

# Antiretrovirusna terapija protiv virusa humane imunodeficijencije tipa 1

---

**Barić, Mislav**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:223873>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-14**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Mislav Barić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **Antiretrovirusna terapija protiv virusa humane imunodeficijencije tipa 1**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Zagreb, godina. 2022.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

18. srpnja 2022.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

9. rujna 2022.

Mentor rada: doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Potpis:



## Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VI</b>
<b>§ 1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Općenito o humanom imunodeficijencijskom virusu .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Antiretrovirusna terapija i mete lijekova.....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Reverzna transkriptaza.....	3
1.2.2. Proteaza .....	5
1.2.3. glikoproteinski kompleks virusne ovojnice .....	6
1.2.4. CCR5 koreceptor .....	8
1.2.5. Integraza .....	9
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Struktura i genom humanog imunodeficijencijskog virusa tipa 1.....</b>	<b>11</b>
2.1.1. Struktura virusa .....	11
2.1.2. Genom virusa.....	12
<b>2.2. Mehanizam infekcije.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3. Antiretrovirusni lijekovi .....</b>	<b>17</b>
2.3.1. Nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze (NRTI).....	17
2.3.2. Nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze (NNRTI) .....	19
2.3.3. Inhibitori proteaze .....	21
2.3.4. Inhibitori fuzije i ulaska .....	23
2.3.5. Inhibitori prijenosa lanca integrantom.....	25
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XXVII</b>



## § Sažetak

U skoro 40 godina od otkrića HIV-a 1 virus se proširio po cijelom svijetu. Razvili su se razni sojevi s različitim otpornostima na mnoge stanične imunološke odgovore. Razvijeno je mnoštvo spojeva koji pokazuju uspješno djelovanje protiv HIV-a 1. Mogu se razvrstati u odgovarajuće skupine, ovisno o tome koji korak životnog ciklusa HIV-a 1 inhibiraju. Ključni koraci koji se inhibiraju su: reverzna transkripcija, integracija virusne DNA u kromosom stanice domaćina, fuzija stanične membrane i virusne ovojnice, ulazak kapside u stanicu i proteoliza virusnih poliproteina u funkcionalne proteine.

Virus humane imunodeficijencije pripada skupini retrovirusa. Sadrži RNA u kojoj je zapisan genetski kod virusa. RNA je potrebno transkribirati natrag u DNA da bi virus mogao inficirati stanicu. Transkripcija se vrši reverznom transkriptazom koja ima više različitih enzimatskih aktivnosti. Zatim se novonastala DNA ugrađuje u genom stanice pomoću virusne integraze. Nakon ugradnje pomoću staničnih enzima se sintetiziraju sve komponente potrebne za napraviti nove virusne čestice.

Zbog velike stope mutacija virusa HIV-a, korištenje samo jednog aktivnog spoja nije dovoljno. Brzo se razvija rezistencija. Antiretrovirusna terapija temelji se na korištenju više spojeva iz različitih skupina inhibitora. Ovime se osigurava maksimalno smanjenje replikacije virusa HIV-a, kao i svođenje pojave mutacija i rezistencije na minimum. Antiretrovirusna terapija omogućila je HIV-pozitivnim ljudi povratak na normalan život. Životni vijek je znatno produljen, u odnosu na desetak preostalih godina nakon infekcije. Ipak, visoka stopa mutiranja HIV-a predstavlja izazov u terapiji i razvoju novih antiretrovirusnih lijekova protiv HIV-a.





## § 1. UVOD

### 1.1. Općenito o virusu humane imunodeficijencije

Virus humane imunodeficijencije tipa 1 (dalje u tekstu: HIV-1) od početka osamdesetih godina prošlog stoljeća uzrokovao je smrt preko 36 milijuna ljudi<sup>1</sup>. Jednom kada bi se pojedinac zarazio, postupno bi slabio imunitet dok se ne razvije sindrom stečenog gubitka imuniteta (engl. AIDS – acquired immune deficiency syndrome; fr. SIDA - Syndrome d'immunodeficiencie acquise). U prosjeku za 3 tjedna se pojavljuju prvi simptomi nalik mononukleози. Međutim bez uzimanja terapije zaražena osoba će razviti AIDS-a za 8-10 godina nakon infekcije.<sup>2</sup> Za to vrijeme opada broj CD4<sup>+</sup> T limfocita, stanice koje inficira virus HIV-a.

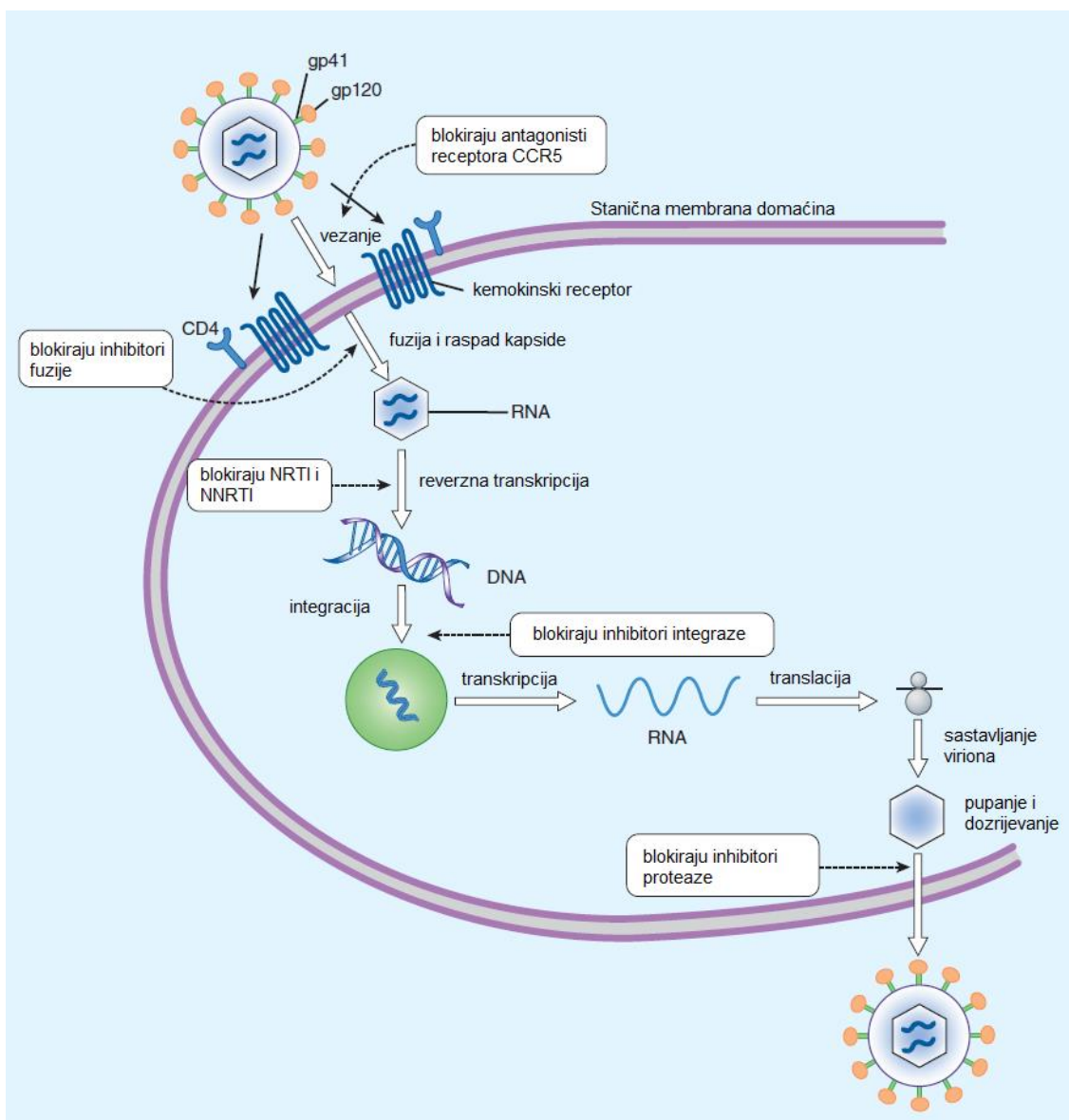
Nekoliko godina nakon otkrića HIV-a 1 otkriven je i srodan virus koji je nazvan HIV-2. U usporedbi s HIV-om 1, HIV-2 ima manju virulentnost i sposobnost transmisije. Posljedično je virus HIV-2 uglavnom rasprostranjen na području zapadne Afrike<sup>2</sup>. Virusi HIV-1 i HIV-2 imaju sličan genom sa 40-50 % poklapanja nukleotidnog slijeda. Osim gena za ključne enzime poput integraze i polimeraze te strukturne proteine poput gp41 i gp120, genomi obaju virusa sadrže pomoćne gene. Neki od gena kodiranih u HIV-u 1 su vpr i vpu, dok u HIV-u 2 nije prisutan gen vpu i sadrži gen vpx koji nije prisutan u genomu virusa HIV 1. Smatra se da su se oba virusa razvila iz grupe SIV virusa (engl. simian immunodeficiency viruses), koji inficiraju različite majmunske vrste<sup>2</sup>. Pretpostavlja se da je HIV relativno nedavno prešao sa majmuskog domaćina na čovjeka. Različite grupe HIV-a 1 imenovane su M (major), O (outlier), N (non-M, non-O) i P. Grupe su se pojavile iz različitih prijenosa virusa s neljudskih primata na čovjeka. Grupe N, O i P uglavnom su koncentrirane na područje zapadne i središnje Afrike, dok je grupa M najrasprostranjenija u svijetu i podijeljena je dalje u podtipove (A-H, J i K). HIV-1 je veoma podložan mutacijama, pa je grupa M dalje podijeljena u podskupine koje se temelje na sličnosti u genomu i geografskoj raspodjeli<sup>2</sup>.

HIV-1 i HIV-2 su retrovirusi. To su virusi kojima je genetski kod sadržan u jednolančanoj molekuli RNA i sadrže dvije kopije takve molekule. Nakon ulaska virusa u stanicu potrebno je prevesti jednostruku RNA molekulu u dvostruku DNA zavojnicu. Sinteza virusne DNA vrši se pomoću enzima reverzne transkriptaze ili RNA-ovisne DNA-polimeraze. Ovaj enzim jedna je od meta u antiretrovirusnoj terapiji. Drugi enzim važan za životni ciklus HIV-a 1, a ujedno i još jedna meta u antiretrovirusnoj terapiji je integraza. Integraza povezuje

dvostruku DNA zavojnicu virusa s kromosomom stanice u kojoj se nalazi. Dalje se korištenjem staničnih enzima sintetiziraju virusni proteini potrebni za sastaviti nove virusne čestice<sup>3</sup>.

## 1.2. Antiretrovirusna terapija i mete lijekova

Većina oboljelih inficirani su HIV-om 1, stoga je cilj ovog rada opisati interakcije i strukture različitih lijekova s njihovim metama u antiretrovirusnoj terapiji protiv HIV-a 1. Antiretrovirusnom terapijom moguće je svesti količinu virusnih čestica u organizmu na minimum. Time je produljen životni vijek zaraženog pojedinca, poboljšana kvaliteta njegova života i jako smanjen rizik prijenosa virusa spolnim putem. Lijekovi koji se koriste u terapiji mogu se podijeliti u 6 glavnih skupina: nukleozidni i nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze (engl. (non)nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTI i NNRTI), inhibitori proteaze (engl. protease inhibitors, PI), inhibitori fuzije, antagonisti CCR5 koreceptora (ili inhibitori ulaska) i inhibitori integraze (engl. integrase strand transfer inhibitors, INSTI)<sup>4</sup>. Podjela se temelji na meti s kojom lijekovi interagiraju. Prilikom terapije koriste se najčešće tri lijeka iz barem dvije skupine lijekova. Ovakav oblik terapije još se zove vrlo aktivna antiretrovirusna terapija (HAART, engl. highly active antiretroviral treatment)<sup>3</sup>. U ovakvoj se terapiji najčešće koriste inhibitori revrezne transkriptaze i proteaze. U novije vrijeme javljaju se kombinacije u kojima se koriste i inhibitori integraze (npr. raltegravir)<sup>5</sup>. Time se jako smanji brzina replikacije virusnih čestica i mogućnost pojave mutacije. To je vrlo poželjan učinak jer će teže doći do razvitka otpornosti virusa na lijek. Na slici 1 prikazan je životni ciklus virusa HIV-a s označenim ključnim procesima te čime se navedeni procesi inhibiraju.



