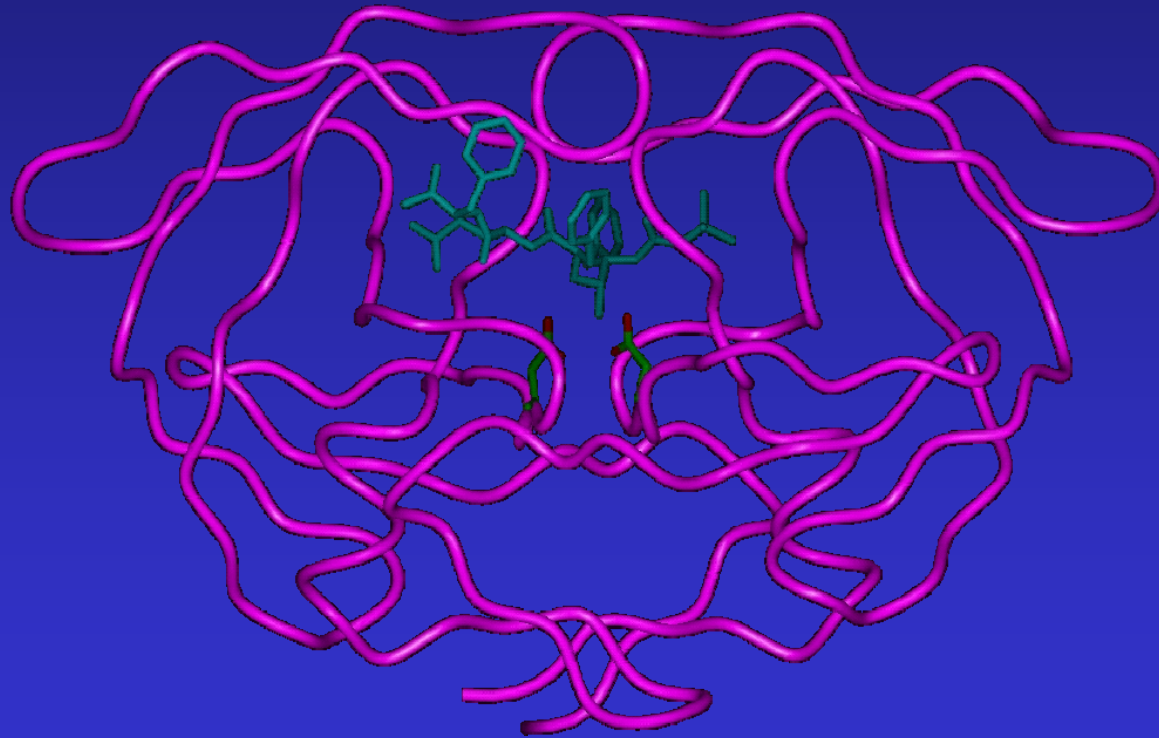


# Inhibitory proteasy a virová resistance: od sekvence ke struktuře a zase zpátky



# Osnova:

-úvod

-veselý obrázek

-smutná čísla

-dobré zprávy

-špatné zprávy

-K čemu je dobrá Učená společnost?

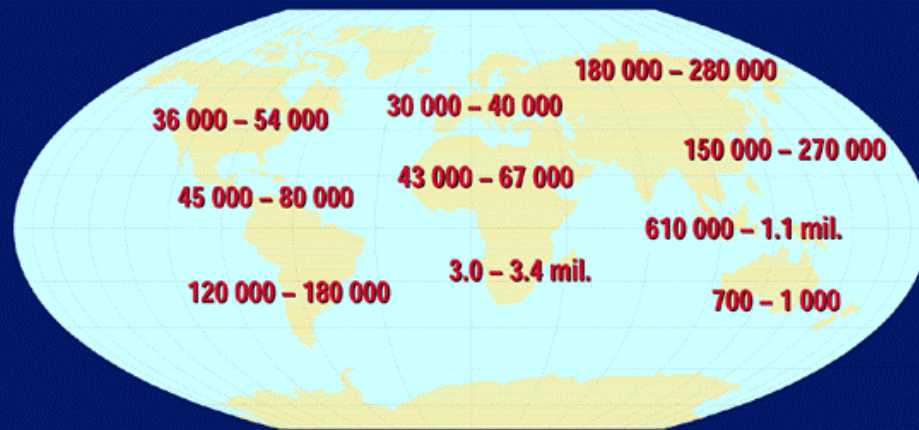
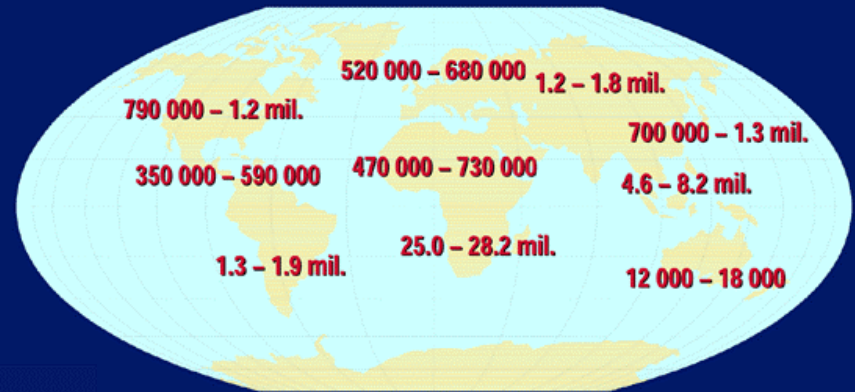
-závěr





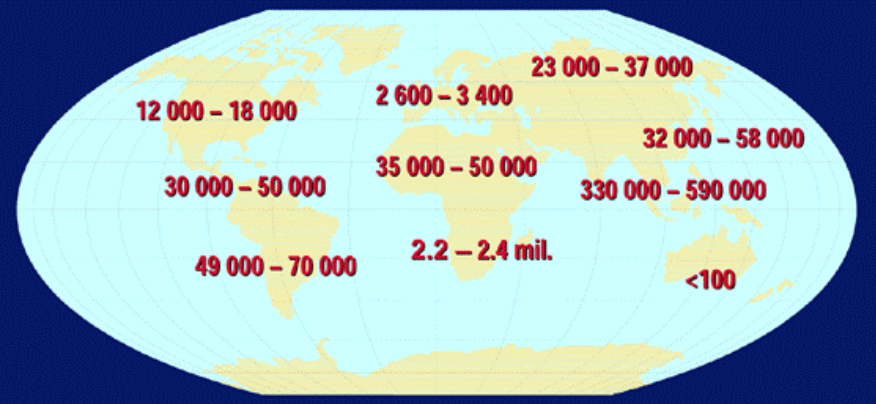
# HIV ve světě (rok 2003)

**Osoby žijící s HIV/AIDS  
celkem 34 - 46 mil.**



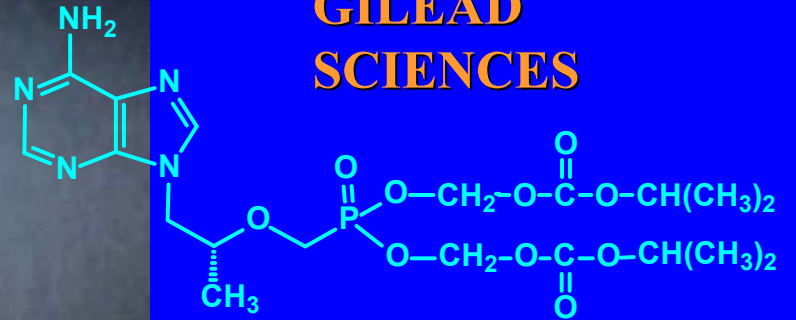
**Osoby nově infikované  
celkem 4,2 - 5,8 mil.**

**Úmrtí spojené s HIV/AIDS  
celkem 3,5 - 4,5 mil.**



# Učená společnost ČR a světová retrovirologie

- Jan Svoboda
- Jan Závada
- Antonín Holý



**GILEAD  
SCIENCES**



**(R)-PMPA**

**TENOFOVIR**

**2001**

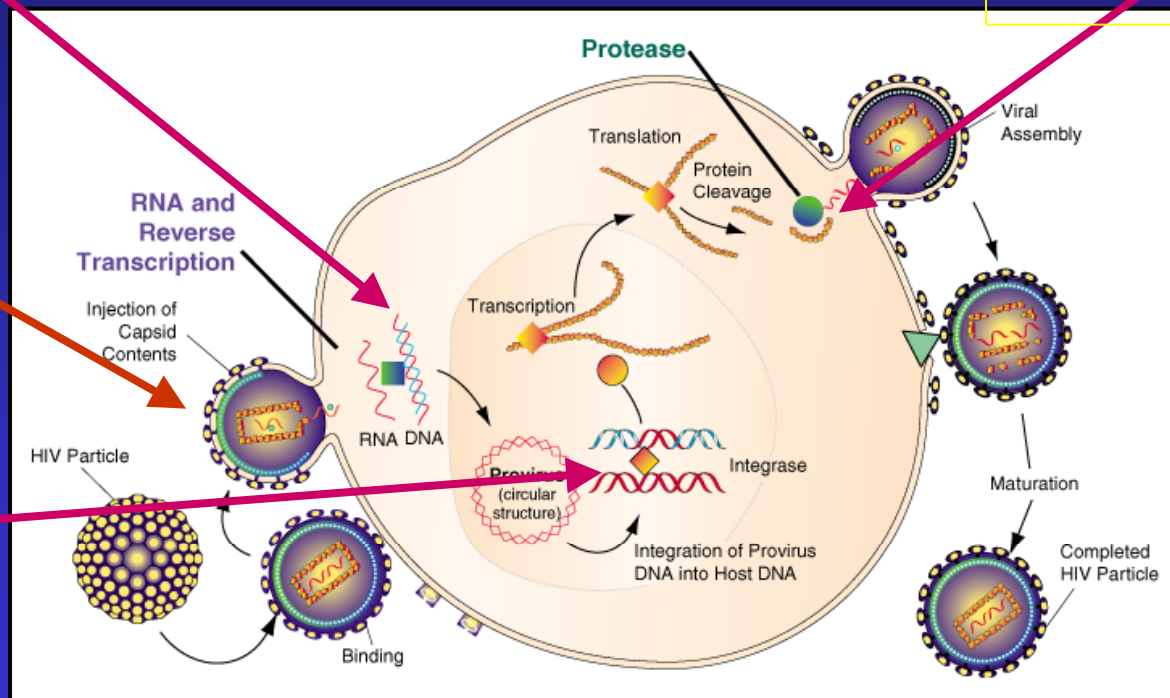
# Životní cyklus retroviru a místa farmakologického zásahu

