated protease compared to viruses with a wild-type protease. The major mutations were identified and

analyzed: Gag V362I, A364V, S368N, and V370A. Our results indicate that change of the processing of CA/p2 cleavage site by mutated HIV proteases as compared to the wild type HIV PR can explain the protease-dependent bevirimat resistance and replication level. It was previously reported that bevirimat is effective only in 50 percent of patients not having a specific group of mutations in the glutamine-valine-threonine (QVT) motif found in the C-terminal Gag region (27). Novel mechanism of resistance development, suggested by our study, represents another obstacle on the way to clinical use of this compound. Nevertheless, the knowledge gained during the work on this inhibitor could provide help in the development of new maturation inhibitors, ideally exhibiting synergy with protease inhibitors.

Finally, ion specific effects of alkali cations on the HIV-1 protease have been studied by means of molecular dynamic simulations and enzyme kinetics. Computational analysis showed higher affinity of sodium and lithium over potassium and caesium to the HIV-1 protease surface, mainly due to stronger interactions with carboxylate side chain groups of aspartates and glutamates. Experimental studies demonstrated that the proteolytic activity of the HIV-1 protease in principle follows the Hofmeister series, with the exception of caesium. More effective substrate binding (K_M) and turnover number (k_{cat}) are observed in the presence of K^+ compared to Na^+ or Li^+ at corresponding salt concentrations. Furthermore, unexpected decrease in the K_M value was observed for a specific substrate and buffer at very low salt concentration.

At present we have no specific explanation for this surprising observation. We speculate that in the low salt concentration, a semi-stable complex between the substrate and MES anion is formed that binds more effectively to the HIV PR binding site than the substrate alone. The attempt to analyze this hypothesis on structural level will continue. Nevertheless, this surprising observation shows how little we still understand about the regulation of proteolysis in complex biological systems and how much there is still left to analyze and study.

Conclusions

To summarize, in the first part of this PhD thesis, the current literature on HIV protease inhibitors was reviewed. Next, metallacarboranes were identified as potent and specific HIV-1 protease inhibitors. Further, our results highlighted the complex interaction between the HIV-1 protease and its substrate Gag that affects the development of HIV-1 resistance to the maturation inhibitor bevirimat. These findings can help to develop the next generation of protease and maturation inhibitors. Finally, specific effects of alkali cations on the catalytic activity of HIV-1 protease were studied.

References

1. www.unaids.org/en/aboutunaids/ (27.3.2013).
2. Prejean, J., Song, R., Hernandez, A., Ziebell, R., Green, T., Walker, F., Lin, L. S., An, Q., Mermin, J., Lansky, A., and Hall, H. I. (2011) Estimated HIV incidence in the United States, 2006-2009, *PLoS One* 6, e17502.
3. Arts, E. J., and Hazuda, D. J. (2012) HIV-1 antiretroviral drug therapy, *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a007161.
4. Kohl, N. E., Emini, E. A., Schleif, W. A., Davis, L. J., Heimbach, J. C., Dixon, R. A., Scolnick, E. M., and Sigal, I. S. (1988) Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4686-4690.
5. Krausslich, H. G., Ingraham, R. H., Skoog, M. T., Wimmer, E., Pallai, P. V., and Carter, C. A. (1989) Activity of purified biosynthetic proteinase of human immunodeficiency virus on natural substrates and synthetic peptides, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 807-811.
6. Wlodawer, A., and Vondrasek, J. (1998) Inhibitors of HIV-1 protease: a major success of structure-assisted drug design, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27, 249-284.
7. Wlodawer, A. (2002) Rational approach to AIDS drug design through structural biology, *Annu Rev Med* 53, 595-614.
8. Mastrolorenzo, A., Rusconi, S., Scozzafava, A., Barbaro, G., and Supuran, C. T. (2007) Inhibitors of HIV-1 protease: current state of the art 10 years after their introduction. From antiretroviral drugs to antifungal, antibacterial and antitumor agents based on aspartic protease inhibitors, *Curr Med Chem* 14, 2734-2748.
9. De Clercq, E. (2009) The history of antiretrovirals: key discoveries over the past 25 years, *Rev Med Virol* 19, 287-299.
10. Gulnik, S. V., Afonina, E., and Eissenstaat, M. (2009) HIV-1 protease inhibitors as antiretroviral agents, In *Enzyme Inhibition in Drug Discovery and Development: The Good and the Bad* (Lu, C., and Li, A. P., Eds.), John Wiley and Sons, Inc.
11. Pokorna, J., Machala, L., Rezacova, P., and Konvalinka, J. (2009) Current and Novel Inhibitors of HIV Protease, *Viruses* 1, 1209-1239.
12. Cigler, P., Kozisek, M., Rezacova, P., Brynda, J., Otwinowski, Z., Pokorna, J., Plesek, J., Gruner, B., Doleckova-Maresova, L., Masa, M., Sedlacek, J., Bodem, J., Krausslich, H. G., Kral, V., and Konvalinka, J. (2005) From nonpeptide toward noncarbon protease inhibitors: metallacarboranes as specific and potent inhibitors of HIV protease, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15394-15399.
13. Kozisek, M., Cigler, P., Lepsik, M., Fanfrlik, J., Rezacova, P., Brynda, J., Pokorna, J., Plesek, J., Gruner, B., Grantz Saskova, K., Vaclavikova, J., Kral, V., and Konvalinka, J. (2008) Inorganic polyhedral metallacarborane inhibitors of HIV protease: a new approach to overcoming antiviral resistance, *J Med Chem* 51, 4839-4843.
14. Li, F., Goila-Gaur, R., Salzwedel, K., Kilgore, N. R., Reddick, M., Matallana, C., Castillo, A., Zoumplis, D., Martin, D. E., Orenstein, J. M., Allaway, G. P., Freed, E. O., and Wild, C. T. (2003) PA-457: a potent HIV inhibitor that disrupts core condensation by targeting a late step in Gag processing, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13555-13560.
15. Hofmeister, F. (1888) On the effect of salts., *Arch Exp Pathol Pharmacol* 24, 247-260.
16. Kozisek, M., Saskova, K. G., Rezacova, P., Brynda, J., van Maarseveen, N. M., De Jong, D., Boucher, C. A., Kagan, R. M., Nijhuis, M., and Konvalinka, J. (2008) Ninety-nine is not enough: molecular characterization of inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1 protease mutants with insertions in the flap region, *J Virol* 82, 5869-5878.
17. Hazen, R., Harvey, R., Ferris, R., Craig, C., Yates, P., Griffin, P., Miller, J., Kaldor, I., Ray, J., Samano, V., Furfine, E., Spaltenstein, A., Hale, M., Tung, R., St. Clair, M., Hanlon, M., and Boone, L. (2007) In Vitro Antiviral Activity of the Novel, Tyrosyl-Based Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Protease Inhibitor Brecanavir (GW640385) in Combination with Other Antiretrovirals and against a Panel of Protease Inhibitor-Resistant HIV, *Antimicrob Agents Chemother* 51, 3147-3154.