Slika 1. Shematski prikaz životnog ciklusa virusa HIV-a. Slika preuzeta i uređena iz B. G. Katzung, *Basic & Clinical Pharmacology*, str. 874.

### 1.2.1. Reverzna transkriptaza

Reverzna transkriptaza ili RNA-ovisna DNA polimeraza je heterodimerni enzim. Sastoji se od katalitički aktivne podjedinice p66 (relativna molekulska masa oko 66 kDa) te strukturno važne p51 podjedinice (relativna molekulska masa oko 51 kDa). Podjedinice p66 i p51 potječu od istog polipeptidnog lanca koji se cijepa pomoću virusne proteaze. Podjedinica p66 ima 560 aminokiselina, sadrži DNA polimeraznu domenu i domenu RNazu H na C-terminusu<sup>5,6</sup>. DNA-

polimerazna domena sastoji se od četiriju poddomena: prsti, dlan, palac i poveznica. Podjedinica p51 ima 440 aminokiselina i sadrži domenu koja je analogna polimeraznoj domeni u p66. Međutim, zbog različitog razmještaja i međusobnih položaja podjedinica polimerazne domene nema katalitičku aktivnost<sup>5</sup>. Struktura reverzne transkriptaze prikazana je na slici 2.

Reverznoj je transkriptazi, kao i mnogim polimerazama, potreban lanac kalup prema kojem će sintetizirati novi lanac i klicu iz koje započinje sinteza novog lanca. Zanimljivo je da reverzna transkriptaza kao klicu koristi staničnu tRNA<sup>Lys</sup>. Mehanizam sinteze DNA lanca je također sličan onom koji se javlja kod mnogih DNA polimeraza. Transkriptaza se veže za virusnu RNA ili DNA na način da je 3' kraj klice smješten u P mjesto. Sljedeći deoksinukleotid-trifosfat veže se u N mjesto. Važnu ulogu u pravilnom smještanju supstrata igraju dva dvovalentna metalna kationa. Mogu biti Mg<sup>2+</sup> ili Mn<sup>2+</sup>. Nukleofilnim napadom 3' hidroksilne skupine riboze na  $\alpha$ -fosfatnu skupinu deoksinukleotid-trifosfata stvara se nova fosfodieterska veza. Pirofosfat je izlazeća skupina. Reverzna transkriptaza ne sadrži domenu za ispravljanje pogreške prilikom sinteze virusne DNA. Zbog toga je vrlo sklona stvaranju mutacija, te se pogreške stvaraju svako 1500 – 4000 parova baza<sup>7</sup>. Ovo predstavlja veliki problem u sprječavanju daljnjih infekcija HIV-om zbog pojave sojeva rezistentnih na antiretrovirusne lijekove.

Domena RNaza H reverzne transkriptaze hidrolizira RNA lanac prilikom sinteze novog DNA lanca. Ima mogućnost hidrolize RNA lanca samo ako se isti nalazi u RNA/DNA hibridu. Time se osigurava sinteza dvostrukog virusnog DNA lanca, tj. provirusa. Također uklanja i tRNA klicu. Kao i polimerazna domena, sadrži dva dvovalentna metalna kationa. Nefunkcionalna domena RNaza H čini virus neinfektivnim, stoga su razvijeni inhibitori domene RNaze H za antiretrovirusnu terapiju. Domena RNaza H i polimerazna domena udaljene su oko 60 Å što odgovara 17 parova baza za dvostruku DNA zavojnicu, odnosno 18 parova baza za RNA/DNA hibrid<sup>5,7</sup>.



Slika 2. Struktura reverzne transkriptaze HIV-a 1 (obojane domene podjedinice p66 i podjedinica p51) u kompleksu s nukleinskom kiselinom (sivo). Slika preuzeta i uređena iz ref. 5.

### 1.2.2. Proteaza

Proteaza virusa HIV-1 homodimerni je enzim sa 99 aminokiselina u svakom polipeptidnom lancu. Struktura proteaze u kompleksu s inhibitorom TL-3 prikazana je na slici 3. Enzim sadrži os simetrije drugog reda. Proteaza je iznimno podložna mutacijama te predstavlja velik problem u razvoju lijekova za antiretrovirusnu terapiju i pojavu rezistentnih sojeva<sup>8</sup>. Poznato je preko 140 struktura proteaza s različitim mutacijama u kompleksu s različitim inhibitorima<sup>9</sup>. Struktura proteaze virusa HIV-a 1 u kompleksu s inhibitorom TL-3 prikazana je na slici 3.

Proteaza HIV-a 1 spada u skupinu aspartil-proteaza. Ističe se trijada Asp-Thr-Gly tipična za sve aspartil proteaze<sup>9,11</sup>. Pokazalo se da mutacijom ovih aminokiselina dolazi do znatnog smanjenja katalitičke aktivnosti ili potpunog nestanka iste<sup>12</sup>. U aktivnom mjestu proteaze nalaze se dva aspartilna ogranka koji imaju katalitičku ulogu. Pretpostavlja se da je jedan aspartat deprotoniran te djeluje kao baza koja deprotonira molekulu vode čime postaje nukleofilnija za napad na karbonilnu skupinu peptida. Drugi aspartilni ogranak je protoniran i važan je za polarizaciju karbonilne skupine. Nukleofilnim napadom vode na karbonilnu skupinu nastane tetraedarski međuprodukt koji se zatim raspadne, te se iz njega izdvaja peptid čiji se amino kraj protonira pomoću aspartata koji je deprotonirao vodu<sup>9</sup>.

Uloga virusne proteaze je cijepanje poliproteina sintetiziranih iz virusnih gena. Tako na primjer cijepanjem Gag (engl. group specific antigen) poliproteina pomoću proteaze nastaju strukturni proteini virusa HIV-a p17 – protein matriksa, p24 – protein kapside, p7 – protein nukleokapside i mali protein p6<sup>7</sup>. Drugi primjer je reverzna transkriptaza. Cijepanjem domene RNaze H iz podjedinice p66 reverzne transkriptaze nastaje podjedinica p51. Asocijacijom podjedinica p66 i p51 nastaje funkcionalni enzim reverzna transkriptaza<sup>5</sup>. Valja istaknuti da glikoproteini gp120 i gp41 koji su važni za ulazak HIV-a 1 u CD4<sup>+</sup> T limfocit su dobiveni iz poliproteina gp160. Međutim, taj poliprotein se cijepa staničnim proteazama<sup>7</sup>.

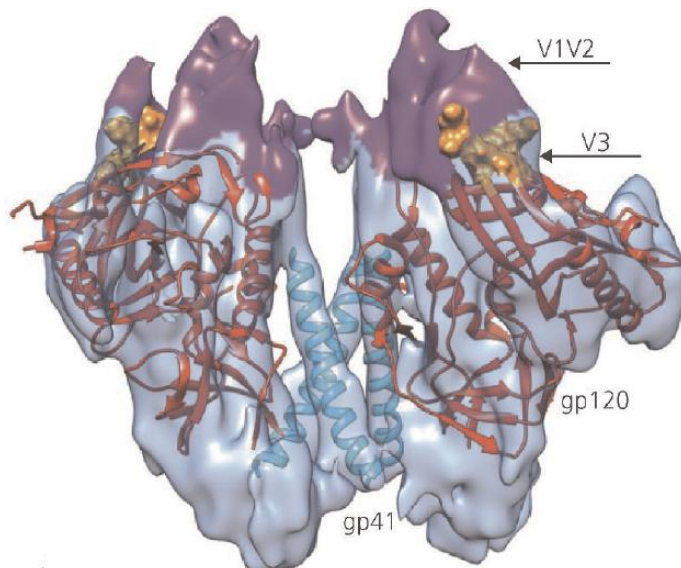


Slika 3. Struktura protease HIV-a 1 u kompleksu s inhibitorom TL-3. Slika preuzeta iz ref. 9.

### 1.2.3. glikoproteinski kompleks virusne ovojnice

Za ulazak virusne čestice u stanicu domaćina ključna je interakcija između glikoproteinskog kompleksa virusne ovojnice i staničnog receptora CD4 na CD4<sup>+</sup> T limfocitima. Glikoproteinski kompleks sastoji se od tri manje podjedinice gp41 koje se nalaze usidrene u ovojnici virusa i od triju većih podjedinica gp120 koje se nalaze na vanjskoj strani virusa. Struktura glikoproteinskog kompleksa virusne ovojnice prikazana je na slici 4. Podjedinica gp120 sastoji se od polipeptida mase 60 kDa koja je visoko glikozilirana čime se masa poveća na 120 kDa. Glikozilacija je oblik zaštite virusa od djelovanja antitijela<sup>2</sup>. Obje su podjedinice kodirane

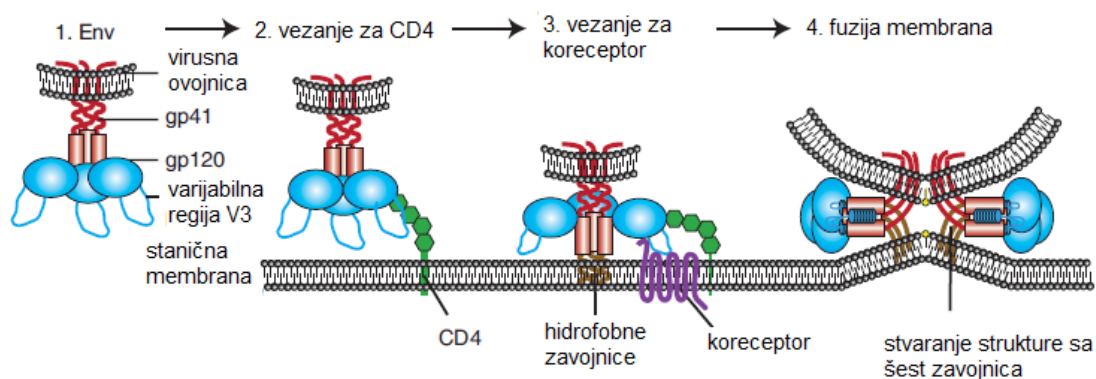
genom env iz kojeg se sintetizira gp160 poliprotein. Poliprotein gp160 cijepa se staničnim proteazama. Ovaj se proces uglavnom vrši staničnom proteazom furin, iako je cijepanje gp160 poliproteina moguće i drugim staničnim proteazama<sup>13</sup>. Ukoliko se gp160 poliprotein ne pocijepa, dolazi do stvaranja nefunkcionalnog glikoproteina i neinfektivne virusne čestice<sup>14</sup>. Podjedinice gp41 i gp120 nisu kovalentno vezane nego stvaraju nekovalentne interakcije.



Slika 4. Struktura modificiranog oblika trimernog kompleksa gp120 i gp41. Crvene regije pripadaju podjedinic gp120, a plave gp41. Varijabilne petlje V1 i V2 prikazane su ljubičastom, a V3 regija narančastom bojom, Slika preuzeta iz N. J. Dimmock, A. J. Easton, *Introduction to Modern Virology*, str. 334.