Inhibitory RT  
(11 léků)

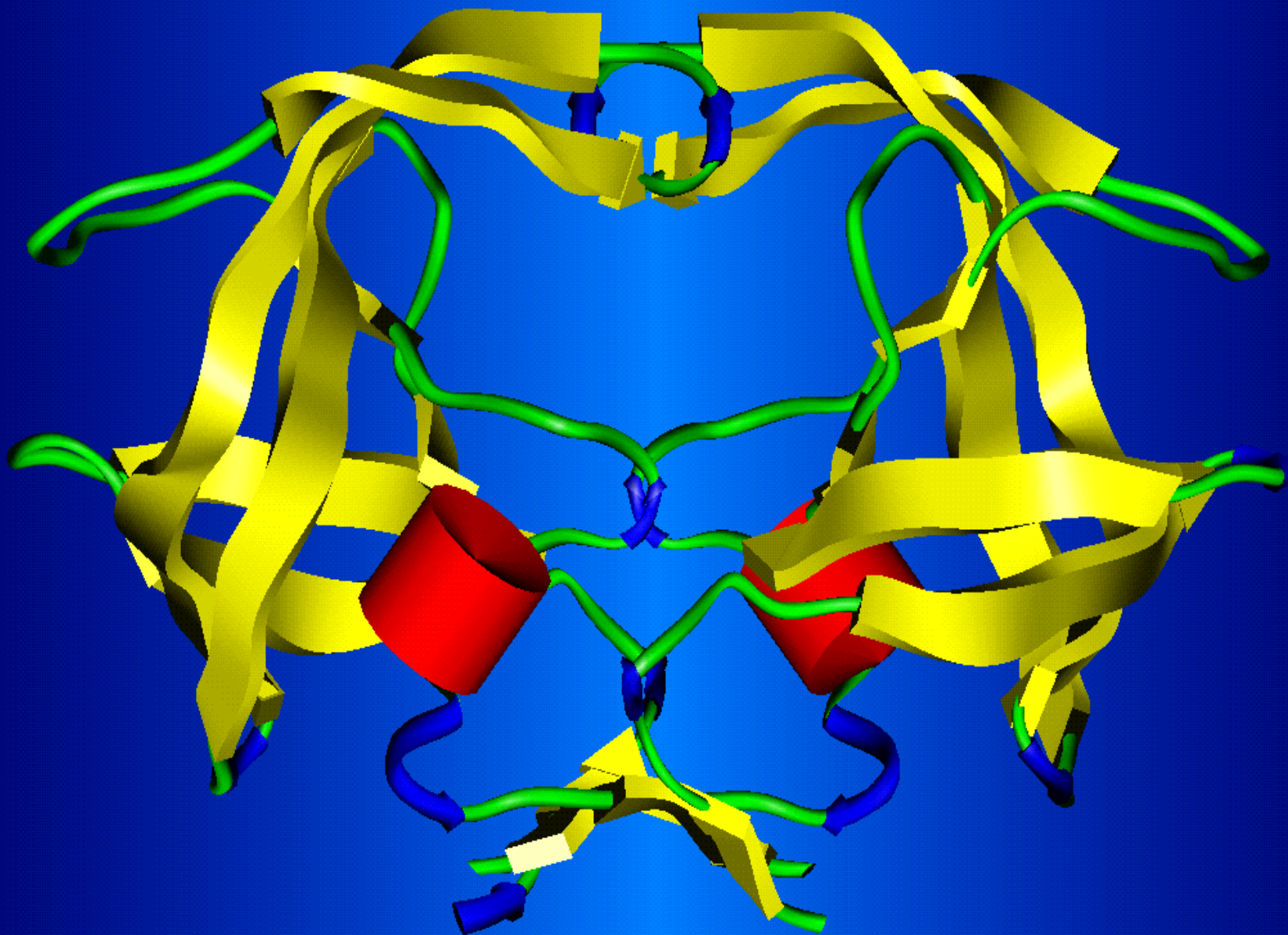
Inhibitory vstupu  
(1 lék)

Inhibitory IN  
(zatím 0)

Inhibitory proteasy  
(8 léků)



Adaptováno podle knihy *HIV/AIDS Handbook*. 3rd ed. Boston: Total Learning Concepts, 1997:77.

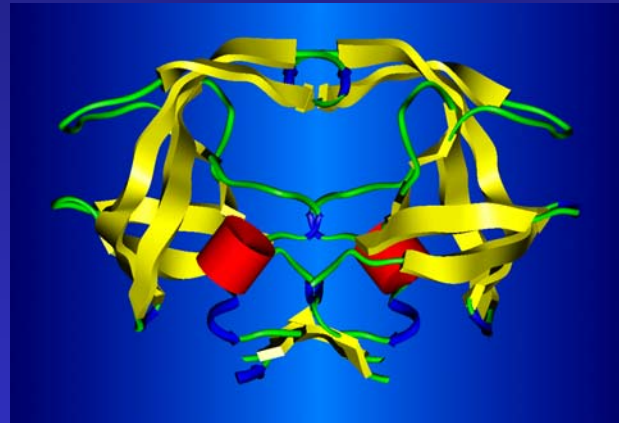
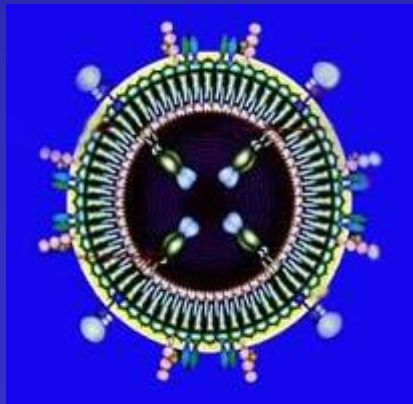




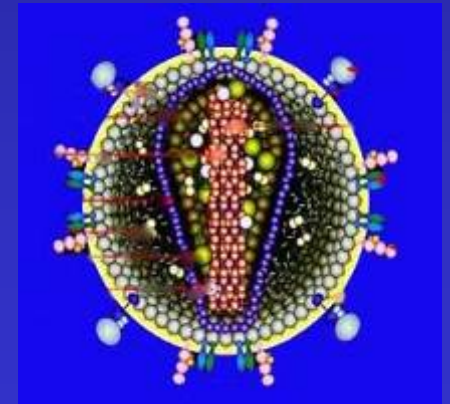
# Aktivace proteasy vede ke zrání viru

PROTEASA

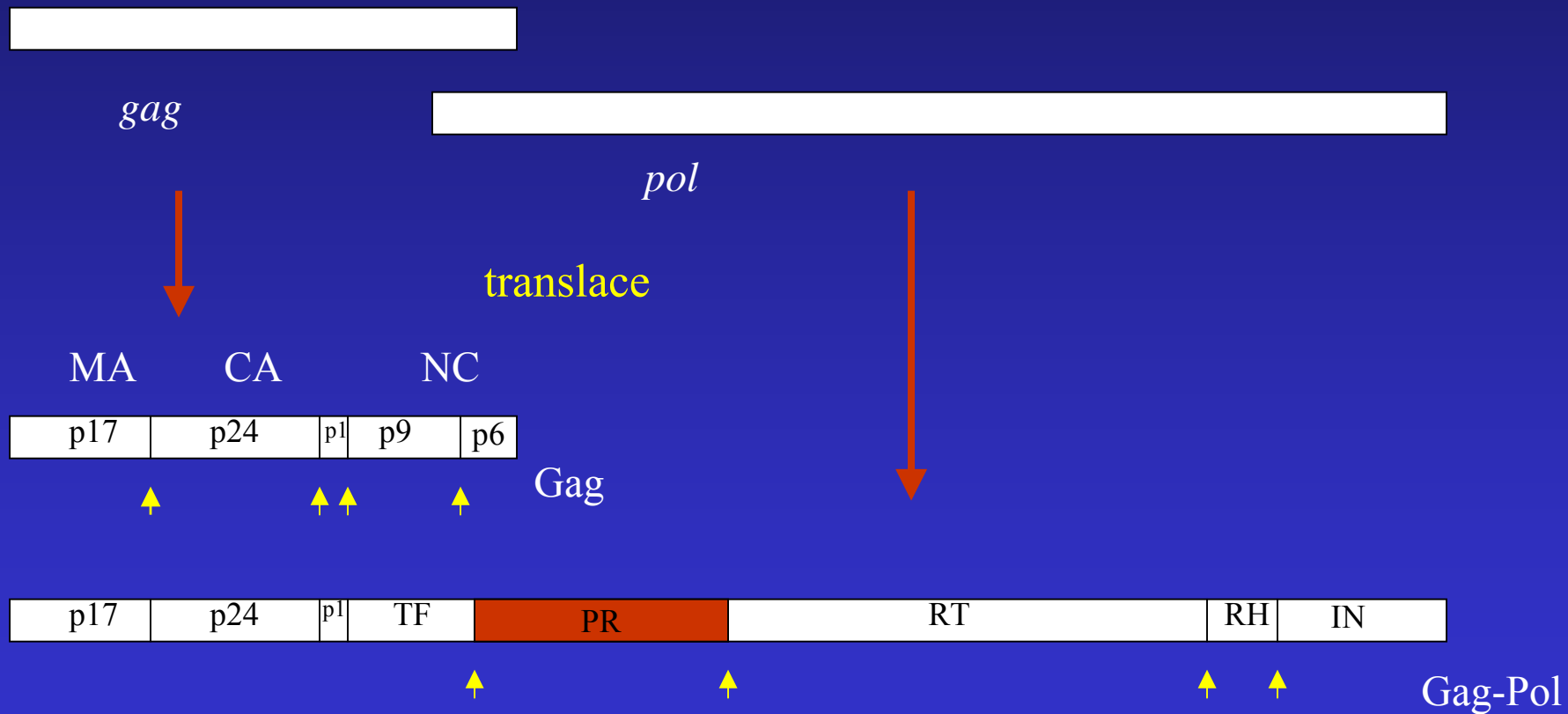
NEZRALÁ  
ČÁSTICE



ZRALÁ  
ČÁSTICE



# HIV proteasa: molekulární nůžky štěpící virové proteiny na míru



# Jak proteasa pozná, kde má štěpit?

MA-CA

...SQNY\*PIVQ...