18. Weber, J., Mesters, J. R., Lepsik, M., Prejdova, J., Svec, M., Sponarova, J., Mlcochova, P., Skalicka, K., Strisovsky, K., Uhlikova, T., Soucek, M., Machala, L., Stankova, M., Vondrasek, J., Klimkait, T., Kraeusslich, H. G., Hilgenfeld, R., and Konvalinka, J. (2002) Unusual binding mode of an HIV-1 protease inhibitor explains its potency against multi-drug-resistant virus strains, *J Mol Biol* 324, 739-754.
19. Matejicek, P., Cigler, P., Prochazka, K., and Kral, V. (2006) Molecular assembly of metallacarboranes in water: Light scattering and microscopy study, *Langmuir* 22, 575-581.
20. Matejicek, P., Zednik, J., Uselova, K., Plestil, J., Fanfrik, J., Nykanen, A., Ruokolainen, J., Hobza, P., and Prochazka, K. (2009) Stimuli-Responsive Nanoparticles Based on Interaction of Metallacarborane with Poly(ethylene oxide), *Macromolecules* 42, 4829-4837.
21. Vanmau, N. D., Issaurat, B., and Amblard, G. (1984) Adsorption of Hydrophobic Anions on Phospholipid Monolayers, *J Colloid Interf Sci* 101, 1-9.
22. Popov, A., and Borisova, T. (2001) Adsorption of dicarbollylcobaltate(III) anion $\{(\pi\text{-}(3)\text{-}1,2\text{-}B_9C_2H_{11})(2)Co(III)(-)\}$ at the water/1,2-dichloroethane interface. Influence of counterions' nature, *J Colloid Interf Sci* 236, 20-27.
23. Chevrot, G., Schurhammer, R., and Wipff, G. (2007) Synergistic effect of dicarbollide anions in liquid-liquid extraction: a molecular dynamics study at the octanol-water interface, *Phys Chem Chem Phys* 9, 1991-2003.
24. Chevrot, G., Schurhammer, R., and Wipff, G. (2007) Molecular dynamics study of dicarbollide anions in nitrobenzene solution and at its aqueous interface. Synergistic effect in the Eu(III) assisted extraction, *Phys Chem Chem Phys* 9, 5928-5938.
25. Swietach, P., Patiar, S., Supuran, C. T., Harris, A. L., and Vaughan-Jones, R. D. (2009) The Role of Carbonic Anhydrase 9 in Regulating Extracellular and Intracellular pH in Three-dimensional Tumor Cell Growths, *J Biol Chem* 284, 20299-20310.
26. Keller, P. W., Adamson, C. S., Heymann, J. B., Freed, E. O., and Steven, A. C. (2011) HIV-1 maturation inhibitor bevirimat stabilizes the immature Gag lattice, *J Virol* 85, 1420-1428.
27. Margot, N., Gibbs, C., and Miller, M. (2009) Phenotypic susceptibility to Bevirimat among HIV-infected patient isolates without prior exposure to Bevirimat., In *the 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*, Montreal, Canada.