Interakcija CD4 receptora i gp120 glikoproteina prvi je korak u ulasku virusa HIV-a u CD4<sup>+</sup> T limfocit. Konstanta disocijacije kompleksa gp120 glikoproteina i CD4 receptora iznosi  $4 \times 10^{-9}$  mol dm<sup>-3</sup> (ref. 15). Može se zaključiti da je gp120 visokospecifičan za CD4 receptor. Zbog visoke učestalosti pogrešaka djelovanjem reverzne transkriptaze, sekvenca koja kodira glikoprotein gp120 izrazito je varijabilna. Ovo čini HIV-1 vrlo rezistentnim na imunološke odgovore, točnije na djelovanje antitijela. Dok se razvije antitijelo za gp120 virus je već toliko mutirao da antitijelo više ne odgovara ciljanom proteinu<sup>2</sup>. Interakcija gp120 i CD4 uzrokuje konformacijske promjene kojima se omogućuje interakcija s drugim staničnim transmembranskim proteinom tj. koreceptorom (CCR5 ili CXCR4). Jedan oblik rezistencije na HIV-1 pojavljuje se u obliku delecije u genu za CCR5, što uzrokuje nedostatak CCR5 receptora<sup>16</sup>. Dodatna interakcija s koreceptorom nužna je zbog toga što su stanična membrana i virusna ovojnica previše udaljene za uspješnu fuziju<sup>2</sup>. Koreceptor interagira sa V3

varijabilnom regijom gp120 čime se izlaže hidrofobna zavojnica u gp41 glikoproteinu koja je nastala zbog konformacijskih promjena<sup>17</sup>. Zavojnica se usidri u membranu CD4<sup>+</sup> T limfocita te se dalje promjeni konformacija i uz pomoć još jednog glikoproteinskog kompleksa stvori struktura od šest zavojnica iz gp41 podjedinica koja omogućuje fuziju, tj. spajanje ovojnice virusa i stanične membrane. Proces fuzije shematski je prikazan na slici 5. Nije sasvim poznato koji je najsporiji korak u cijelom mehanizmu fuzije. Cijeli proces je izrazito kooperativan te uključuje interakciju više glikoproteina, receptora i koreceptora.



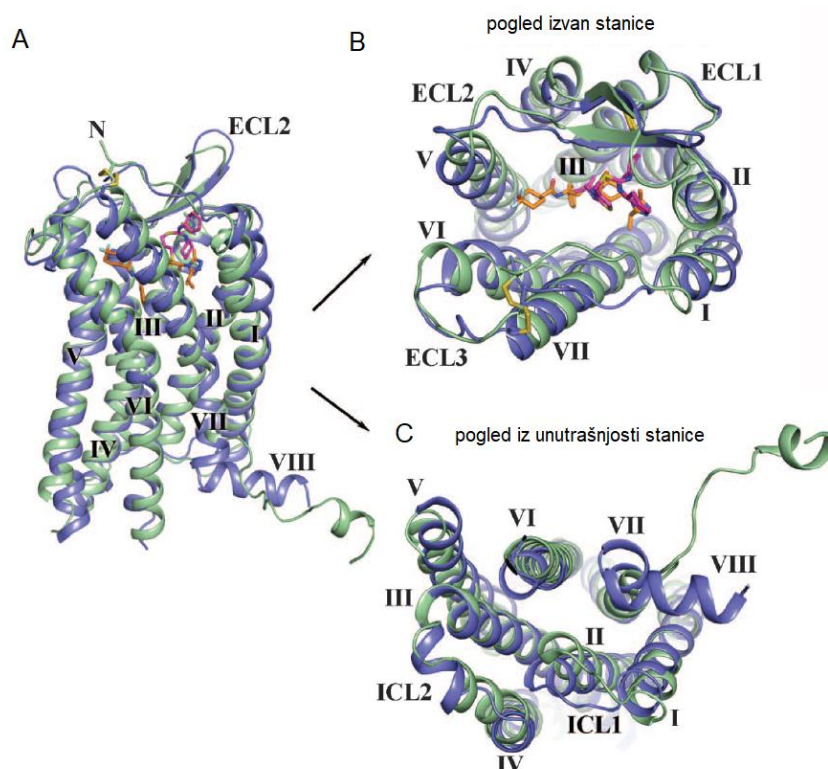
Slika 5. Shematski prikaz procesa fuzije virusne ovojnice viriona HIV-a sa staničnom membranom CD4<sup>+</sup> T limfocita. Slika preuzeta i uređena iz ref. 17.

#### 1.2.4. CCR5 koreceptor

Kemokinski receptor tipa 5 ili CCR5 nije virusni protein ni enzim, već je dio stanice domaćina. S obzirom da igra ključnu ulogu u ulasku HIV-a 1 u stanicu, razvijeni su antagonisti CCR5 kojima se onemogućuje ulazak virusnog genoma u stanicu. CCR5 spada u skupinu receptora spregnutih s proteinom G<sup>18</sup>. Karakteristično za tu skupinu receptora je da sadrže sedam transmembranskih  $\alpha$ -zavojnica. Zavojnice su povezane trima vanstaničnim i trima unutarstaničnim petljama. Između N-terminusa i druge vanstanične petlje postoje disulfidne veze koje čine navedene regije rigidnijima. Usporedba struktura CCR5 i CXCR4 zajedno s pripadajućim inhibitorima nalazi se na slici 6.

CCR5, kao i ostali receptori spregnuti s proteinom G, ima ulogu prijenosa signala u stanici. Važan je u imunološkim i upalnim reakcijama organizma. Ligandi koji se tipično vežu za CCR5 su upalni protein-1 $\alpha$  makrofaga (MIP-1 $\alpha$ , engl. macrophage inflammatory protein), MIP-1 $\beta$ , monocitni kemotaksijski protein-2 (MCP-2) i RANTES<sup>18,19</sup>. Navedeni protein ligandi, kao i glikoprotein gp120 preferencijalno interagiraju s N-terminusom i drugom vanstaničnom petljom, stvarajući odgovarajuće stanične odgovore<sup>19</sup>.





Slika 6. Usporedba struktura CCR5 (plavo) i inhibitora maraviroka (narančasto) s CXCR4 (zeleno) s inhibitorom IT1t (ljubičasto). ECL – vanstanična petlja; ICL – unutarstanična petlja. Slika preuzeta iz ref. 18.

#### 1.2.5. Integraza

HIV-1 je retrovirus kojem je genom zapisan u obliku jednostruke RNA zavojnice. Prilikom infekcije nužno je pretvoriti jednolančanu RNA zavojnicu u dvostruku DNA zavojnicu. Zatim je potrebno ugraditi virusni DNA u genom stanice domaćina, što se vrši pomoću integraze.

Integraza se sintetizira iz Gag-Pol poliproteina kojeg cijepa HIV proteaza. Sadrži tri domene: N-terminalnu dimerizacijsku domenu, C-terminalnu domenu za vezanje DNA i središnju RNaza H domenu<sup>20</sup>. N i C terminalne domene su podložne djelovanju proteaza, dok je središnja katalitička domena otpornija na proteolitičko cijepanje<sup>21</sup>. Točna struktura integraze nije potpuno poznata zbog neuspješnosti u izoliranju cjelovite integraze u kompleksu s DNA<sup>20</sup>. Međutim, riješene su strukture zasebnih domena. Još je poznato je da je integraza homodimerni enzim<sup>21</sup>.

Prvih 49 aminokiselina u peptidnom lancu pripada N-terminalnoj domeni. Sadrži regiju za vezanje  $Zn^{2+}$  kationa pomoću dva histidinska i dva cisteinska ogranka<sup>21</sup>. Vezanje cinka važno

je za strukturu domene, te pomaže dimerizaciji za stvoriti funkcionalnu integrazu. Iako sadrži motive zavojnica – okret – zavojnica (engl. helix-turn-helix), nisu uočene interakcije N-terminalne domene s DNA.

Središnja domena je katalitički aktivna. Struktura je analogna mnogim nukleotidil-transferazama, poput RNaze H ili RuvC<sup>21,22</sup>. Aminokiseline Asp-64, Asp-116 i Glu-152 ključne su za mehanizam djelovanja integraze kao i koordinaciju s dvovalentnim metalnim kationom, koji su najčešće Mn<sup>2+</sup> (*in vitro*) ili Mg<sup>2+</sup> (*in vivo*)<sup>23</sup>. Prva reakcija koju katalizira integraza je procesiranje 3' kraja provirusne DNA. Endonukleolitičkim djelovanjem uklanja se gvanin-timin dinukleotid oslobađajući hidroksilnu skupinu riboze na 3' poziciji. Reakcija se odvija na oba kraja dvostruke DNA zavojnice. Tako aktivirana provirusna DNA zatim se u drugoj reakciji ugrađuje u kromosom stanice domaćina reakcijom transesterifikacije. Za uklanjanje dinukleotida na 5'-kraju provirusne DNA i ligaciju lanaca koriste se stanični enzimi za popravak DNA<sup>23</sup>.

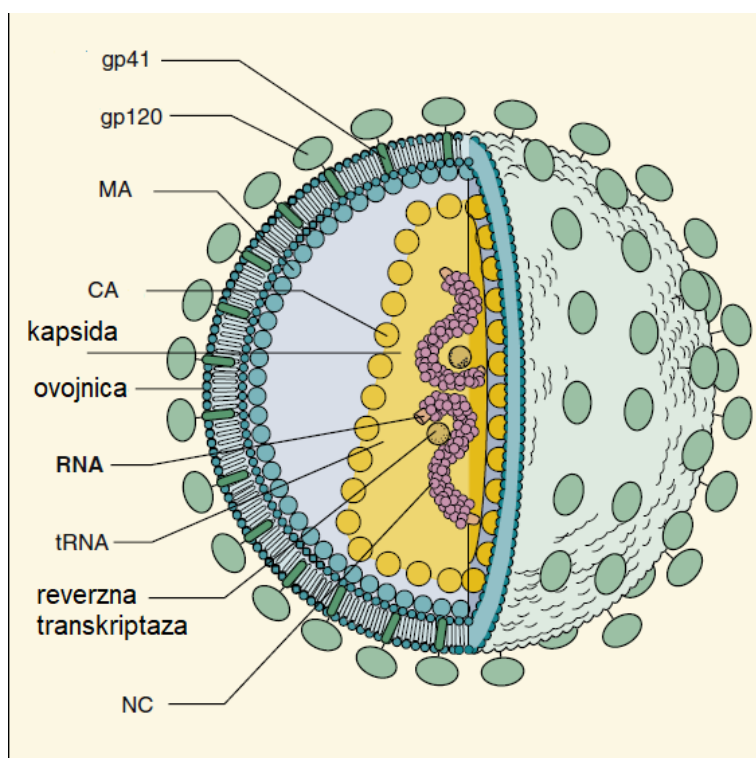
Uočeno je da C-terminalna domena može interagirati s DNA<sup>24</sup>. Domena se sastoji od dvije β bačve koje stvaraju nekovalentne interakcije čime se stabilizira struktura. Dimerizacijom se stvara udubina u obliku sedla. Udubina sadrži bazične aminokiseline u odgovarajućoj konformaciji za interakciju s dvostrukom DNA zavojnicom<sup>21</sup>.

## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Struktura i genom humanog imunodeficijnog virusa tipa 1

#### 2.1.1. Struktura virusa

Struktura viriona HIV-a 1 prikazana je na slici 7. Virion HIV-a 1 sfernog je oblika s promjerom oko 100 nm<sup>25</sup>. Virusna ovojnica sastoji se od fosfolipidnog dvosloja. Sadrži oko 72 glikoproteinska šiljka<sup>2</sup>. Šiljci se sastoje od trimera glikoproteina gp120 s vanjske strane ovojnice i trimera glikoproteina gp41 koji se nalazi unutar ovojnice. Glikoprotein gp120 interagira s receptorom CD4, nakon čega dolazi do konformacijskih promjena koje omogućuju interakciju gp120 s odgovarajućim koreceptorima. Interakcijom gp120 i koreceptora dolazi do izlaganja gp41 podjedinice i konačno dovodi do fuzije virusne ovojnice i stanične membrane. Uz ovojnicu s unutarnje strane viriona nalazi se protein matriksa koji ima strukturnu ulogu. Protein matriksa stvara trimere, te ima važnu ulogu u pupanju – izdvajanju novih viriona iz stanice domaćina<sup>26</sup>.