CA-p1

...ARVL\*AEAM

p1-NC

...ATIM\*MQRG

NC

...PGNF\*LQSR...

TF-PR

...SFNF\*PQIT...

PR-RT

...TLNF\*PISP...

RT-RH

...AETF\*YVDG

RH-IN

...RKIL\*FLDG...

Substrátová specifita proteasy: klíč k návrhu inhibitorů

# Racionální návrh inhibitorů HIV proteasey

- Na základě známé substrátové specifity odvozen „minimální“ substrát
- Připraven jeho „isoster“, látka s podobnou prostorovou strukturou, ale pozměněná tak, že není substrátem enzymu
- Připraveny a testovány stovky variant isosteru, dokud není získána látka požadovaných vlastností (dostupnost přes membrány, nízká molekulová hmotnost, vhodná rozpustnost, biologická stabilita)
- Testy na tkáňových modelech, na zvířatech, 3 fáze klinického testování => cca 500 mil. \$

# Inhibitory HIV protease



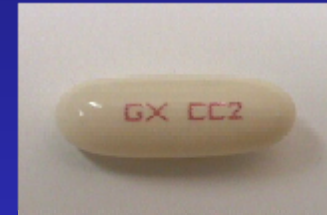
□ saquinavir



□ ritonavir



□ indinavir



□ nelfinavir

□ amprenavir

□ fosamprenavir



□ lopinavir



□ atazanavir

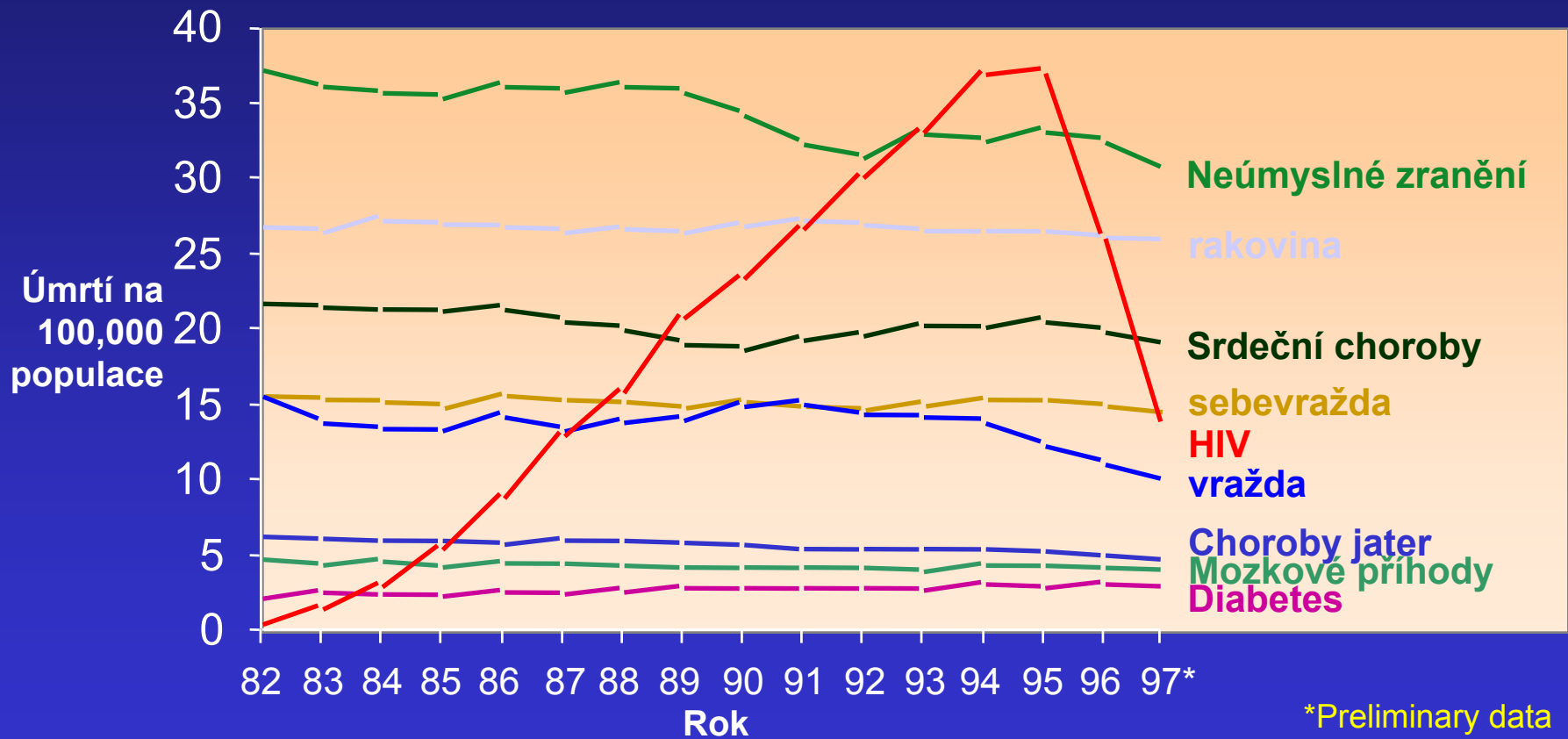
# Medicinální použití inhibitorů HIV PR.

## Dobré zprávy:

- HIV PR je jedním z nejprozkoumanějších enzymů na světě
- detailní strukturní informace umožňuje racionální návrh inhibitorů
- inhibitory mají zřetelný terapeutický efekt

# HIV a příčiny smrti u dospělých v USA

Trendy v úmrtnosti podle příčin smrti u dospělých osob v USA (25-44 let)



From National Vital Statistics, Centers for Disease Control and Prevention.

# Medicinální použití inhibitorů HIV PR.

## Špatné zprávy:

- Většina inhibitorů proteasy jsou pseudopeptidy (špatná biodostupnost a stabilita ve tkáních)
- “Racionální návrh inhibitorů “ zatím moc racionální není (většina používaných léků byla objevena náhodným testováním)
- použití inhibitorů proteasy komplikováno vedlejšími účinky, vysokou cenou a **vývojem resistance**



# Denní dávky běžně užívaných proteasových inhibitorů

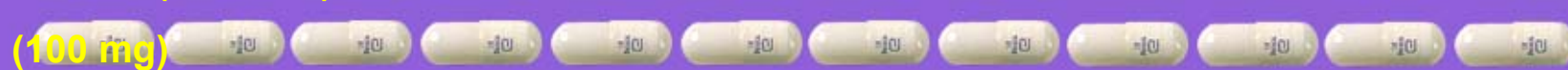
**CRIXIVAN<sup>®</sup>** (indinavir sulfate)



**Viracept<sup>®</sup>** (nelfinavir mesylate) (250 mg)



**Norvir<sup>®</sup>** (ritonavir)



**Agenerase<sup>™</sup>** (amprenavir) (150mg)



**Fortovase<sup>®</sup>** (saquinavir) (200 mg)

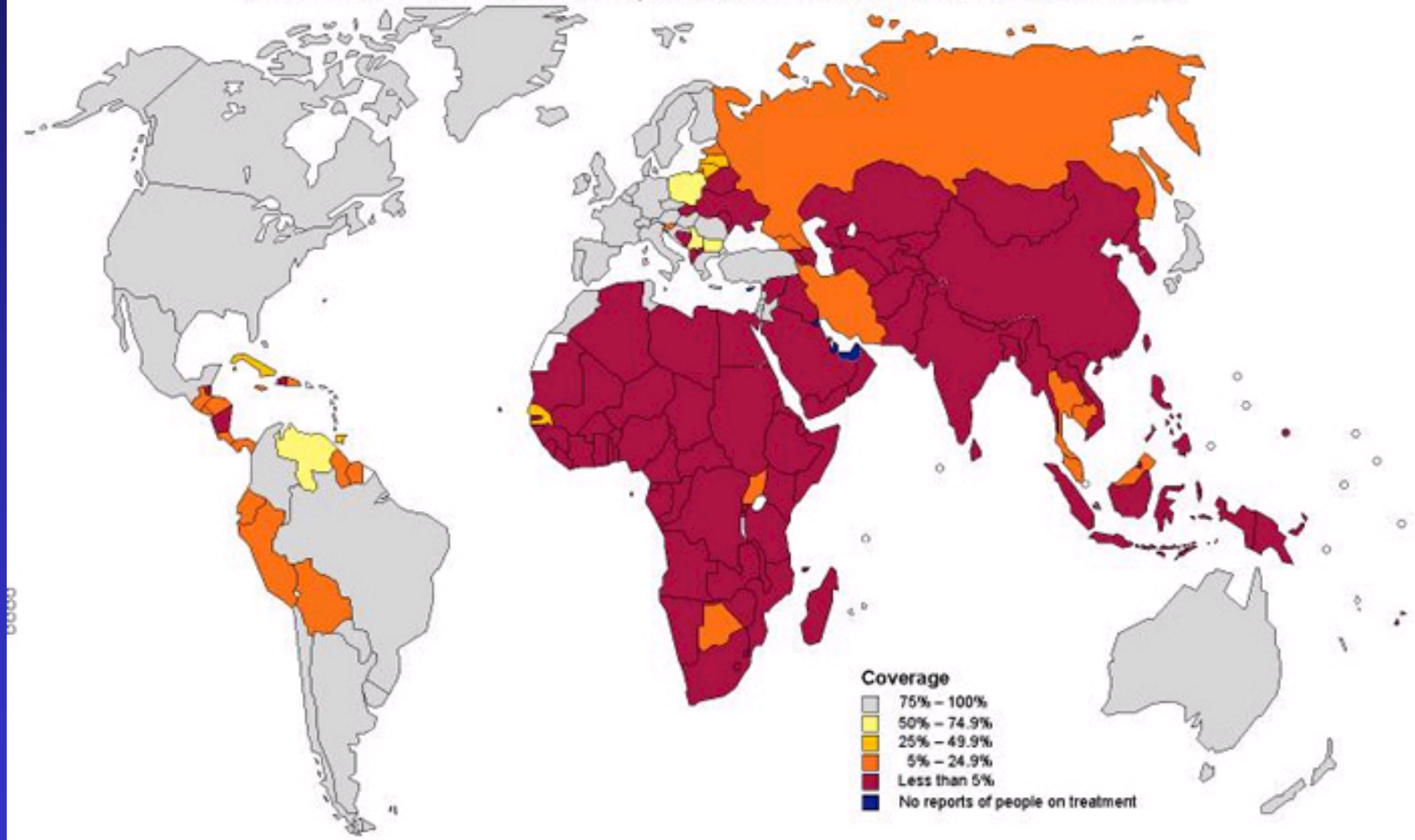


# Cena léčby proteasovými inhibitory (USA)

30-denní dávka		Roční dávka
<b>\$370.80</b>	<b>CRIXIVAN®</b> (indinavir sulfate)	<b>\$4,511.40</b>
<b>\$486.00</b>	<b>Viracept®</b> (nelfinavil mesylate)	<b>\$5,913.00</b>
<b>\$519.27</b>	<b>Fortovase®</b> (saquinavir)	<b>\$6,317.78</b>
<b>\$504.00</b>	<b>Agenerase™</b> (amprenavir)	<b>\$6,317.78</b>
<b>\$534.24</b>	<b>Norvir®</b> (ritonavir)	<b>\$6,499.92</b>