Curriculum vitae

Ing. Jana Pokorná

Born: 9.4.1967 in Prague

Education

Since 2009 Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Biochemistry, Ph.D. study

1985-1990 Institute of Chemical Technology in Prague, Czech Republic

Courses

2013 Real-time PCR and biostatistics, TATAA Biocenter, Prague, Czech Republic

Conference presentations

- 15th International Drug Resistance Workshop, Sitges, Spain, 2006
- 34th FEBS Congress - Life's molecular Interactions, Prague, Czech Republic, 2009
- 12th International Symposium on Proteases, Inhibitors and Biological Control, Portoroz, Slovenia, 2010
- Ion Specific Hofmeister Effects: Faraday Discussions No. 160, Oxford, the United Kingdom, 2012

National and international patents:

1. Král, V., Cígler, P., Konvalinka, J., Kožíšek, M., Prejdová, J., **Pokorná, J.**, Kräusslich, H.-G., Bodem J., Grüner B., Plešek J., Lepšík M.: Novel inhibitors of HIV protease. Czech patent CZ295245.
2. Král, V., Cígler, P., Konvalinka, J., Kožíšek, M., Prejdová, J., **Pokorná, J.**, Kräusslich, H.-G., Bodem, J., Grüner, B., Plešek, J., Lepšík, M.: II. Novel inhibitors of HIV protease. Czech patent CZ303046.
3. Král, V., Cígler, P., Konvalinka, J., Kožíšek, M., Prejdová, J., **Pokorná, J.**, Kräusslich, H.-G., Bodem, J., Grüner, B., Plešek, J., Lepšík, M.: Novel HIV protease inhibitors. International patent WO2005073240.

Publications

Co-author of 11 publications in peer-reviewed international journals, one book chapter; total number of citations 276, H-index 8 (according to Web of Knowledge, April 2013)

Main research interests

- Rational design of HIV protease inhibitors based on metallacarboranes
- Ion specific effects on the catalytic activity of HIV-1 protease
- Viral resistance development in HIV positive patients treated with inhibitors of HIV protease

Seznam publikací / Selected publications:

- 1. Pokorná, J.***, Heyda, J.* and Konvalinka, J. (2013) Ion specific effects of alkali cations on the catalytic activity of HIV protease, *Faraday Disc* 160 (1), 359 – 370.
- 2. Fun, A.**, van Maarseveen, NM., **Pokorná, J.**, Maas, EM, Schipper, PJ., Konvalinka, J. and Nijhuis, M. (2011) HIV-1 protease inhibitor mutations affect the development of HIV-1 resistance to the maturation inhibitor bevirimat, *Retrovirology* 8:70.
- 3. Heyda, J.***, **Pokorná, J.***, Vrbka, L., Vácha, R., Jagoda-Cwiklik, B., Konvalinka, J., Jungwirth, P. and Vondrášek, J. (2009) Ion specific effects of sodium and potassium on the catalytic activity of HIV-1 protease, *Phys Chem Chem Phys* 11(35), 7599-604.
- 4. Rezáčová, P.**, **Pokorná, J.**, Brynda, J., Kozísek, M., Cígler, P., Lepsík, M., Fanfrlík, J., Rezáč, J., Grantz Sasková, K., Siegllová, I., Plešek, J., Sícha, V., Grüner, B., Oberwinkler, H., Sedláček, J., Kräusslich, HG, Hobza, P., Král, V., Konvalinka, J. (2009) Design of HIV protease inhibitors based on inorganic polyhedral metallacarboranes, *J Med Chem* 52(22), 7132-41.
- 5. Pokorná, J.**, Machala, L., Rezáčová, P. and Konvalinka, J. (2009) Current and Novel Inhibitors of HIV Protease, *Viruses* 1, 1209-1239.
- 6. Kozísek, M.**, Cígler, P., Lepsík, M., Fanfrlík, J., Rezáčová, P., Brynda, J., **Pokorná, J.**, Plešek, J., Grüner, B., Grantz Sasková, K., Václavíková, J., Král, V., Konvalinka, J. (2008) Inorganic polyhedral metallacarborane inhibitors of HIV protease: a new approach to overcoming antiviral resistance, *J Med Chem* 51(15), 4839-43.
- 7. Cígler, P.**, Kozísek, M., Rezáčová, P., Brynda, J., Otwinowski, Z., **Pokorná, J.**, Plešek, J., Grüner, B., Dolecková-Maresová, L., Mása, M., Sedláček, J., Bodem, J., Kräusslich, HG, Král, V., Konvalinka, J. (2005) From nonpeptide toward noncarbon protease inhibitors: metallacarboranes as specific and potent inhibitors of HIV protease, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(43), 15394-9.

Book Chapter

Rezáčová, P., Cígler, P., Matějčíček, P., Lepsík, M., **Pokorná, J.**, Grüner, B., and Konvalinka, J. (2011) Medicinal Application of Carboranes, Inhibition of HIV Protease. In *Boron Science: New Technologies and Applications*; Narayan S. Hosmane; CRC Press: Northern Illinois University, Dekalb, USA, 2011, 41-70.