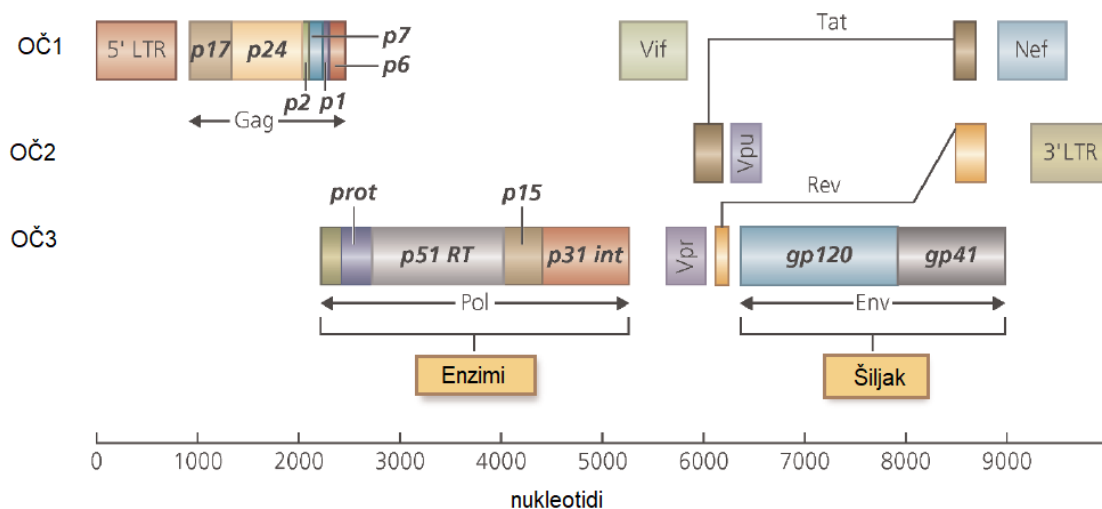


Slika 7. Shematski prikaz strukture zrelog viriona HIV-a 1. MA - protein matriksa, CA – protein kapside, NC – protein nukleokapside. Slika preuzeta i uređena iz P. R. Murray, K. S. Rosenthal, M. A. Pfaller, *Medical Microbiology*, str. 535.

Unutar ovojnice nalazi se stožasta kapsida koja se sastoji od proteina kapside p24 (masa proteina oko 24 kDa). U novijim testovima (četvrte generacije) za detekciju HIV-a moguće je detektirati protein kapside manje od mjesec dana nakon infekcije<sup>27</sup>. Kapsida se sastoji od oko 1500 proteina kapside p24. Proteini kapside međusobno interagiraju preko C-terminalne domene stvarajući heksamerne strukture koje dalje međusobno interagiraju preko N-terminalnih domena<sup>28</sup>. Unutar kapside nalaze se dvije kopije virusne RNA. Molekule RNA obavijene su sa nukleokapsidnim proteinom p7. Protein p7 (masa proteina oko 7 kDa) sadrži dvije regije cinkovih prstiju za interakciju sa RNA<sup>29</sup>. Unutar kapside nalazi se 10-50 enzima integreze, reverzne transkriptaze i proteaze<sup>3</sup>. Prisutno je i nekoliko molekula tRNA<sup>Lys</sup> koje služe kao klice za polimerizaciju provirusne DNA.

### 2.1.2. Genom virusa

Genetski kod virusa HIV-1 zapisan je u obliku jednostruke RNA molekule, te se u kapsidi virusa nalaze dvije kopije molekule RNA. Virusna genomska RNA slična je staničnoj mRNA po tome što sadrži poliadenilatni rep na 3' kraju i m<sup>7</sup>G kapu na 5' kraju. Genom sadrži oko devet tisuća parova baza u kojem su kodirana tri gena tipična za retroviruse: gag, pol i env<sup>3</sup>. Na slici 8 shematski je prikazan raspored gena u genomu virusa HIV-a 1 s odgovarajućim okvirima čitanja (OČ1, 2 i 3). Gen gag kodira protein matriksa, protein kapside i nukleokapside. Gen pol kodira proteazu, reverznu transkriptazu i integrazu. Gen env kodira dijelove glikoproteinskog šiljka gp120 i gp41. Genom HIV-a 1 kodira i dodatne pomoćne proteine. Ti proteini su transaktivator transkripcije (Tat), regulator ekspresije virionskih proteina (Rev), negativni regulatorni faktor (Nef), faktor virusne infektivnosti (Vif), virusni protein U (Vpu) i virusni protein R (Vpr)<sup>3,4</sup>. Na 5' i 3' kraju virusnog genoma nalaze se nekodirajući dijelovi nazvani R. Na 5' kraju nakon R regije slijedi U5. Prije R regije na 3' kraju nalazi se U3 regija. Nakon djelovanja reverzne transkriptaze novonastali DNA lanac duži je od početnog RNA lanca. Razlog tome je da se na oba kraja sada nalazi slijed 5'-U3-R-U5-3'. Služe kao promotori transkripcije ili regije za vezanje dodatnih transkripcijskih faktora<sup>3</sup>. Skup regija U3-R-U5 još se zove LTR (engl. long tandem repeats). Regije U3 i U5 sadrže kratke ponavljajuće i obrnute dijelove koji su važni za integraciju provirusne DNA u kromosom stanice domaćina.



Slika 8. Raspored gena u genomu HIV-a 1. Iz Gag poliproteina nastaju protein matriksa (p17), protein kapside (p24) i nukleokapside (p7). Iz Pol poliproteina (točnije Gag-Pol) nastaju proteaza (prot), p51 podjedinica reverzne transkriptaze, RNazna domena reverzne transkriptaze (p15) i integraza (p31). Iz Env poliproteina nastaju podjedinice gp120 i gp41 glikoproteinskog šiljka. Prisutni su i geni pomoćnih i regulatornih proteina. Slika preuzeta i uređena iz N. J. Dimmock, A. J. Easton, K. N. Leppard, *Introduction to Modern Virology*, str. 332.

## 2.2. Mehanizam infekcije

Virus HIV-a 1 može se prenositi krvlju, nezaštićenim spolnim odnosom, korištenjem nesteriliziranih igala, porođajem s HIV-pozitivne majke na dijete i dojenjem. Prvi korak u infekciji HIV-om je interakcija podjedinice gp120 glikoproteinskog šiljka sa CD4 receptorom. Stanice koje sadrže CD4 receptor su CD4<sup>+</sup> T pomoćničke stanice i CD4<sup>+</sup> makrofagi. Ovisno o tome koje stanice napadaju, HIV-1 se može dijeliti na M-tropne i T-tropne viruse. M-tropni virusi mogu zaraziti CD4<sup>+</sup> makrofage i T limfocite i koriste CCR5 kao koreceptor. M-tropni se virusi još zovu i R5 virusi. T-tropni virusi uglavnom napadaju CD4<sup>+</sup> T limfocite i kao koreceptor koriste CXCR4. Zbog toga se još zovu i X4 virusi. Postoje i dvotropni sojevi koji koriste oba koreceptora, stoga se još zovu R5X4 virusi<sup>2,4</sup>. Specifičnost za odgovarajući koreceptor ovisi o aminokiselinskom slijedu u glikoproteinskom šiljku. Mikroglialne stanice koje ne sadrže CD4 receptor također mogu biti zaražene HIV-om<sup>1,3</sup>. Ovo sugerira korištenje drugog receptora za ulaz HIV-a 1 u stanicu.

Kao dodatna pomoć vezanju viriona za stanicu domaćina u ovojnici se mogu nalaziti stanični membranski proteini. Primjer je stanični ciklofilin A koji slabo interagira s heparanom<sup>2</sup>. Glikoproteinski šiljak također može stvarati nespecifične interakcije s vanstaničnim dijelovima određenih proteina ili receptora. Kao primjer ističu se interakcije šiljka s  $\alpha 4\beta 7$  integrinom ili heparan-sulfatom<sup>17</sup>. Virion se pomoću šiljka ili ugrađenih staničnih proteina veže i otpušta s različitih vanstaničnih dijelova staničnih membranskih proteina dok ne naiđe na CD4 receptor.

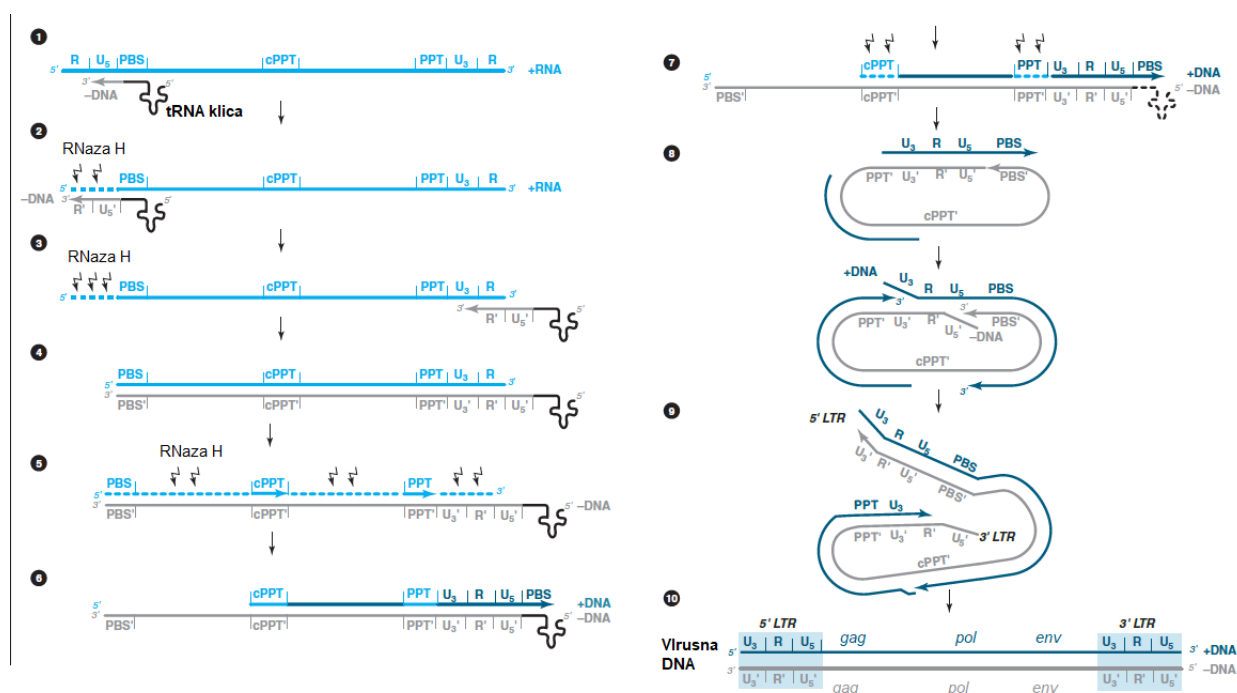
CD4 receptor sadrži 3 regije: citoplazmatsku, transmembransku i vanstaničnu regiju. Citoplazmatska regija sadrži nabijene aminokiseline, a transmembranska regija hidrofobne aminokiseline. U vanstaničnoj regiji postoje četiri domene nalik imunoglobulinima nazvane od V1 do V4<sup>14</sup>. Osnovni strukturni motiv su dvije antiparalelne  $\beta$ -ploče s kratkim nizom od 5 do 10 aminokiselina. Beta-ploče su dodatno stabilizirane disulfidnim vezama (osim V3 domene) i hidrofobnim interakcijama u prostoru između  $\beta$ -ploča. Pokazano je da i odcijepljena V1 domena CD4 receptora također snažno interagira s glikoproteinom gp120 te se može zaključiti da je gp120 visokospecifičan za CD4 receptor<sup>14</sup>.

Interakcija CD4 i gp120 uzrokuje konformacijske promjene u gp120 čime se izlaže odgovarajuća petlja u glikoproteinu gp120. Ova petlja interagira dalje s koreceptorom (najčešće CCR5)<sup>30</sup>. Vezanje gp120 za koreceptor dovoljno približi virusnu ovojnicu i staničnu membranu i izloži hidrofobne zavojnice u transmembranskoj podjedinici šiljka. Zavojnica se ugradi u staničnu membranu. Zajedno s još jednim glikoproteinskim šiljkom, glikoprotein gp41 se savije, stvarajući dvije zavojnice na N- i C-kraju proteina čime se stvori struktura od šest zavojnica<sup>17</sup>. Time je omogućena fuzija dviju membrana i ulaska kapside HIV-a 1 u stanicu.