## Estimated percentage of people covered among those in need of antiretroviral treatment, situation as of November 2003



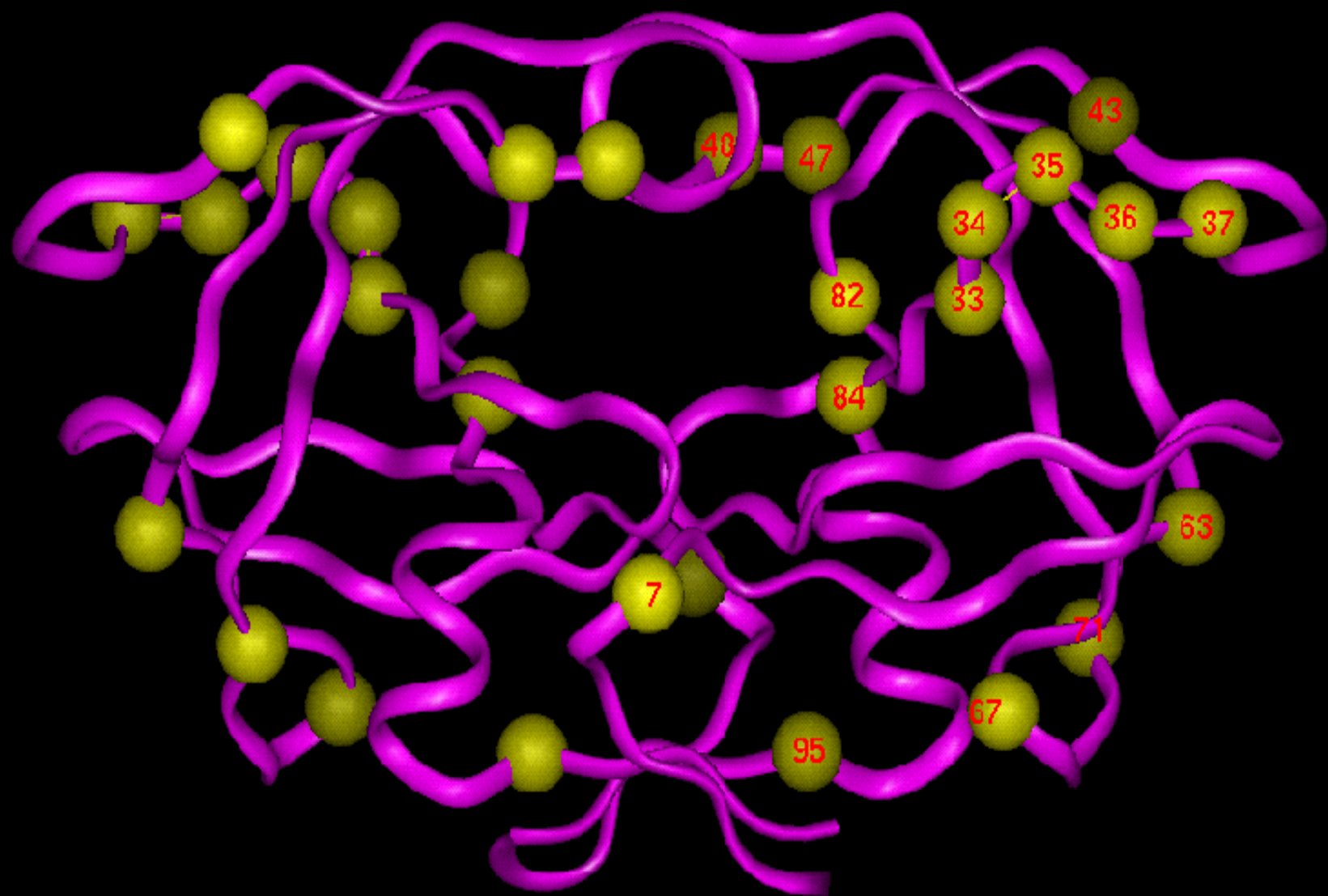
# Běžná denní dávka léčiv HIV pozitivního pacienta



# Vývoj resistance vůči proteasovým inhibitorům

## další špatné zprávy:

- virus rychle replikuje a díky reversní transkriptase mutuje
- v HIV pozitivním pacientovi jsou miliony různých virových species
- dochází k darwinistické selekci mutantů pod selekčním tlakem inhibitorů
- **vyvíjí se resistance vůči virostatikům**



Distribution of HIV-1 PR mutations

# HIV v České republice

A detailed map of Europe with the Czech Republic highlighted in a bright red color. The map shows major cities, countries, and geographical features across the continent.

• 662 HIV pozitivních k 31.12.2003

• 163 pacientům diagnostikován AIDS

• 102 zemřelo (z toho 3 v r. 2003)

• 250 pacientů registrováno v AIDS centru  
ve FN Bulovka v Praze

• 125 pacientů léčených inhibitory PR ve  
studii

# Epidemiologie HIV/AIDS v ČR

- V ČR je cca 64 případů HIV/AIDS na milion obyvatel
- v r. 1963 bylo registrováno 61 nových případů HIV/AIDS
- Hlavním způsobem přenosu infekce HIV v ČR je sexuální kontakt (přes 82% všech hlášených případů, 52% homosexuálních)
- 20% všech infikovaných jsou ženy; HIV infikovaným ženám se narodilo 46 dětí, u 4 z nich došlo k přenosu HIV
- Od r.1987 nebyl zaznamenán žádný případ přenosu HIV po krevní transfuzi či po podání krevního přípravku
- Roste počet HIV infikovaných cizinců, hlavně z východní Evropy



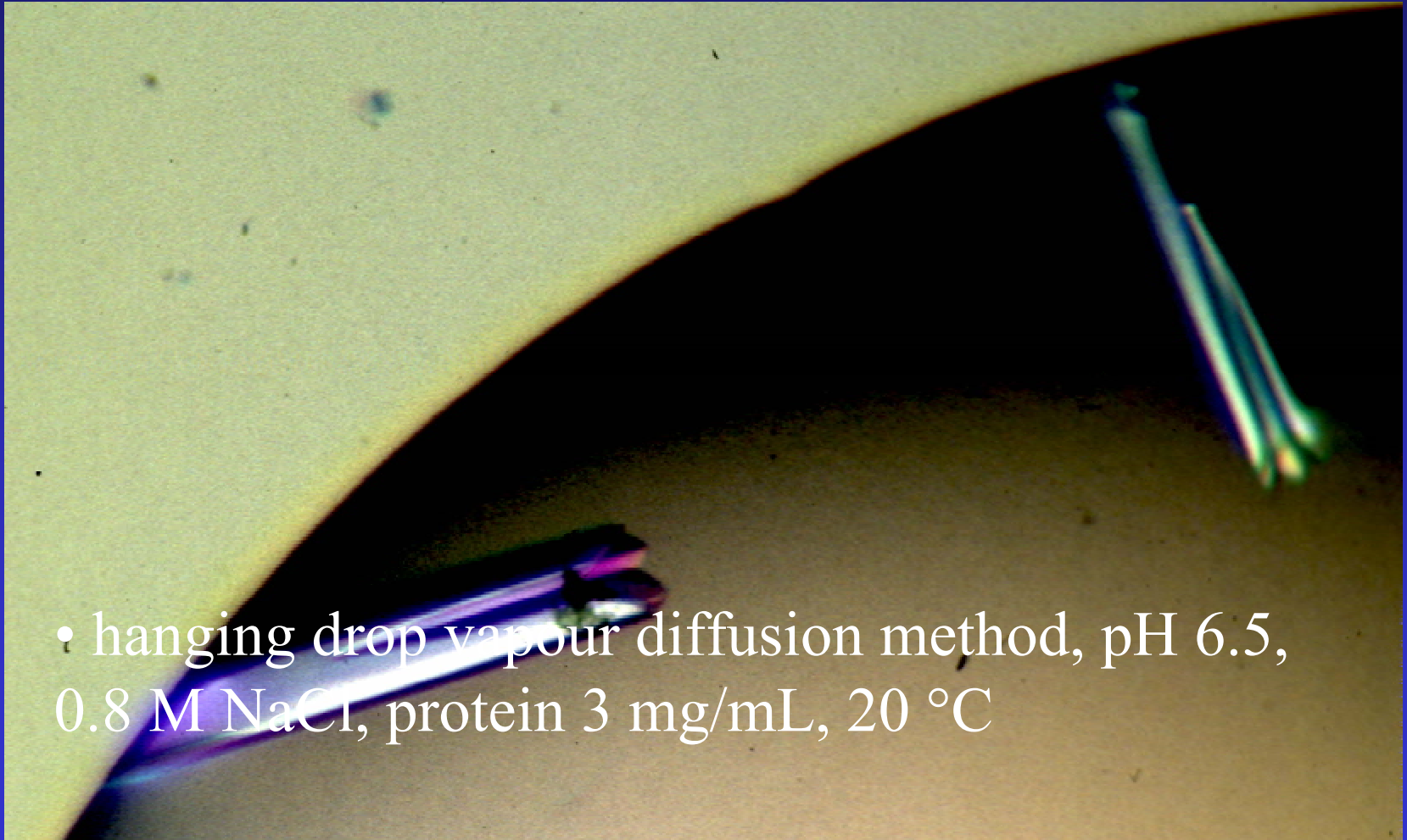
# Antivirová resistance: jak ji poznat a jak ji překonat

