

Doktorská dizertační práce – abstrakt

# **Objev, návrh a charakterizace nových nepeptidových inhibitorů HIV-1 proteázy**

**RNDr. Milan Kožíšek**

Školitel : Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.



Katedra biochemie  
Přírodovědecká fakulta  
Karlova univerzita, Praha, Česká republika



Ústav organické chemie a biochemie  
Gilead Sciences & IOCB Research Centre  
Akademie věd České republiky

**Praha 2010**

---

# Abstrakt

---

HIV-1 proteáza je aspártátová proteáza, jejíž aktivita je nezbytná v životním cyklu viru HIV. Je odpovědná za štěpení virových polyproteinů na strukturní proteiny a enzymy během zrání viru. Inhibice tohoto enzymu vede k tvorbě nezralých a tedy neinfekčních virových částic. Uvedení proteázových inhibitorů na trh dramaticky změnilo úspěch léčby retroviróvé infekce. Množství viru v krevní plazmě pokleslo pod zjištěnou úroveň a vývoj nemoci se výrazně zpomalil. Nicméně se začala vyvíjet rezistence k inhibitorům. První proteázové inhibitory vykazovaly nízkou biodostupnost, měly řadu nežádoucích účinků a snadno k nim byla vyvíjena rezistence. Aby se předešlo těmto nežádoucím jevům, byly a jsou stále vyvíjeny inhibitory druhé generace. Pochopení mechanismu, kterým rezistence vůči určitému inhibitoru vzniká, je velmi důležité při vývoji nových antiretrovirotik i při klinické léčbě. Kvůli vznikající rezistenci je stále nutné nalézat nové nepeptidové inhibitory s jedinečným rezistentním profilem, jiným způsobem účinku a ojedinělým chemickým složením.

Tato doktorská práce přináší pohled do vývoje rozdílných tříd neobvyklých proteázových inhibitorů. Objasňuje vývoj rezistence vůči proteázovému inhibitoru nelfinaviru. Hlavní část práce je však zaměřena na vývoj a charakterizaci metalokarboranů, nových nepeptidových inhibitorů HIV-1 proteázy, které představují slibné farmakofory s léčebným potenciálem.

---

## Cíle dizertační práce

---

Prvním cílem této práce bylo připravit a enzymologicky, strukturálně a termodynamicky charakterizovat rekombinantní HIV-1 proteázy s mutacemi odpovědnými za rezistenci vůči inhibitoru nelfinaviru. Hlavním smyslem bylo pochopit, jak jednotlivé mutace přispívají k vazbě nelfinaviru do enzymu a jak dodatečné mutace ovlivňují jejich efekt. Pochopení vlivu jednotlivých mutací na vazbu nelfinaviru je důležitou informací pro vývoj nových a lepších inhibitorů HIV-1 proteázy.

Během náhodného testování různých anorganických a organických sloučenin jsme zjistili, že metalokarborany jsou slibnými inhibitory HIV-1 proteázy. Druhým cílem práce bylo tuto skupinu látek enzymologicky charakterizovat, zjistit jejich inhibiční schopnost vůči proteáze, u vybraných metalokarboranů určit jejich specifitu a zda jsou schopny inhibovat i multirezistentní HIV-1 proteázy.