Jednom kada se kapsida HIV-a 1 nalazi u stanici, započinje reverzna transkripcija. Nije točno poznato kojim redoslijedom se dogodi raspad kapside. Neki modeli pretpostavljaju da se raspad kapside događa neposredno nakon ulaska kapside u stanicu, dok drugi tvrde da je proces postupan i traje par sati dok kapsida i genom ne dođu do jezgrine ovojnice domaćina, ili pak započinje tek pri kontaktu kapside s jezgrinom ovojnicom<sup>28</sup>. Za transport kapside HIV-a do jezgrine ovojnice koriste se stanični mikrotubuli<sup>31</sup>.

Reverzna transkripcija shematski je prikazana na slici 9. Zapčinje vezanjem tRNA<sup>Lys</sup> za mjesto vezanje klice: tb ili PBS regiju (engl. tRNA binding site ili primer binding site). Transportna RNA služi kao klica za početak sinteze nekodirajućeg DNA lanca. Sintetizira se dio DNA lanca koji je komplementaran 5' kraju koji sadrži R i U5 regiju. Zatim se djelovanjem

domene RNaze H reverzne transkriptaze hidrolizira dio RNA lanca komplementaran novonastalom DNA lancu. Novonastala DNA premjesti se na 3' kraj te se spari s R regijom. Nastavlja se sinteza nekodirajućeg DNA lanca. U genomskoj RNA neposredno prije U3 regije postoji polipurinska regija koja je otpornija na djelovanje RNazne domene reverzne transkriptaze<sup>5</sup>. Postoji još jedna polipurinska regija koja se nalazi u središnjem dijelu virusne RNA. Sva genomaska RNA osim polipurinskih regija se hidrolizira prilikom sinteze prvog DNA lanca. Polipurinske regije služe kao klice za sintezu drugog, kodirajućeg DNA lanca. Kada je nekodirajući lanac sintetiziran do kraja, slijedi sinteza kodirajućeg DNA lanca počevši od polipurinskih RNA klica. Slijedi hidroliza RNA klica i ciklizacija DNA lanca. Kada reverzna transkriptaza dođe do LTR regije na 5' kraju kodirajućeg DNA lanca, dolazi do razdvajanja sparenih lanaca i sinteze nove LTR regije na 3' kraju novog lanca, kao i stvaranja LTR regije na 3' kraju nekodirajućeg lanca. Ovime nastaje provirusna DNA koja je veća od genomске RNA HIV-a 1 zbog toga što sadrži dodatne nukleotide na 5' i 3' krajevima.



Slika 9. Shematski prikaz mehanizma reverzne transkripcije kod HIV-a 1. Slika preuzeta i uređena iz T. W. Mak, M. E. Saunders, *The Immune Response*, str. 792-793.

Novosintetizirana DNA zajedno s integrazom, proteinom matriksa i Vpr-om te nekim staničnim proteinima stvaraju predintegracijski kompleks (PIC, engl. pre-integration complex). Vpr pomaže ulasku virusne DNA u jezgru stanice, ali i zaustavlja stanice u G2 fazi<sup>7</sup>. Pretpostavlja se da ovaj učinak poboljšava virusnu replikaciju<sup>3</sup>. Jednom kada se kompleks

nalazi u jezgri, integraza započinje svoje djelovanje. Prvo se ciklizira virusna DNA i dolazi do hidrolize fosfodiesterske okosnice na 3' kraju. Prepoznaje se određena sekvenca koja završava s citozinom i adeninom. Slobodne hidroksilne skupine na svakom 3' kraju nukleofilno napadaju DNA lance. Mjesta nukleofilnog napada na svakom lancu udaljena su nekoliko nukleotida. Novonastale praznine popune se staničnim enzimima za popravak DNA i virusni genom je ugrađen.

Ekspresija gena HIV-a dijeli se na ranu i kasnu fazu. U ranoj fazi se transkribira potpuna virusna RNA koja se cijepa na više mjesta te se iz takve mRNA sintetiziraju regulatorni proteini Tat, Rev i Nef. Nef ima više učinaka, no glavni način djelovanja je smanjenje ekspresije CD4, HLA-A, HLA-B, MHC-I i MHC-II proteina na vanjskoj strani stanične membrane. Ovime se smanjuje citotoksično djelovanje nad zaraženim stanicama i povećava stvaranje novih viriona. Tat se veže za element transaktivacijskog odgovora (TAR, engl. trans-activation response element) te potiče transkripciju virusnog genoma<sup>2,3</sup>. Ovo potiče stvaranje više Rev-a. Kada se poveća količina Rev-a u stanici do određene razine, virusna mRNA će se cijepati na jednom mjestu ili neće uopće. Rev se veže za odgovarajuće sekvence mRNA i potiče izlazak cjelovite mRNA ili mRNA koja je cijepana na jednom mjestu iz jezgre u citoplazmu. Iz mRNA koja je jednom cijepana sintetiziraju se Env poliprotein, Vif, Vpu i Vpr proteini. Iz cjelovite mRNA sintetiziraju se Gag i Gag-Pol poliproteini. Vif se veže za antivirusni stanični enzim (APOBEC-3G) i inhibira njegovo djelovanje. APOBEC-3G djeluje kao citidin-deaminaza. Cilj enzima je toliko mutirati virusnu RNA da više ne može sintetizirati funkcionalne proteine. Vpu se veže za novosintetizirani CD4 i uzrokuje razgradnju CD4 receptora u proteasomu. Time se smanjuje broj CD4 receptora na membrani zaražene stanice<sup>2,4</sup>.

Gag-Pol poliprotein cijepa se pomoću virusne proteaze. Iz njega nastaju nova reverzna transkriptaza, integraza i proteaza. Gag poliprotein se miristoilira na N-terminusu te veže na staničnu membranu koja sadrži glikoproteinski šiljak<sup>26</sup>. C-terminus interagira s ESCRT-1 (endosomski sortirajući kompleks potreban za transport) i Alix (ALG-2 (gen vezan za apoptozu 2) interagirajući protein X). Ovime se potiče pupanje i odvajanje nezrelog viriona iz stanice<sup>32</sup>. Unutar pupajućeg mjehura smješta se genomska RNA virusa zajedno sa nekoliko molekula tRNA<sup>Lys</sup>, Vpr proteina, reverzne transkriptaze i integraze. Tijekom ili nakon pupanja djelovanjem proteaze na Gag poliprotein stvore se funkcionalni proteini matriksa, protein kapside i nukleokapside. Time je nastalo zreli virion HIV-a 1 koji može inficirati drugu stanicu.

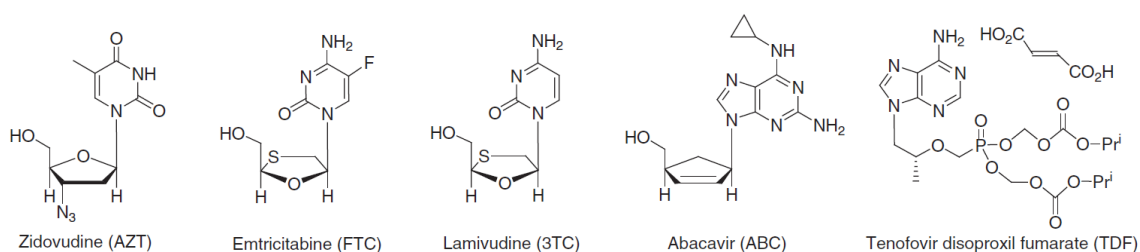


## 2.3. Antiretrovirusni lijekovi

### 2.3.1. Nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze (NRTI)

Prvi lijek koji se koristio u terapiji protiv HIV-a 1 bio je nukleozidni inhibitor reverzne transkriptaze. Reverzna transkriptaza ima DNA-polimeraznu aktivnost koja je važna u ciklusu replikacije HIV-a. Transkriptaza je prepoznata kao meta antiretrovirusne terapije protiv HIV-a 1. Strukture odabranih NRTI lijekova prikazane su na slici 10.

NRTI lijekovi analozi su nukleotida koji djeluju kao kompetitivni inhibitori reverzne transkriptaze. Strukture im se mogu opisati kao nukleotidi koji nakon ugradnje u virusnu DNA onemogućuju daljnju sintezu DNA lanca. Neki oblici modifikacija su: uklanjanje hidroksilne skupine na 3' poziciji ribofuranoznog prstena, zamjena ugljika u ribofuranoznom prstenu sumporom i modifikacija dušične baze<sup>5</sup>. NRTI lijekovi ne sadrže trifosfatnu skupinu na 5' poziciji. Unošenjem u citoplazmu dolazi do njihove aktivacije tj. fosforilacije u trifosfatni oblik pomoću staničnih kinaza. Nukleofilnim napadom 3'-OH skupine sa DNA lanca na  $\alpha$ -fosforilnu skupinu aktiviranog NRTI-ja, zaustavlja se daljnja sinteza virusne DNA. Odabrano je nekoliko lijekova koji su analozi svakog deoksinukleotida (deoksiadenilata, deoksitimidilata, deoksicitidilata i deoksigvanilata) kao primjer djelovanja NRTI lijekova.



Slika 10. Strukture odabranih nukleozidnih inhibitora reverzne transkriptaze.

Zidovudin ili azidotimidin prvi je spoj primijenjen u terapiji protiv HIV-a 1. Komercijalni naziv mu je Retrovir. Analog je deoksitimidina. U 3' poziciji umjesto hidroksilne skupine nalazi se azidna skupina. U kompeticiji je sa dTTP zbog toga što sadrže istu dušičnu bazu. Reverzna transkriptaza gotovo jednako dobro veže zidovudin-trifosfat kao i deoksitimidin-trifosfat. Međutim, fosforilacijski enzimi su vrlo slabo selektivni prema zidovudinu, pa je brzina nastajanja zidovudin-trifosfata ograničavajući faktor u djelotvornosti zidovudina<sup>33</sup>. Efektivnost zidovudina temelji se na sposobnosti reverzne transkriptaze da veže zidovudin oko 100 puta jače od stanične DNA polimeraze<sup>3</sup>. Zidovudin se može koristiti u kombinaciji s lamivudinom kao prevencija infekcije HIV-om nakon izlaganju virusu. Terapija je poznata kao postekspozicijska profilaksa<sup>2,34</sup>.

Lamivudin i emtricitabin spojevi su vrlo sličnih struktura. Sadrže oksatiolanski prsten bez hidroksilnih skupina na pozicijama 2' i 3'<sup>35</sup>. Analogi su deoksicitidina. Razlika između dva spoja je atom fluora na poziciji 5 citozinske baze emtricitabina. Prilikom razvoja i sinteze lijeka pripravljene su obje enantiomerne forme. Uočeno je da levorotatorni enantiomer lamivudina je znatno manje toksičan, dok je učinak protiv HIV-a bio jednak za oba enantiomera<sup>35</sup>. U slučaju emtricitabina, manje toksičan i učinkovitiji enantiomer protiv reverzne transkriptaze bio je levorotatorni enantiomer<sup>36</sup>. Od + i – fosforiliranih enantiomera emtricitabina i lamivudina te prirodnog dCTP najjače se veže (-)-emtricitabin-trifosfat, i to s oko 30 puta nižom konstantom disocijacije od dCTP-a<sup>37</sup>. Lamivudin i emtricitabin učinkoviti su i u terapiji protiv virusa hepatitisa B<sup>4,35</sup>.

Tenofovir je aciklični analog deoksiadenilata, pa se stoga prema nekim izvorima svrstava u nukleotidne, a ne nukleozidne inhibitore reverzne transkriptaze<sup>35</sup>. Lijek se izdaje u obliku tenofovir-alfenamida ili tenofovir-dizoproksil fumarata. Negativan naboj na fosfonatnoj skupini zamaskiran je u obliku fosfonatnog diestera (tenofovir-diizoproksil) ili fosfonoamidata (tenofovir-alfenamid). Nedostatkom negativnog naboja derivat tenofovira lakše ulazi u stanice, te jednom kada je u stanici fosfonoesterska, odnosno fosfonoamidna veza se hidrolizira te nastaje tenofovir. Tenofovir-diizoproksil fumarat *in vitro* pokazuje oko 100 puta veću aktivnost od tenofovira<sup>38</sup>. Tenofovir izbjegava nužne, često i ograničavajuće korake metabolizma tj. aktivacije NRTI lijekova, a to je prva fosforilacija. Također, dovoljno je napraviti difosfat, a ne trifosfat, da bi tenofovir uspješno inhibirao reverznu transkriptazu<sup>4</sup>.