- Sekvenování genu pro HIV PR z krve pacientů
- výběr “zajímavých” mutací pro další analýsu
- příprava rekombinantních proteinů v bakteriích a jejich charakterisace
- hledání a nalezení nových inhibitorů
- sláva, závist kolegů a obdiv kolegyň

## **Cíl studia resistance: návrh sloučeniny, schopné blokovat i resistantní mutanty HIV PR**

- Semi-rationální návrh na základě rentgenových struktur
- Testování tisíců sloučenin v kombinatoriálních knihovnách s použitím řady typických resistantních PR
- Sloučenina silně inhibující baterii „representativních“ mutantů strukturně a biologicky charakterisována

# Krystaly HIV PR s navázaným inhibítorem



- hanging drop vapour diffusion method, pH 6.5, 0.8 M NaCl, protein 3 mg/mL, 20 °C

# Cílem zásahu je aktivní místo HIV PR

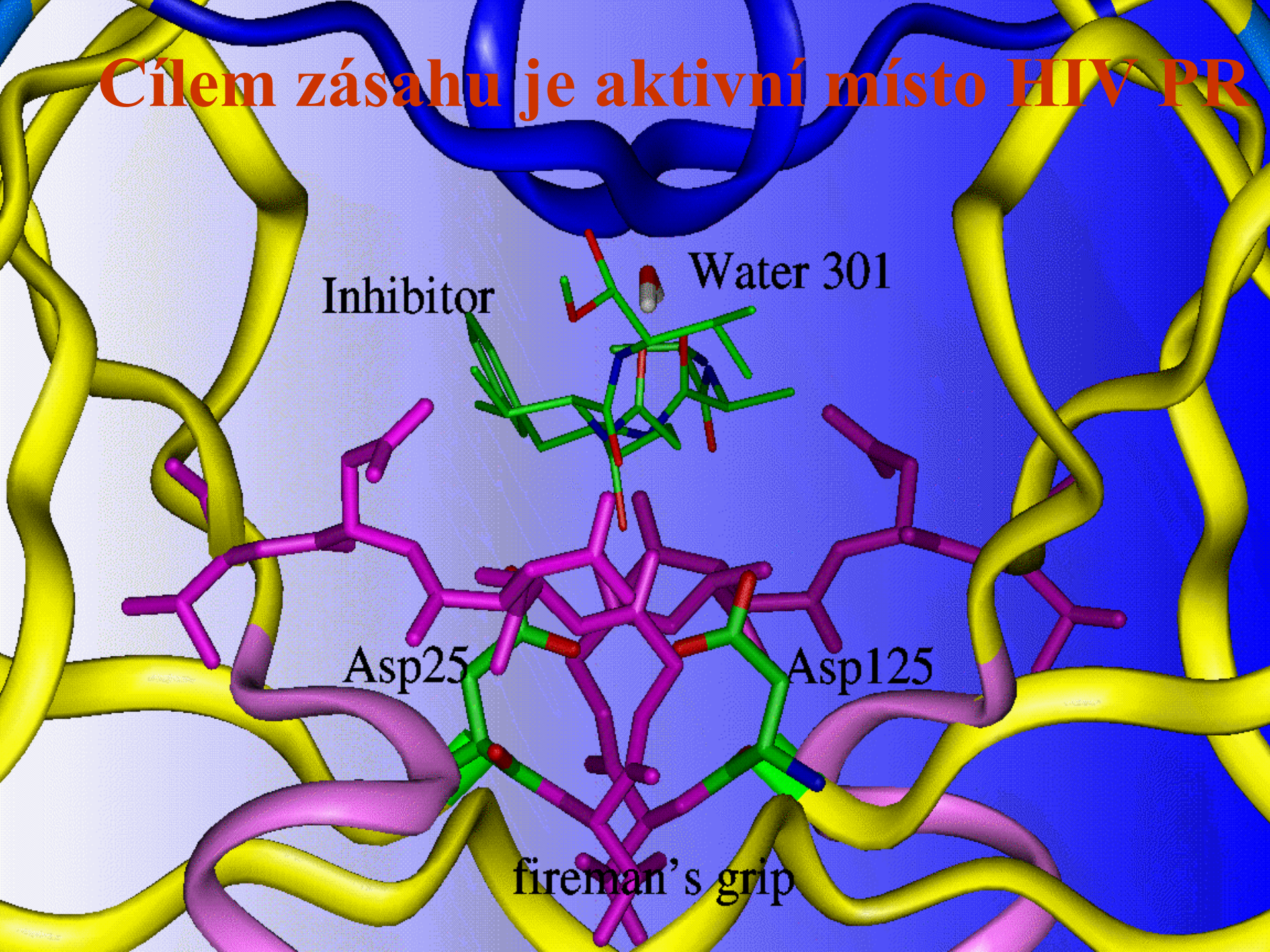
Inhibitor

Water 301

Asp25

Asp125

fireman's grip

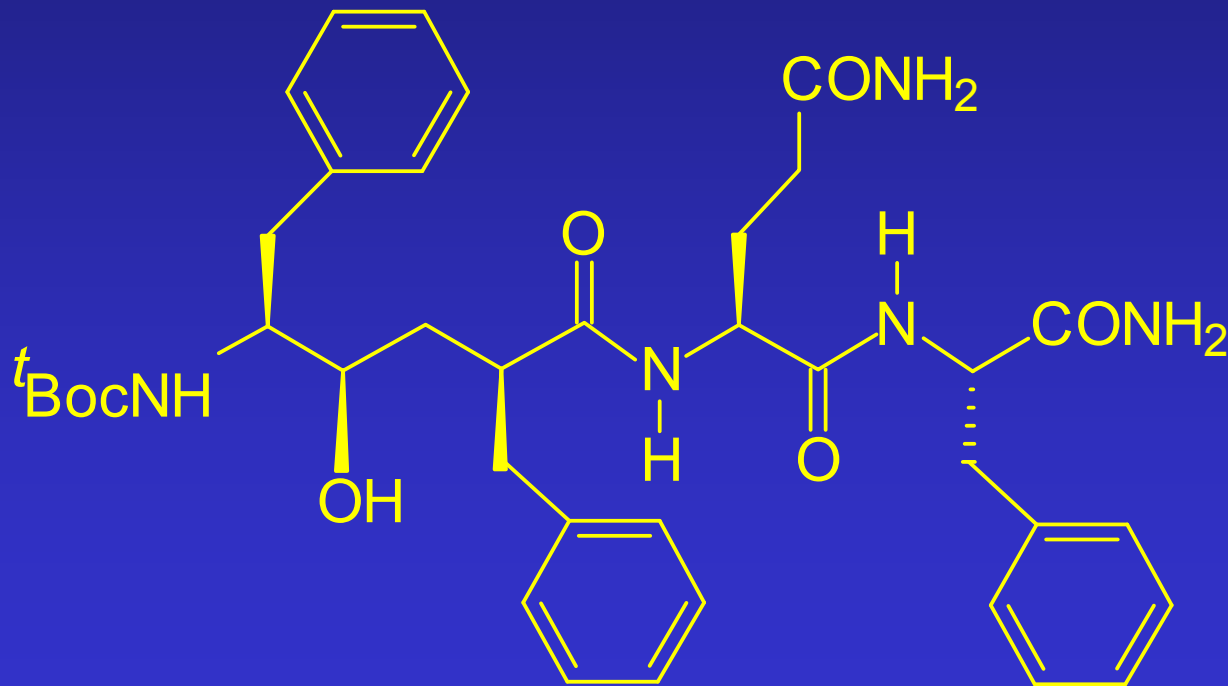


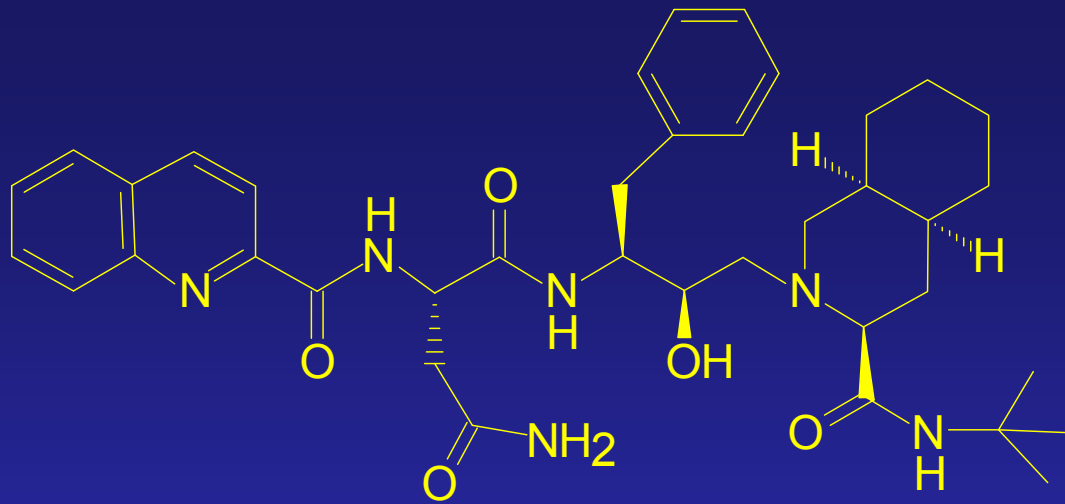
Ještě jedna dobrá zpráva:

posledních 10 minut!!!