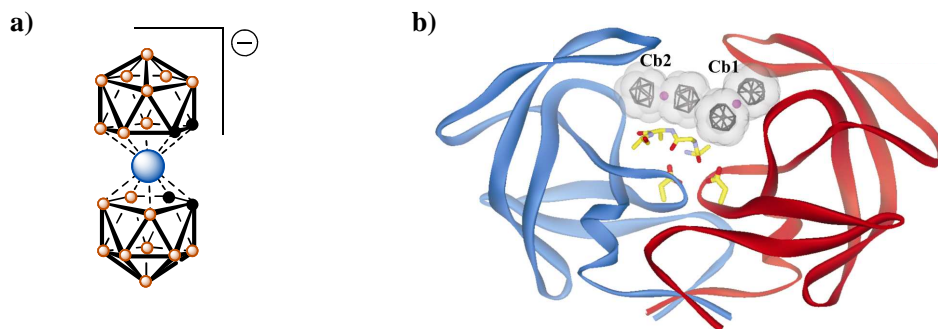
---

## Výsledky práce

---

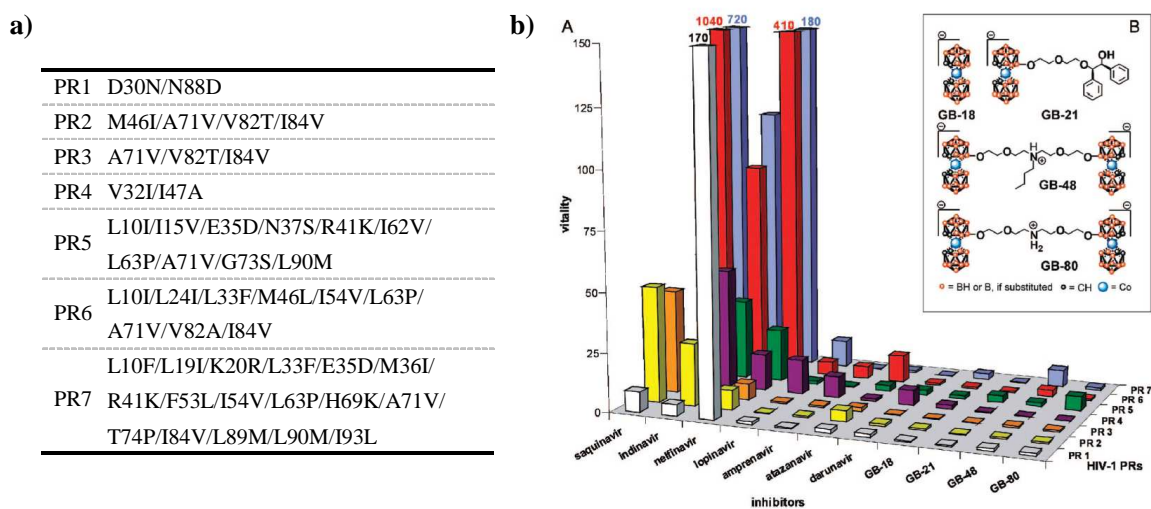
V této práci jsem objasnil mechanismus vzniku rezistence vůči nelfinaviru, proteázovému inhibitoru první generace. Díky spolupráci s laboratoří Dr.Mammanna v rámci pátého rámcového programu Evropské unie jsem připravil řadu HIV-1 proteáz obsahujících mutace snižující sílu vazby nelfinaviru do proteázy a tedy zvyšující rezistenci enzymu k tomuto inhibitoru. Typickou mutací způsobující rezistenci k nelfinaviru je mutace D30N. Dříve se věřilo, že proteáza nesoucí tuto mutaci ztrácí důležitou vodíkovou vazbu k hydroxylové skupině nelfinaviru. Strukturní a termodynamickou analýzou jsme zjistili, že tato vazba je zachována, ale oslabena. Kinetická analýza ukázala, že největší vliv na rezistenci vůči nelfinaviru z testovaných proteáz má proteáza s mutacemi D30N a N88D, kombinací často se vyskytující u pacientů léčených nelfinavirem a u kterých terapie tímto inhibítorem selhala. Hlavní rozdíl ve vazbě byl zjištěn a vysvětlen odlišným vazebným módem řízeným molekulami vody. Termodynamická analýza odhalila nepříznivý vliv těchto mutací na entalpický i entropický příspěvek vazby. Všechny tyto analýzy byly provedeny i pro ostatní mutantní proteázy. Metoda molekulového modelování pomohla vysvětlit všechna zjištěná data a ukázala, že entropie vazby hraje podstatnou roli při vzniku rezistence k nelfinaviru.

Před sedmi lety jsme během náhodného testování stovek anorganických a organických sloučenin objevili metalokarborany jako slibné inhibitory HIV-1 proteázy. Nejprve jsme s užitím enzymové eseje metalokarborany charakterizovali a získali parametry jejich inhibičních schopností. Nalezli jsme určitý vztah mezi inhibiční aktivitou a strukturními rysy inhibitoru. Některé metalokarborany byly určeny jako nanomolární nepeptidové inhibitory HIV-1 proteázy. Doktorka Pavlína Řezáčová určila strukturu komplexu HIV-1 proteázy se základním metalokarboranem GB-18 a tím i jeho vazebný mód. Tato struktura byla vůbec první zjištěnou strukturou komplexu protein-karboran, která kdy byla vyřešena.



**Obrázek č.1** (a) Chemický vzorec základního metalokarboranu GB-18. BH skupiny jsou znázorněny oranžovými kuličkami, CH skupiny černými kuličkami a ion kobaltu reprezentuje modrá středová koule. (b) Struktura komplexu HIV-1 proteázy s dvěma molekulami metalokarboranu GB-18, získána rentgenostrukturní analýzou v laboratoři Dr. Řezáčové na ÚOCHB AV ČR.

Dále jsme zjistili, že metalokarborany inhibují slaběji i HIV-2 proteázu a proteázu z myšího endogenního retroviru MIA14. Velmi slabě též inhibují další aspartátové proteázy pepsin a katepsin D. U ostatních typů proteáz inhibiční schopnost nebyla prokázána. Během vývoje inhibitorů druhé generace je nezbytné, aby měly schopnost inhibovat multirezistentní proteázy vyvinuté při léčbě předešlými inhibitory. Ukázalo se, že metalokarborany jsou inhibitory HIV-1 proteázy s jedinečným rezistentním profilem. Dokázaly efektivně inhibovat proteázy odvozené od pacientů, u kterých léčba řadou inhibitorů selhala. Po mnoha neúspěšných pokusech se podařilo Dr.Řezáčové objasnit také strukturu komplexu proteázy s nanomolárním metalokarboranem GB-80.



**Obrázek č.2** (a) Seznam použitých HIV-1 proteáz pro testování rezistenčních profilů vybraných metalokarboranů. (b) Graf vitalit (měr *in vitro* rezistence) pro sedm klinicky užívaných inhibitorů a čtyři metalokarborany a sedm rezistentních proteáz. Chemické vzorce těchto čtyř metalokarboranů jsou uvedeny vedle grafu.