Abacavir je analog gvanidina te sadrži zanimljive modifikacije. U ribofuranoznom prstenu je prisutna dvostruka veza između 2' i 3' ugljikovih atoma (ovakav motiv nalazi se i u stavudinu). Ističe se ciklopropilna skupina vezana za amino skupinu na poziciji 6 purinskog nukleotida. Prva reakcija u metabolizmu abacavira je fosforilacija hidroksilne skupine na 5' poziciji dihidrofuranskog prstena, dajući abacavir-monofosfat<sup>39</sup>. Deaminacijom abacavir-monofosfata nastaje karbovir-monofosfat. Gvanilat-kinazom se sintetizira difosfatni oblik, a dalje različitim enzimima trifosfatni oblik karbovira<sup>39</sup>.

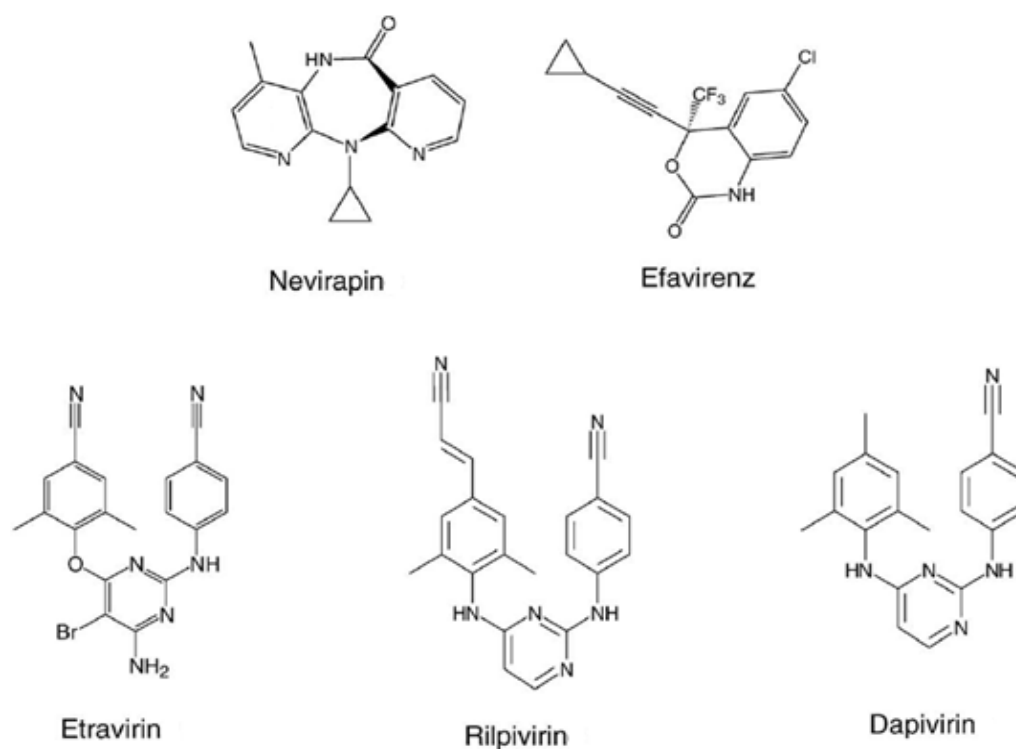
Mehanizmi rezistencije na NRTI lijekove javljaju se u 2 oblika: isključenje i izrezivanje. Primjer isključenja je mutacija M184V/I (promjena 184. aminokiseline – metionina u valin ili izoleucin)<sup>5</sup>. Mutacija u poddomeni dlana (dio polimerazne domene) mijenja interakcije između enzima i NRTI-trifosfata, te zbog steričkih smetnji onemogućuje ugradnju lijeka u DNA lanac<sup>5,40</sup>. Mutacijom M184V/I razvije se rezistentnost na lijekove lamivudin i emtricitabin.

Osim mutacije M184V/I, moguća je pojava i drugih mutacija koje uzrokuju rezistentnost na druge lijekove. Mutacije u polimeraznim poddomenama prstiju ili dlana uglavnom uzrokuju rezistenciju na NRTI lijekove po obliku isključenja. Osim steričkih smetnji, ključan čimbenik igraju međumolekulske interakcije u rezistenciji na lijekove. Mutacijama se mijenjaju vodikove veze između reverzne transkriptaze i 3'-OH skupine, što poboljšava diskriminaciju između prirodnog deoksinukleotida-trifosfata i inhibitora-trifosfata<sup>5</sup>.

Mehanizam izrezivanja podrazumijeva izrezivanje NRTI-ja koji se ugradio u DNA lanac. Rezistentnost se razvije pojavom više mutacija u polimeraznoj domeni koje omogućuju enzimu da izreže inhibitor iz lanca. *In vivo* koristi se ATP kao donor pirofosfata čime se izreže ugrađeni inhibitor. Zapravo, dogodi se reakcija obrnuta od ugradnje inhibitora u DNA lanac. *In vitro* može se koristiti sami pirofosfat ili ATP kao donor pirofosfata<sup>41</sup>. Prvi proučeni primjer rezistencije mehanizmom izrezivanja je rezistencija na zidovudin. Potrebno je nekoliko mutacija za ovaj oblik rezistencije (M41L, D67N, K70R, T215Y/F i K219E/Q)<sup>41</sup>. Zanimljivo je to da ovakvim mutacijama ne dolazi do otpornosti na druge lijekove, nego samo zidovudin<sup>5</sup>. Zidovudin se može preferencijalno izrezati zbog svoje azidne skupine. Ona onemogućuje pravilno smještanje nadolazećeg dNTP-a, čime se destabilizira zatvoreni kompleks transkriptaze, DNA i dNTP-a<sup>41</sup>. Ugrađeni zidovudin bliže je aktivnom mjestu čime je olakšano izrezivanje iz DNA lanca.

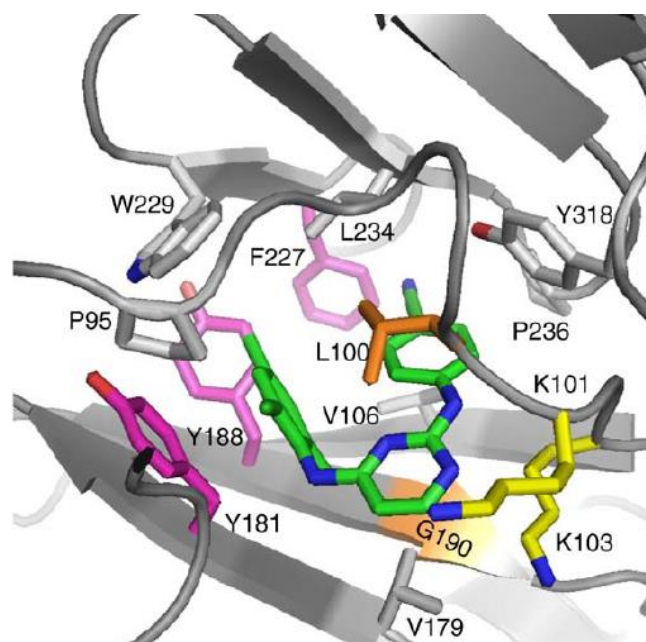
### 2.3.2. Nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze (NNRTI)

Nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze djeluju kao alosterički inhibitori reverzne transkriptaze<sup>4</sup>. Vežu se u hidrofobni džep u blizini polimerazne domene. Hidrofobni džep nije prisutan u strukturi reverzne transkriptaze ukoliko NNRTI nije vezan za enzim<sup>5</sup>. Iako su NNRTI inhibitori vrlo raznoliki u strukturi, svi se vežu u isti džep<sup>42</sup>. Strukture NNRTI lijekova prikazane su na slici 11. Jednom kada je NNRTI smješten u džep, dolazi do konformacijskih promjena u domeni u kojoj se veže klica. Time se onemogućuje pravilno smještanje klice i nukleotida-trifosfata za polimerizaciju. Inhibitori se vežu na p66 podjedinicu. Još jedna važna konformacijska promjena je ona koja mijenja položaje karboksilata koji koordiniraju s metalnim kationom. S obzirom da je kation nužan za pravilno djelovanje reverzne transkriptaze, promjenom koordinacije također se inhibira reverzna transkripcija. NNRTI onemogućuju spuštanje  $\beta$ 9- $\beta$ 10 petlje s YMDD motivom, čime se utječe i na translokaciju DNA nakon ugrađivanja novog nukleotida<sup>5</sup>.



Slika 11. NNRTI lijekovi prve i druge generacije (prvi red) i treće generacije (drugi red).

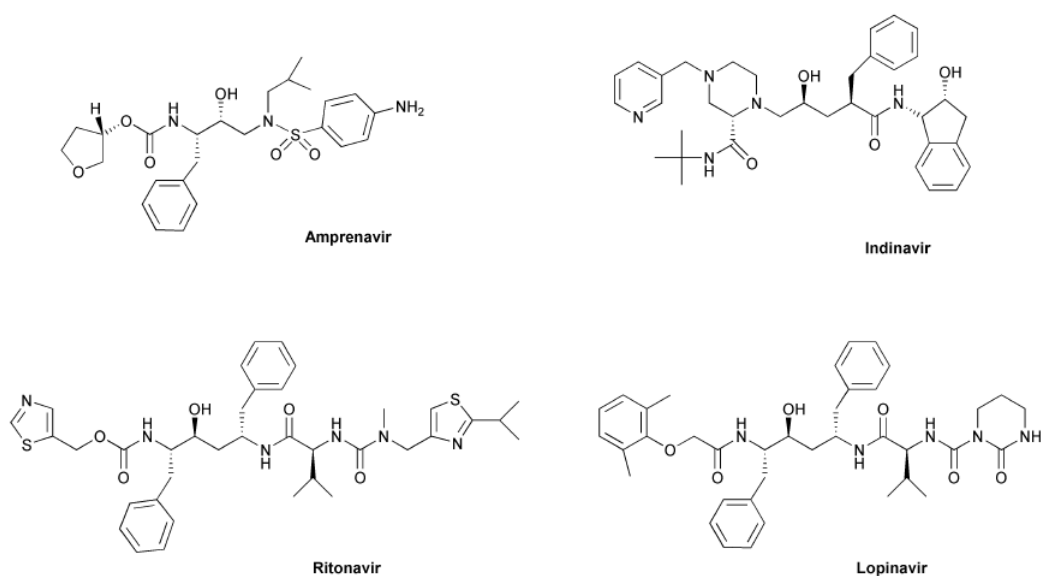
Iako su strukture nenukleozidnih inhibitora raznolike, mehanizam djelovanja inhibitora je isti. Prvi odobreni nenukleozidni inhibitor bio je nevirapin<sup>35</sup>. Smještanjem nevirapina u hidrofobni džep pomiču se palac i prst polimerazne domene čime se destabilizira interakcija s DNA lancem<sup>43</sup>. Mehanizam djelovanja je prethodno opisan. Razvijeni su inhibitori druge (efavirenz) i treće generacije (etravirin). Najčešće mutacije koje uzrokuju rezistenciju na nenukleozidne inhibitore reverzne transkriptaze su K103N i Y181C. Rezistencija se brzo razvije na lijekove prve i druge generacije, dok lijekovi treće generacije mogu djelovati i s par razvijenih mutacija<sup>5</sup>. Nenukleozidni inhibitori sadrže aromatske prstene koji interagiraju s određenim hidrofobnim ograncima. Mutacijom tih aminokiselina gube se ključne interakcije enzima s prvom generacijom inhibitora. Noviji lijekovi uzimaju mutacije u obzir te im je omogućeno prilagođavanje kojim se interakcije izgubljene mutacijom kompenziraju drugima. Primjer ovakvog inhibitora je rilpivirin i spojevi slične strukture<sup>5,44</sup>. Na slici 12 prikazana je struktura dapivirina unutar hidrofobnog džepa reverzne transkriptaze.



Slika 12. Struktura hidrofobnog džepa reverzne transkriptaze u kojem je smješten inhibitor dapivirin. Ljubičastom bojom označeni su ogranci aminokiselina koje su sklone mutacijama. Slika preuzeta iz ref. 5.