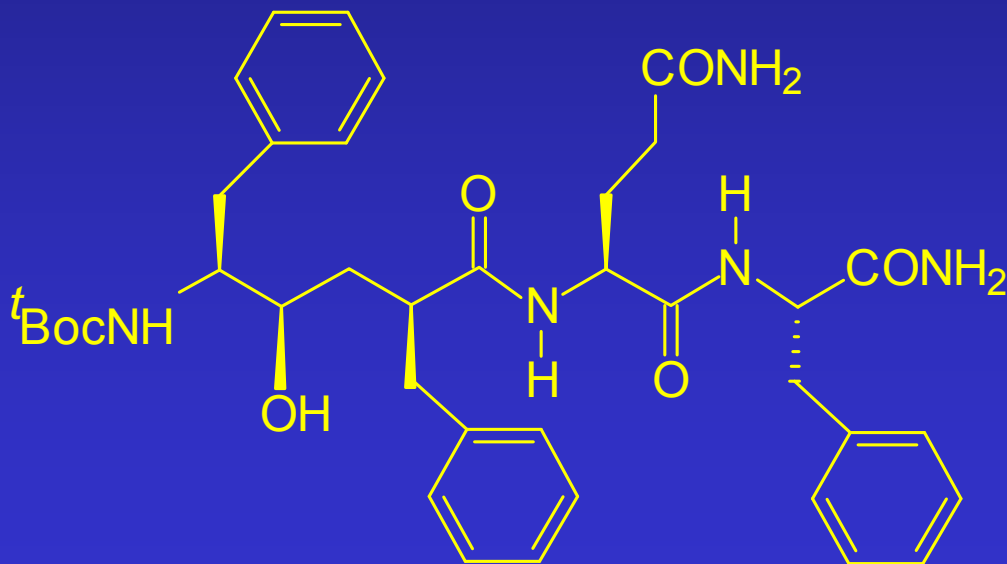
# Inhibitor QF34

navržen na UOCHB AV ČR, velmi účinný inhibitor  
všech dosud nalezených mutantních proteas