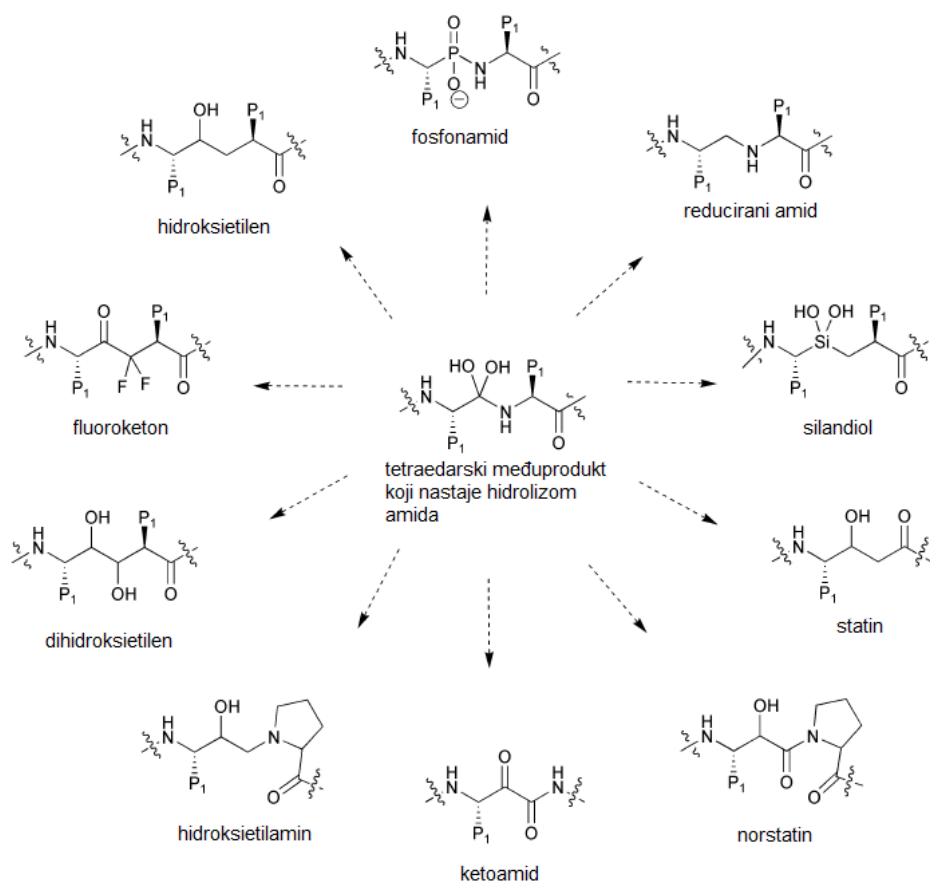
### 2.3.3. Inhibitori proteaze

Proteaza je važna za cijepanje Gag i Gag-Pol proteina dajući funkcionalne virusne proteine i enzime. Aktivno mjesto proteaze pokriveno je dvama  $\beta$ -ukosnicama<sup>45</sup>. Pomicanjem ukosnica omogućuje se prolaz supstrata do aktivnog mjesta proteaze. Proteaza katalizira nukleofilni napad vode na karbonilnu skupinu peptidne veze stvarajući tetraedarski intermedijar. Slijedi raspad intermedijara i nastaju peptidi sa slobodnom karboksilnom i amino skupinom. Zbog važne uloge proteaze u sazrijevanju viriona HIV-a, razvijeni su mnogi inhibitori proteaze. Uvođenje kombinacija inhibitora proteaze zajedno sa inhibitorima reverzne transkriptaze bilo je ključan potez u borbi protiv HIV-a<sup>9</sup>. Strukture nekih inhibitora proteaze virusa HIV-a prikazane su na slici 13.



Slika 13. Strukture nekih inhibitora proteaze virusa HIV-a 1.

Inhibitori proteaze razvijeni su iz prehodnog znanja struktura sličnih aspartil-proteaza i njihovih inhibitora<sup>35</sup>. Strukture inhibitora proteaze temelje se na zamjeni amidne skupine iz Gag ili Gag-Pol koja će biti hidrolizirana s motivom koji se ne može hidrolizirati (izoster). Izoster po svojoj geometriji oponaša prijelazno stanje, čijim se vezanjem inhibira proteoliza. Na slici 14 prikazane su strukture različitih izostera. Najčešći izoster je hidroksietilamino ili hidroksietilamido motiv. Primjeri inhibitora proteaze s takvom izosterom su lopinavir, amprenavir, sakvinavir, ritonavir indinavir i dr<sup>45</sup>. Proteaza može hidrolizirati peptidnu vezu između fenilalanina i prolina<sup>9,45</sup>. U sakvinaviru je prolinski prsten zamijenjen s dekahidroizokinolin-3-karbonilnim motivom. Ritonavir je originalno razvijen kao inhibitor proteaze, međutim otkriveno je da snažan inhibitor citokroma P450<sup>46</sup>. Zbog ovog djelovanja koristi se za povećavanje količine drugih inhibitora proteaze u plazmi<sup>45</sup>. Ovime je omogućeno i rjeđe unošenje inhibitora proteaze u organizam, što je poželjno pacijentima. Interakcije inhibitora i enzima temelje se na vodikovim vezama između hidroksilne skupine u izosteri i karbonilnih skupina dvaju katalitički aktivnih aspartata, Asp-25 i Asp-25'.



Slika 14. Strukture različitih mogućih izostera prijelaznog stanja. Shema preuzeta iz ref. 9.

Različiti inhibitori proteaze imaju vrlo slične strukture. Često se stvaranjem rezistencije na primjenjivani inhibitor proteaze stvori i rezistencija na mnoge druge inhibitore. Mutacijom se mijenjaju aminokiseline koje se nalazi u blizini aktivnog mjesta. Posebno su važne aminokiseline Gly-27, Asp-29, Asp-30 i Gly-48, čijim se zamjenama gubi efektivnost inhibitora<sup>45</sup>.

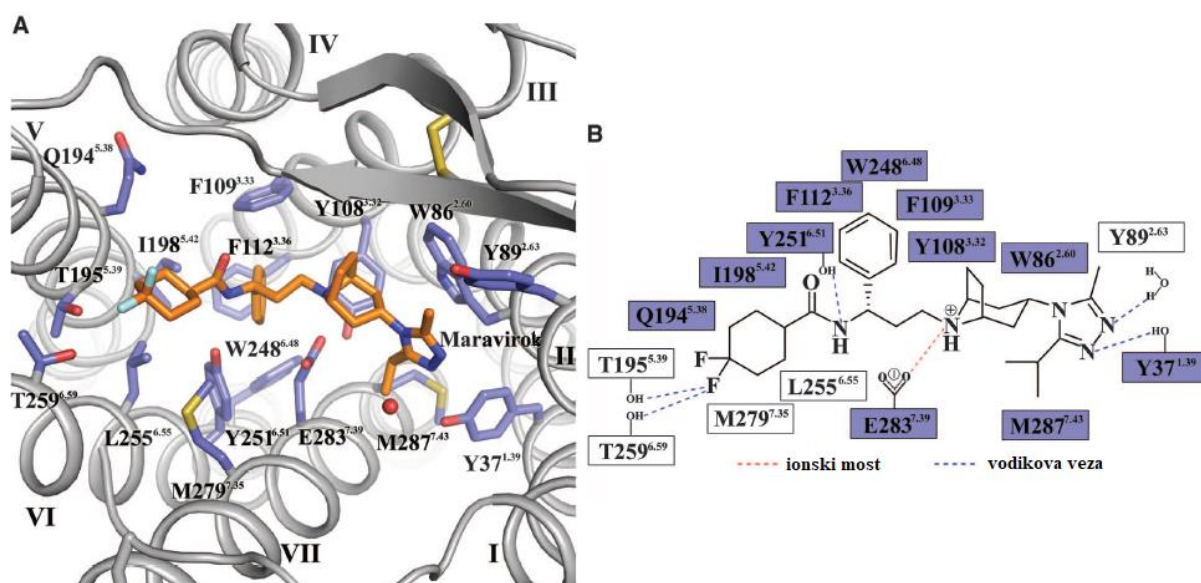
#### 2.3.4. Inhibitori fuzije i ulaska

Za ulazak kapside virusa HIV-a važna je interakcija glikoproteinskog šiljka s CD4 receptorom i CCR5 ili CXCR4 koreceptorom. Razvijeni su spojevi koji inihbiraju ove važne korake u životnom ciklusu HIV-a.

Enfurvitid je polipeptid od 36 aminokiselina koji se veže za gp41 podjedinicu šiljka HIV-a<sup>14</sup>. Prvi je razvijen kao inhibitor fuzije. Uglavnom se koristi kada se u pacijentu razvije rezistencija na prethodno korištene antiretrovirusne inhibitore, poput inhibitora proteaze i

reverzne transkriptaze<sup>47</sup>. Pretpostavlja se da enfurvitid stvara  $\alpha$ -zavojnica koja interagira s hidrofobnim zavojnica u gp41 čime se onemogućuje ugradnja zavojnica glikoproteina gp41 u staničnu membranu. Vrlo brzo dolazi do pojave rezistencije na enfurvitid, ali ne uzrokuje pojavu rezistencije na druge antiretrovirusne lijekove<sup>4,47</sup>. Od otkrića HIV-a 1 nije razvijeno mnogo inhibitora fuzije jer se oni uglavnom koriste kao posljednja opcija u terapiji protiv HIV-a, nakon što su se razviju rezistencije na druge lijekove. Razvijen je sintetički peptid nazvan CP32M. Mehanizam djelovanja temelji se na interakciji sa zavojnica u gp41 i onemogućavanju stvaranja heksahelične strukture koja omogućuje fuziju<sup>47</sup>.

Maravirok je inhibitor ulaska koji se specifično veže za CCR5 koreceptor<sup>18</sup>. Djeluje kao inverzni agonisti CCR5 koreceptora i stabilizira inaktivan oblik koreceptora. Maravirok se smješta u džep koji se nalazi između zavojnica I, II, III, V, VI i VII. Struktura maraviroka u džepu CCR5 koreceptora i međumolekulske interakcije koje stvara s koreceptorom nalaze se na slici 15. Jedna od međumolekulskih interakcija je ionski most između ogranka aminokiseline Glu-283 i protonirane amino skupine tropanskog dijela molekule. Ističu se još vodikove veze i hidrofobne interakcije između aromatskih prstenova maraviroka i koreceptora<sup>18</sup>. U kompleksu s maravirokom je promijenjena konformacija N-terminusa i druge vanstanične petlje. Promjene konformacije u CCR5 mijenjaju i oslabljuju interakciju s glikoproteinskom podjedinicom gp120, čime se inhibira ulazak HIV-a u stanicu. Rezistencija na maravirok javlja se mutiranjem u odgovarajućim petljama u gp120 ili promjenom iz M-tropnog oblika u T-tropni ili dvotropni soj koji koristi CXCR4 koreceptor<sup>4,18</sup>.



Slika 15. A) Struktura maraviroka u veznom mjestu CCR5 koreceptora. B) shematski prikaz



međumolekulskih interakcija u kompleksu CCR5-maravirok. Prisutne su vodikove veze, ionski mostovi i hidrofobne interakcije. Slika preuzeta i uređena iz ref. 18.

### 2.3.5. Inhibitori prijenosa lanca integrazom

Integracija virusne DNA u kromosom stanice domaćina važan je korak u replikaciji HIV-a 1. Relativno nedavno je započeto istraživanje i razvoj inhibitora integraze. Trenutno razvijeni inhibitori mogu se svrstati u inhibitore prijenosa lanca integrazom. U fazi razvoja su i inhibitori vezanja integraze (INBI, engl. integrase binding inhibitors)<sup>48</sup>. Integraza je dobra meta za antiretrovirusnu terapiju zato što ljudski organizam ne sadrži homologne enzime .