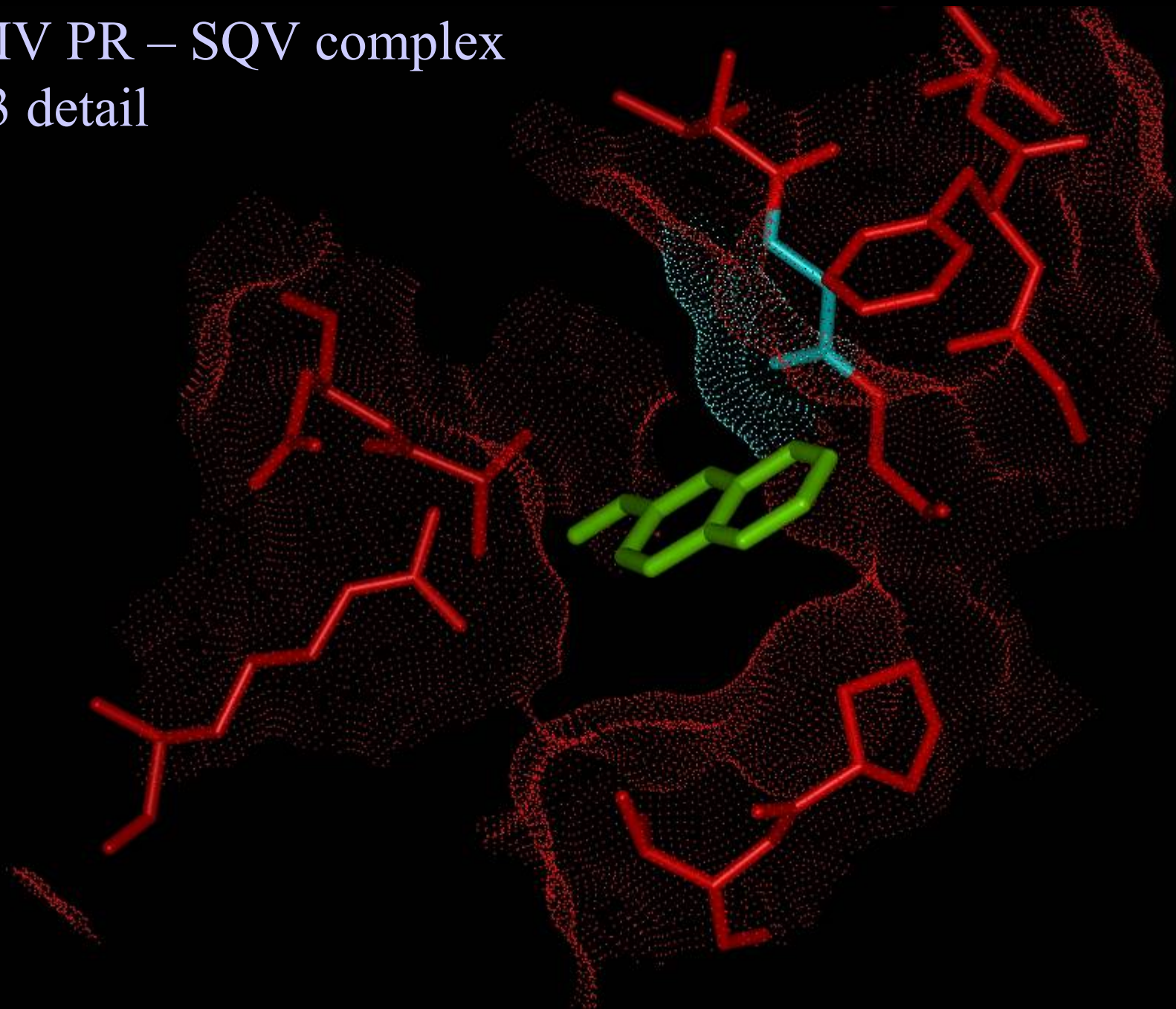


SAQUINAVIR



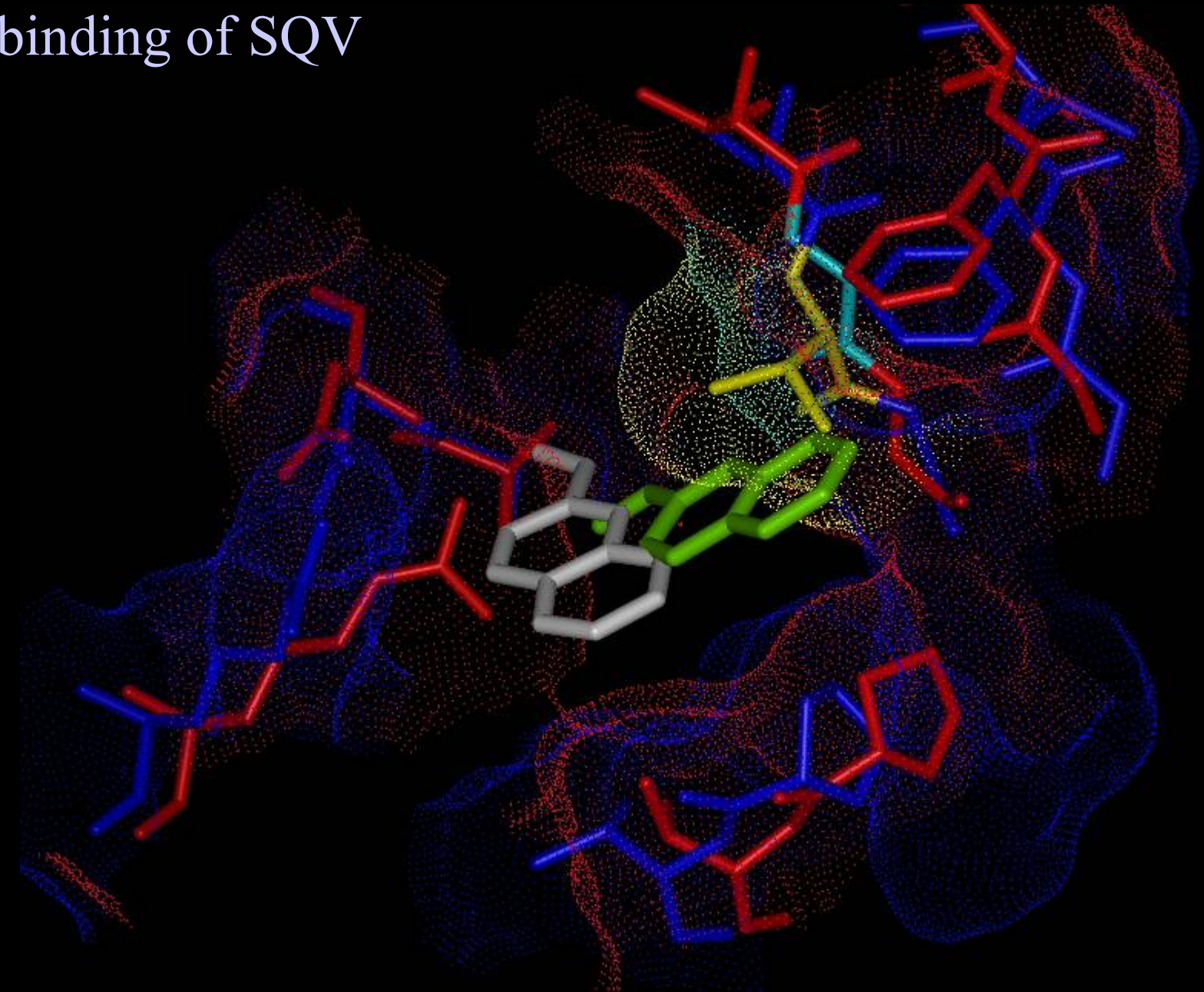
QF 34

HIV PR – SQV complex  
S3 detail

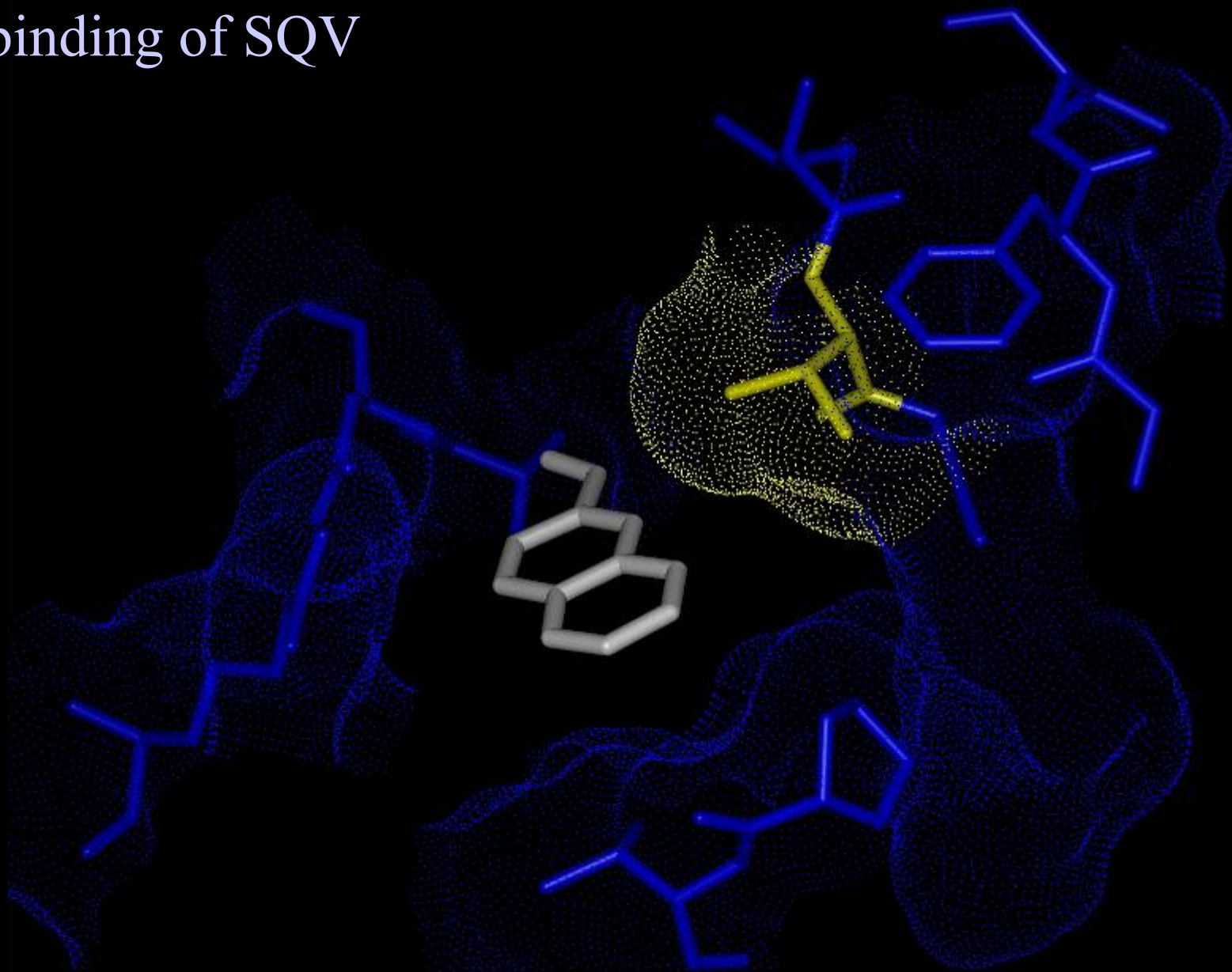




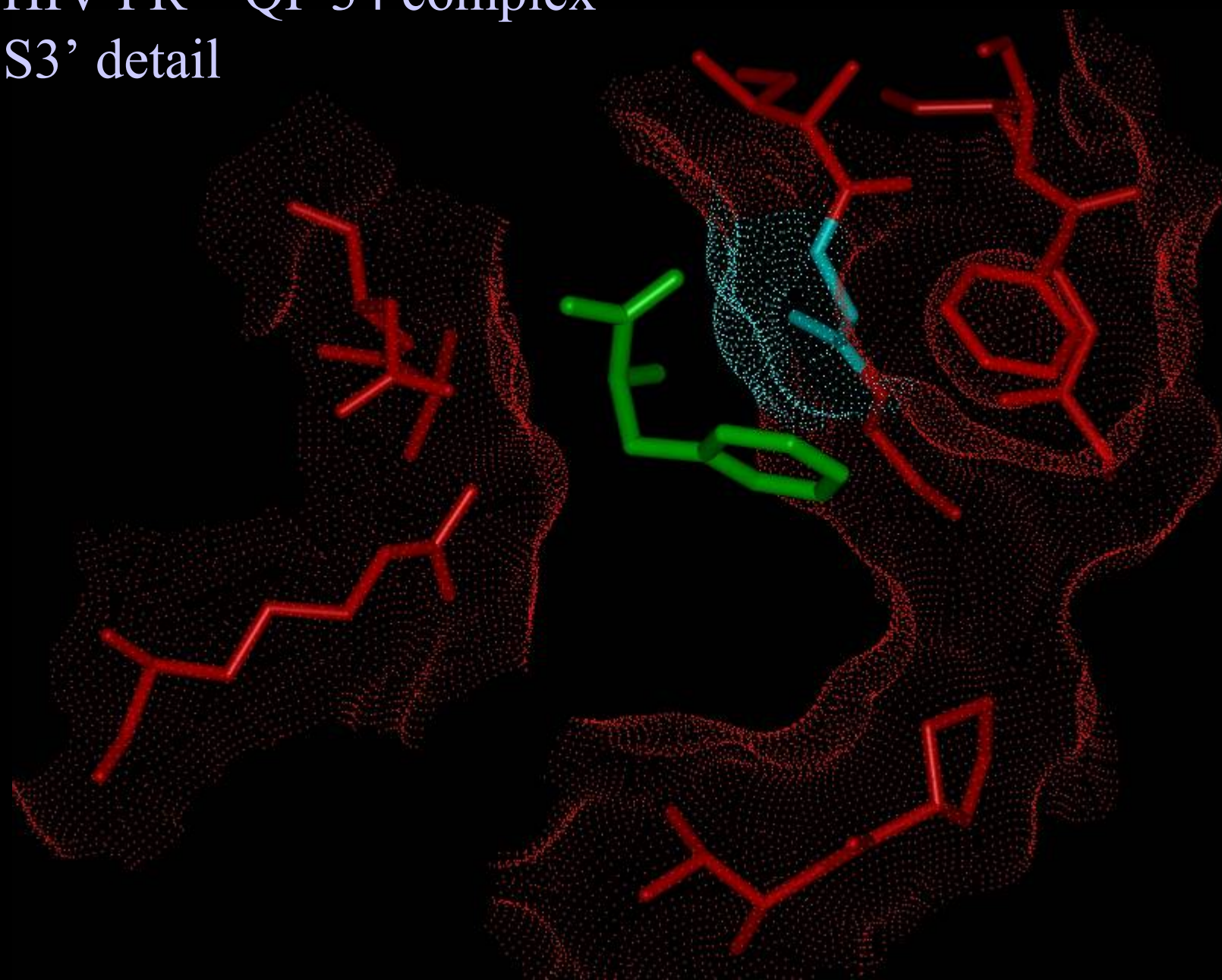
# Effect of G48V mutation on binding of SQV



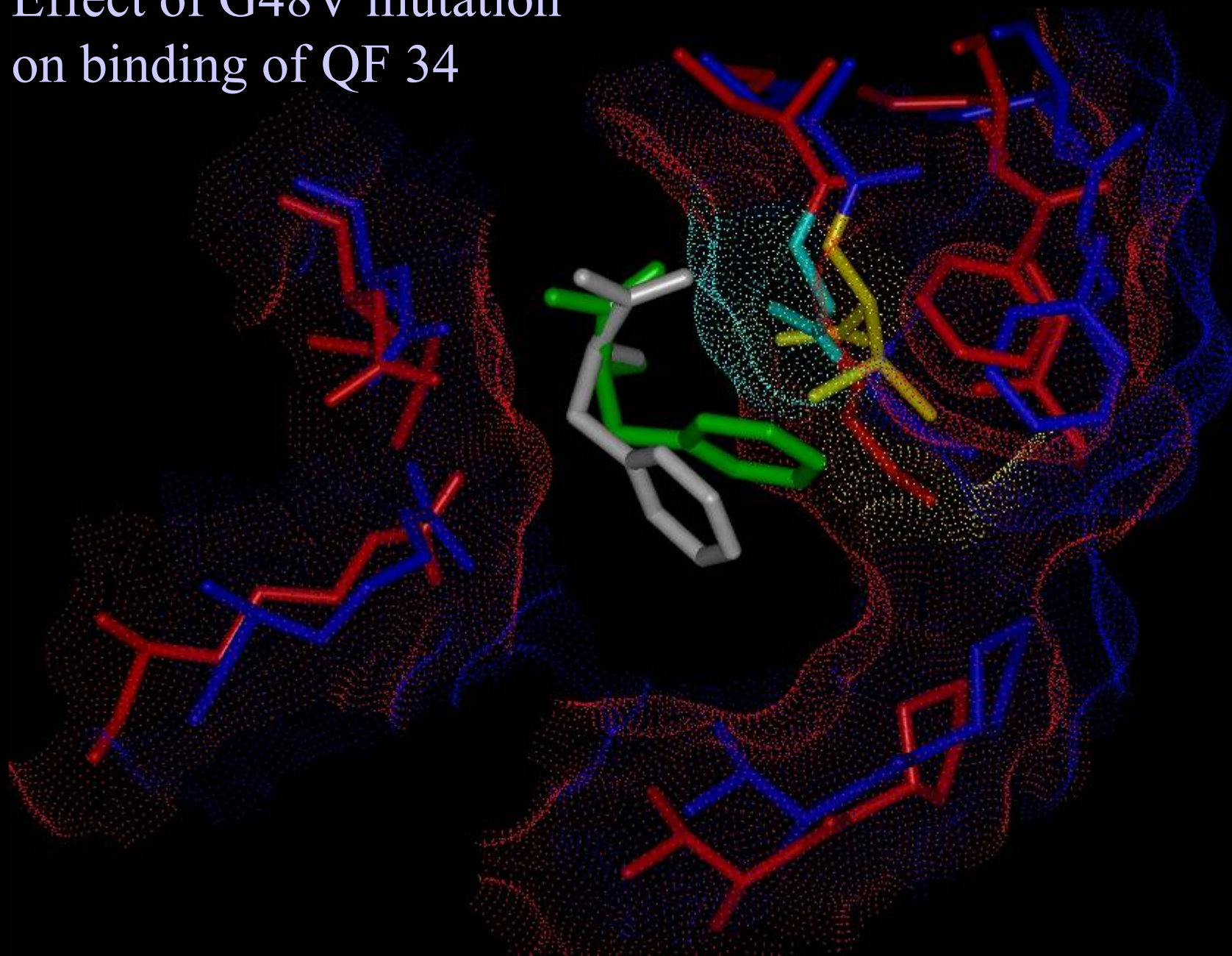
# Effect of G48V mutation on binding of SQV



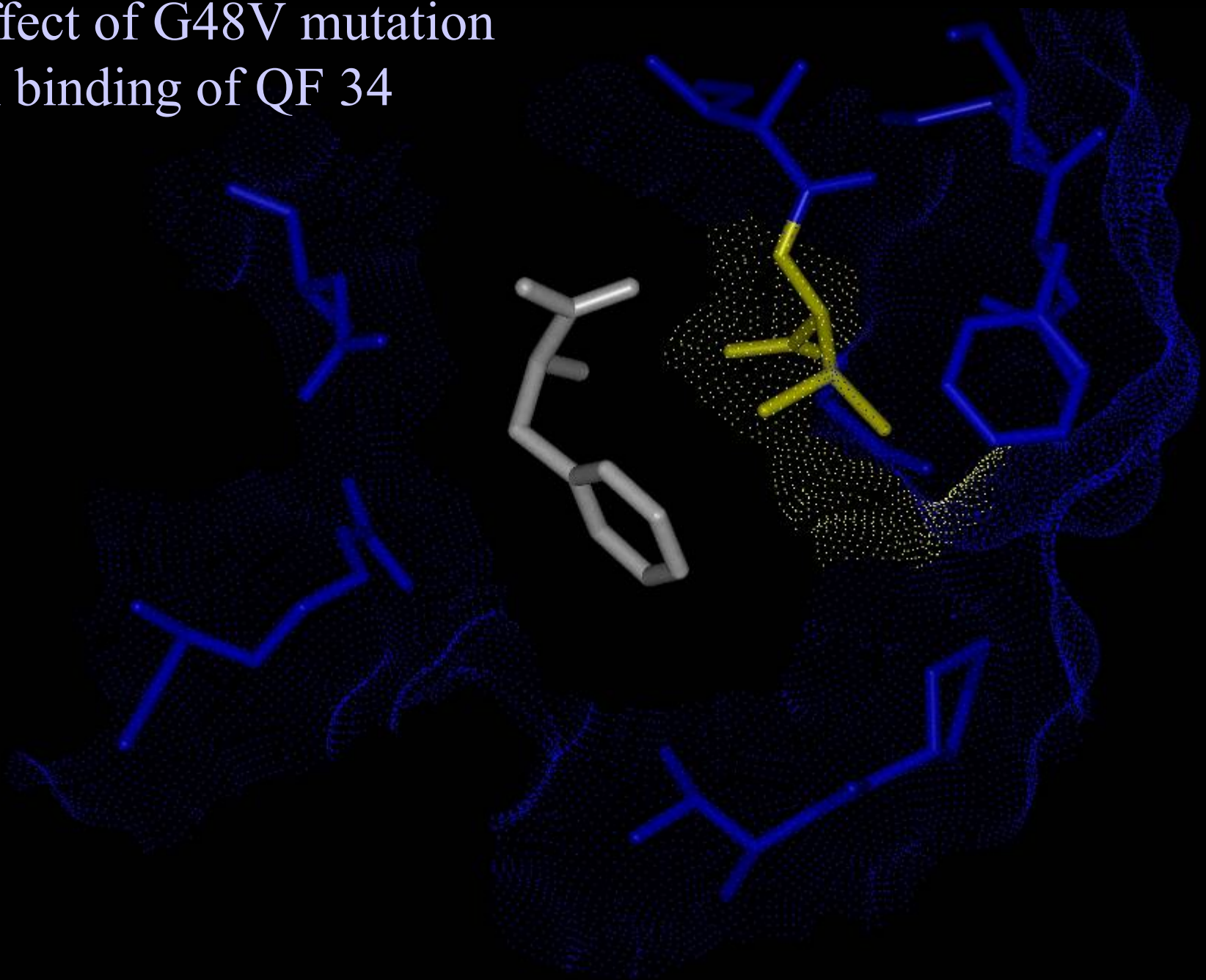
HIV PR – QF 34 complex  
S3' detail



# Effect of G48V mutation on binding of QF 34



# Effect of G48V mutation on binding of QF 34



# Proč to (nejspíš) nebude fungovat:

- Peptidový charakter inhibitoru
- nízká stabilita v buňkách a tkáních
- špatná dostupnost přes membrány

**K čemu je dobrá Učená společnost?**

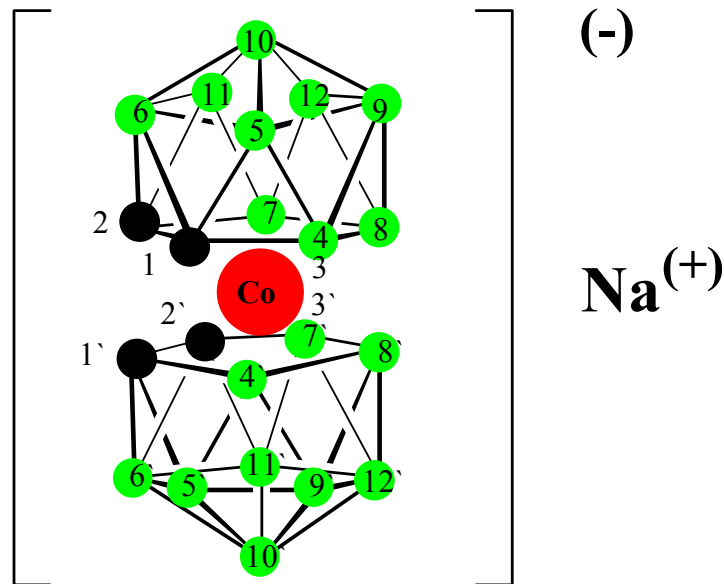
Občas tu potkáte skvělého  
chemika!



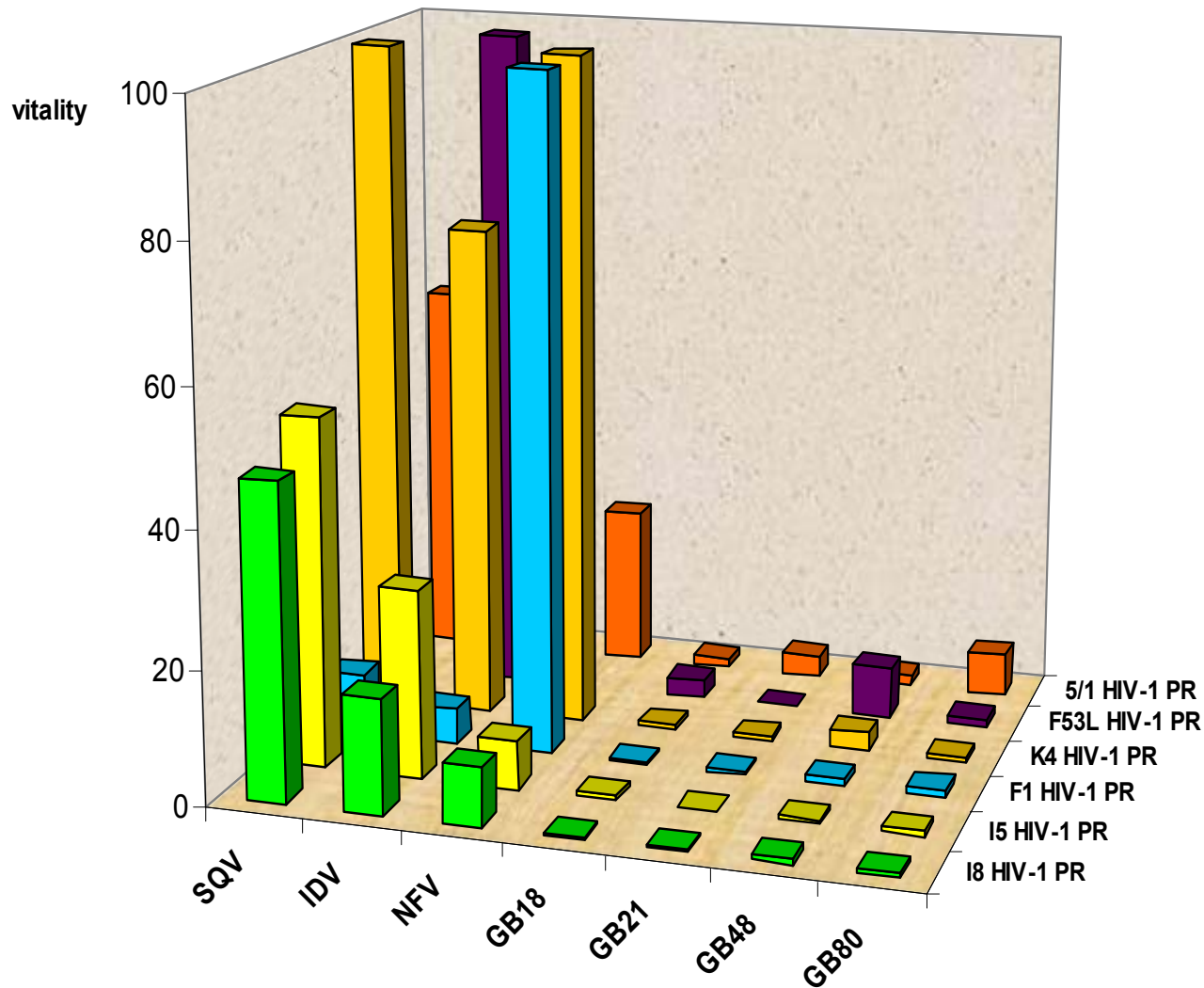


## **Překvapivý objev náhodného vyhledávání:**

**bizarní sloučeniny zvané metalokarborany jsou efektivními inhibitory všech resistantních kmenů HIV PR, které jsme dosud zkoušeli**



# Karborany inhibují aktivitu resistantních HIV proteas



# Karborany jako inhibitory HIV proteasy: otevřené otázky

- Mechanismus účinku (strukturní analýza?)
- toxicita pro buňku a organismus
- vazba na bíloviny plasmy
- rozpustnost, biodostupnost a stabilita
- vývoj resistance

# Trochu optimismu na závěr

- Studium vzniku resistance na molekulové úrovni pomáhá odhalit molekulové mechanismy evoluce mutantních virových kmenů
- Díky detailní strukturní informaci lze navrhnout (nebo náhodně identifikovat) nové inhibitory, schopné blokovat i mutované enzymy (QF34)
- Inhibitory druhé generace, navržené tak, aby blokovaly resistantní kmeny, mohou dlouhodobě pozdržet nebo vůbec zabránit vývoji resistance.

# Poděkování

## **UOCHB AV ČR**

Milan Kožíšek

Jan Weber

Jana Václavíková

Jana Pokorná

Martin Lepšík

Jana Šponarová

Martin Švec

Milan Souček

Jiří Vondrášek

Kvido Stříšovský

Jan Konvalinka

## **VŠChT Praha**

Petr Cígler

Vladimír Král

## **IMB, Jena, Německo**

Jeroen Mesters

Rolf Hilgenfeld

## **Universita v Heidelbergu, Německo**

Jochen Bodem

Hans-Georg Kräusslich

## **Fakultní nemocnice Bulovka**

Ladislav Machala

Marie Staňková

## **Ústav anorganické chemie AV ČR**

Bohumil Gruner

Jaromír Plešek



**HIV PR resistance tea**