Dostupno je nekoliko inhibitora prijenosa lanca integraze. Neki od njih su raltegravir, biktegravir, elvitegravir i dolutegravir<sup>4</sup>. Postoje sličnosti u strukturama, poput 4-pirimidonskog motiva i halogeniranog benzenskog prstena (sadrže fluor ili klor). Raltegravir i elvitegravir su INSTI inhibitori prve generacije<sup>49</sup>. Za djelovanje integraze važna je interakcija fosfatnih skupina iz DNA sa dvovalentnim metalnim kationima ( $Mg^{2+}$  *in vivo*,  $Mg^{2+}$  ili  $Mn^{2+}$  *in vitro*) koordiniranih s aminokiselinskim ograncima integraze. Zbog koordinacije s metalnim kationima treba uzimati lijekove koji sadrže inhibitore integraze dva sata prije i šest sati nakon konzumacije pripravaka s metalnim kationima poput magnezija, kalcija, željeza i aluminija<sup>4</sup>. Raltegravir kompleksira s metalnim kationima u integrazi i onemogućuje koordinaciju fosfata s kationima, čime se onemogućuje prijenos lanaca. Također, raltegravir je 1000 puta selektivniji za integrazu nego druge fosfatidil-transferaze, poput domene Rnaze H reverzne transkriptaze<sup>50</sup>. Sličnim mehanizmom djeluje i elvitegravir koji može inhibirati i procesiranje 3' kraja DNA lanca, međutim ovaj efekt je manje značajan od inhibicije prijenosa lanca<sup>51</sup>.

Biktegravir je relativno novi inhibitor prijenosa lanca integrazom druge generacije. Kao i elvitegravir, može inhibirati i procesiranje 3' kraja DNA lanca, međutim ovakvo djelovanje je oko 30 puta slabije<sup>52</sup>. Biktegravir pokazuje učinkovitost i protiv mutiranih integraza koje su rezistentne na inhibitore prve generacije<sup>53</sup>. Dolutegravir je također inhibitor integraze druge generacije i ima sličan način djelovanja. Oba lijeka mogu djelovati i na integraze rezistentne na INSTI inhibitore prve generacije<sup>49</sup>. Međutim, pitanje je vremena kada će se pojaviti rezistencija na drugu generaciju inhibitora integraze.

Najučinkovitija terapija protiv HIV-a 1 je u obliku kombinirane terapije više različitih vrsta inhibitora, zajedno sa praćenjem viremije pacijenta tijekom terapije. Napadanjem više

virusnih enzima i proteina moguće je svesti viremiju do stanja koje se zove nemjerljivost. Kada je količina virusa u krvi (viremija) nemjerljiva, nije moguć prijenos HIV-a spolnim putem, čak i bez korištenja zaštite<sup>54</sup>. Ako pacijent ima manje od 40 kopija/ $\mu$ L, smatra se nemjerljivim. Jedan od ciljeva svjetske zdravstvene organizacije je izvesti plan 95-95-95 kroz sljedećih 10 godina. To znači da se cilja imati 95% zaraženih dijagnosticirano, 95% dijagnosticiranih na terapiji i 95% virusne supresije<sup>1</sup>.

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids> (datum pristupa 29. lipnja. 2022.)
2. N. J. Dimmock, A. J. Easton, K. N. Leppard, *Introduction to Modern Virology*, John Wiley & Sons, Chichester, 2016, str. 327–346.
3. P. R. Murray, K. S. Rosenthal, M. A. Pfaller, *Medical Microbiology*, Elsevier Inc., SAD, 2021, str. 533-549.
4. B. G. Katzung, *Basic & Clinical Pharmacology*, McGraw Hill, New York, 2018, str. 870-884.
5. S.G: Sarafianos, B. Marchand, K. Das, D. M. Himmel, M. A. Parniak, S. H. Hughes, E. Arnold, *J. Mol. Biol.* **385** (2009), 693-713.
6. S. G. Sarafianos, K. Das, C. Tantillo, A. D. Clark Jr., J. Ding, J. M. Whitcomb, P. L. Boyer, S. H. Hughes, E. Arnold, *EMBO J.* **20** (2001), 1449-1461.
7. T. W. Mak, M. E. Saunders, *The Immune Response*, Elsevier Inc., Burlington, 2006, str. 785-823.
8. I. T. Weber, J. Agniswamy, *Viruses* **1** (2009), 1110-1136.
9. A. Brik, C. H. Wong, *Org. Biomol. Chem.* **1** (2002), 5-14.
10. M. A. Navia, P. M. D. Fitzgerald, B. M. McKeever, C. T. Leu, J. C. Heimbach, W. K. Herber, I. S. Sigal, P. L. Darke, J. P. Springer, *Nature* **337** (1989), 615-620.
11. S. Zhang, A. H. Kaplan, A. Tropsha, *Proteins* **73** (2008), 742-753.
12. S. Seelmeier, H. Schmidt, V. Turk, K. von der Helm, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85** (1988), 6612-6616.
13. M. L. Gu, J. Rappaport, S. H. Leppla, *FEBS Lett.* **365** (1995), 95-97.
14. D. J. Capon, R. H. R. Ward, *Annu. Rev. Immunol.* **9** (1991) 649-678.
15. L. A. Lasky, G. Nakamura, D. H. Smith, C. Fennie, C. Shimasaki, E. Patzer, P. Berman, T. Gregory, D. J. Capon, *Cell* **50** (1987), 975-985.
16. R. Liu, W. A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S. R. Martin, R. Horuk, M. E. MacDonald, H. Stuhlmann, R. A. Koup, N. R Landau, *Cell* **86** (1996), 367-377.
17. C. B. Wilen, J. C. Tilton, R. W. Doms, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2** (2012)

18. Q. Tan, Y. Zhu, J. Li, Z. Chen, G. W. Han, I. Kufareva, T. Li, L. Ma, G. Fenalti, J. Li, W. Zhang, X. Xie, H. Yang, H. Jiang, V. Cherezov, H. Liu, R. C. Stevens, Q. Zhao, B. Wu, *Science* **341** (2013), 1387-1390.
19. A. Venuti, C. Pastori, L. Lopalco, *Front Immunol.* **8** (2017), 1-13.
20. P. K. Quashie, Y. S. Han, S. Hassaounah, T. Mespède, M. A. Wainberg, *PLoS One* **10:6** (2015)
21. D. Esposito, R. Craigie, *Adv. Virus Res.* **52** (1999), 319-333.
22. A. Engelman, Y. Liu, H. Chen, M. Farzan, F. Dyda, *Viol. J.* **71** (1997), 3507-3514.
23. O. Delelis, K. Carayon, A. Saïb, E. Deprez, J. F. Mouscadet, *Retrovirology* **5:114** (2008)
24. A. Engelman, A. B. Hickman, R. Craigie, *Viol. J.* **68** (1994), 5911-5917.
25. P. Singleton, D. Sainsbury, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Chichester, 2006, str. 371-372.
26. R. H. Ghanam, A. B. Samal, T. F. Fernandez, J. S. Saad, *Front. Microbiol.* **3:55** (2012)
27. D. Taylor, M. Durigon, H. Davis, C. Archibald, B. Konrad, D. Coombs, M. Gilbert, D. Cook, M. Kraiden, T. Wong, G. Ogilvie, *Int. J. STD AIDS* **26** (2015), 215-224.
28. N. Arhel, *Retrovirology* **7:96** (2010)
29. M. P. de Baar, K. H. M. van der Horn, J. Goudsmit, A. de Ronde, F. de Wolf, *J. Clin. Microbiol.* **37** (1999), 63-67.
30. P. Tamamis, C. A. Floudas, *Plos One* **9** (2014)
31. R. Gaudin, B. C. de Alencar, N. Arhel, P. Benaroch, *Trends Cell Biol.* **23** (2013), 652-662.
32. Y. Usami, S. Popov, E. Popova, M. Inoue, W. Weissenhorn, H. G. Göttlinger, *Biochem. Soc. Trans.* **37** (2009), 181-184.
33. P. A. Furman, J. A. Fyfe, M. H. St. Clair, K. Weinhold, J. L. Rideout, G. A. Freeman, S. N. Lehrmann, D. P. Bolognesi, S. Broder, H. Mitsuya, D. W. Barry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83** (1986), 8333-8337.
34. <https://huhiv.hr/hiv-preventivni-programi/> (datum pristupa: 15. srpnja 2022.)
35. J. B. Taylor, D. J. Trigg, *Comprehensive Medicinal Chemistry II Volume 7 : Therapeutic Areas II: Cancer, Infectious Diseases, Inflammation & Immunology and Dermatology*, Elsevier Inc., Abbott Park, 2007, str. 331-355.
36. R. F. Schinazi, A. McMillan, D. Cannon, R. Mathis, R. M. Lloyd, A. Peck, J. P. Sommadossi, M. St. Clair, J. Wilson, P. A. Furman, G. Painter, W. B. Choi, D. C. Liotta, *Antimicrob. Agents Chemother.* **36** (1992), 2423-2431.

37. J. Y. Feng, J. Shi, R. F. Schinazi, K. S. Anderson, *FASEB J* **13** (1999), 1511-1517.
38. B. L. Robbins, R. V. Srinivas, C. Kim, N. Bischofberger, A. Fridland, *Antimicrob. Agents Chemother.* **42** (1998), 612-617.
39. J. M. Barbarino, D. L. Kroetz, R. B. Altman, T. E. Klein, *Pharmacogenet. Genomics* **24** (2014), 276-282.
40. H. Huang, R. Chopra, G. L. Verdine, S. C. Harrison, *Science* **282** (1998), 1669-1675.
41. P. L. Boyer, S. G. Sarafianos, E. Arnold, S. H. Hughes, *Viol. J.* **75** (2001), 4832-4842.
42. N. G. Sharaf, R. Ishima, A. M. Gronenborn, *Biochemistry* **55** (2016), 3864-3873.
43. K. Das, S. E. Martinez, J. D. Bauman, E. Arnold, *Nat. Struc. Mol. Biol.* **19** (2012), 253-260.
44. N. Ford, J. Lee, I. Andrieux-Meyer, A. Calmy, *HIV/AIDS (Auckl.)* **3** (2011), 35-44.
45. Z. Lv, Y. Chu, Y. Wang, *HIV/AIDS (Auckl.)* **7** (2015), 95-104.
46. D. J. Kempf, K. C. Marsh, G. Kumar, A. D. Rodrigues, J. F. Dennisen, E. McDonald, M. J. Kukulka, A. Hsu, G. R. Granneman, P. A. Baroldi, E. Sun, D. Pizzuti, J. J. Plattner, D. W. Norbeck, J. M. Leonard, *Antimicrob. Agents Chemother.* **41** (1997), 654-660.
47. Y. He, J. Cheng, J. Li, J. Hu, Z. Qi, Z. Liu, S. Jiang, Q. Dai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105** (2008), 16332-16337
48. Y. S. Han, W. L. Xiao, P. K. Quashie, T. Mesplède, H. Xu, E. Deprez, O. Delelis, J. X. Pu, H. D. Sun, M. A. Wainberg, *Antivir. Res.* **98** (2013), 441-448.
49. D. E. Dow, J. A. Bartlett, *Infect Dis Ther* **3** (2014), 83-102.
50. J. F. Mouscadet, L. Tchertanov, *Eur. J. Med. Res.* **14** (2009), 5-16.
51. K. Shimura, E. N. Kodama, *Antivir. Chem. Chemother.* **20** (2009), 79-85.
52. M. Tsiang, G. S. Jones, J. Goldsmith, A. Mulato, D. Hansen, E. Kan, L. Tsai, R. A. Bam, G. Stepan, K. M. Stray, A. Niedziela-Majka, S. R. Yant, H. Yu, G. Kukolj, T. Cihlar, S. E. Lazerwith, K. L. White, H. Jin, *Antimicrob. Agents Chemother.* **60** (2016), 7086-7097.
53. S. A. Hassounah, A. Alikhani, Maureen Oliveira, S. Bharaj, R. I. Ibanescu, N. Osman, H. T. Xu, B. G. Brenner, T. Mesplède, M. A. Wainberg, *Antimicrob. Agents Chemother.* **61** (2017), 1-9.
54. <https://huhiv.hr/nemjerljiv-nezarazan/> (datum pristupa 15. srpnja 2022.)