

A HIV ENTRY MECHANIZMUS JELLEMZÉSE ANTIVIRÁLIS HATÁSÚ HAZAI  
FEJLESZTÉSŰ TIOLÁLT PYRIMIDIN SZÁRMAZÉKOKKAL

ZÁRÓJELENTÉS

2016. március

**Témavezető**

*Dr. Nagy Károly*

*(Orvosi Mikrobiológiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest)*

ELŐZMÉNYEK ÉS A HIV KUTATÁS JELENLEGI ÁLLÁSA

A human immunodeficiency vírus (HIV) fertőzés és a szerzett immunhiányos syndroma (AIDS) továbbra is súlyos egészségügyi világprobléma. A HIV vírusnak, mint az AIDS kiváltó okának több mint 30 évvel ezelőtti felismerése óta az AIDS emberek millióinak halálát okozta, naponta 6000 új fertőzés történik, és a vírus mindeddig több mint 70 millió embert fertőzött meg az ENSZ HIV/AIDS programja (UNAIDS) becslése szerint.

Az AIDS kórokának feltárása a vírus vérben való kimutatására szolgáló módszerek és olyan víruselleni gyógyszerek kifejlesztéséhez vezetett, amelyekkel lehetővé vált a vírushatás bizonyos fokú kontrollja. A terápiás célpontok és a hatékony kezelési eljárások felismerésére irányuló erőfeszítések a HIV vírus részletes jellemzését és szaporodási ciklusának jobb megértését eredményezték. Az aktív antivirális kezelés (HAART) drámai módon késleltette az AIDS kialakulását és csökkentette a HIV fertőzöttek morbiditását és mortalitását. A hosszútávú vírus ellenes kezelést azonban két tényező korlátozza: a gyógyszer rezisztens HIV törzsek megjelenése, és az a tény, hogy az eddig kifejlesztett gyógyszerek a sejten belül hatnak, amikor már a HIV vírus megfertőzte a sejteket, mivel e gyógyszerek a vírus reverz transzkriptáz (RT) és proteáz (PR) enzimjeinek inhibitorai. A HIV fertőzés kezelése a HAART során nem képes az egészséges állapotot helyreállítani. A HAART-al kezeltékben nagyobb kockázattal alakulnak ki szív-érrendszeri betegségek, és a HIV fertőzés jelentősen fokozza a vese megbetegedések, osteoporózis és nem AIDS-hez társult daganatok kialakulásának kockázatát is. A kezelés ellenére kialakuló megbetegedések, a HAART magas költségei, a szigorú gyógyszer szedési előírások betartásának nehézségei indokolják a HIV fertőzés kontrolljának új stratégiáit.

A HIV fertőzés többlépcsős folyamata, amivel belép a vírus a sejtbe számos sajátos célpontot szolgáltat a vírushozzás meggátlására: ilyenek pl. a koreceptor kötődés vagy a membrán fúzió gátolása. Az ezen a téren megvalósuló kutatás a HIV elleni gyógyszerek új csoportjának, a *HIV entry* inhibitoroknak a kifejlesztéséhez vezetett. A HIV-1 vírusnak emberi lymphocytákba való belépése több komponens együtthadását igényli, ezek a vírus burok fehérjéi (gp120 és gp 41), és a gazdasejt felszínén található elsődleges receptor a CD4 ill. másodlagos kemokin receptorok (CCR5 és CXCR4). Nemrégben egy harmadik sejt felszíni fehérje az oxidoreduktáz tulajdonságú protein diszulfid izomeráz (PDI) szerepére derült fény, amelynek szintén szerepe van a HIV sejtbe való belépésében. A HIV fertőzést számos PDI inhibitor ill. sejt felszíni tiollal reagáló anyag, mint pl. a tioredoxin befolyásolhatja, jelezve, hogy a vírushozzáskor aktív redox folyamatok lehetséges célpontjai lehetnek a HIV fertőzés gátolásának. A PDI inhibitorok azonban egyúttal befolyásolják vagy gátolják az enzim fiziológias szerepét is, ezért nem alkalmasak hatékony gyógyszerre való fejlesztésre. A HIV szaporodás korai szakaszainak részletes feltárása nemcsak új vírus ellenes gyógyszerek létrehozása szempontjából fontos, hanem a génterápia retrovirális vektorainak kifejlesztéséhez is.

A sejt felszíni receptorok térszerkezeti változása, a koreceptorok és a virális burok fehérjék mellett e fehérjék *redox változásai* is szükségesek a sikeres HIV fertőzéshez. A HIV Env szokatlanul gazdag diszulfid-kötést tartalmazó molekulákban, a vírusburok 10 diszulfid kötéséből 9 a gp120 molekulában van. A vírus és a sejt membránjának fúziója az Env-ben lévő diszulfid kötések redukciója nyomán jön létre, a *lymphocyta felszíni reduktáz* enzim hatására. Az Env-en belüli redox változások szerepét a vírus – sejt (HIV – lymphocyta) kapcsolódásban az a megfigyelés is alátámasztja, hogy a receptor kötő hely szokatlanul sűrű diszulfid kötéseket tartalmaz. Ezek a sejt felszínen mozaikszerűen elhelyezkedő ún. lipid tutajokban halmozódnak. A vírushozzás során aktiválódó redox folyamatok lehetséges célpontjai a HIV fertőzés kezelésének.

A biológiai membránok burkos vírusok sejtbe való belépéséhez szükséges fúziója lépcsőzetes sejt folyamatok eredménye. A HIV esetében a membrán fúziót a burok glykoprotein trimereknek a célsejt membránján lévő megfelelő receptor molekulákhoz való kötődése indítja el.

A HIV entry inhibitorok alkalmazása nagyon hasznos kezelési stratégiát jelentenek: meggátolják a vírusnak a célsejtbe való belépését, ezáltal megelőzik a *de novo* vírus fertőzést, korlátozzák a vírus genom integrációját és az azt követő vírus kiáramlást a fertőzött sejtől. A klinikai használatban is engedélyezett ilyen gyógyszer a *maraviroc*, amely a CCR5 kemokin

koreceptor térszerkezetét változtatja meg, a *plerixafor* (amely mellékhatása a csontvelői sejtek homing-jának befolyásolása), és az eddigi egyetlen FDA által engedélyezett *enfuvitide* (T20), amely a membrán fúzióhoz szükséges virális gp41 helix kialakulását gátolja. Azonban mindezek csak parenterálisan használhatók, és velük szemben már kialakultak rezisztens vírus mutánsok.

## A KUTATÁS MEGALAPOZOTTSÁGA

A fentiekben leírtak minden kétséget kizáróan alátámasztják, hogy nagy szükség van olyan modern kutatásokra, amelyek részleteiben tisztázzák az elsődleges HIV fertőzés molekuláris mechanizmusait *in vitro*, a vírus – sejt kapcsolat részleteit annak érdekében, hogy új célpontokat tárjunk fel a még hatásosabb HIV elleni stratégiák számára.

## CÉLKITŰZÉSEK

Az AIDS és human retrovírus laboratóriumunk hosszú távú kutató programja a vírus – sejt kapcsolat tanulmányozása HIV modellen. A jelen OTKA kutatásokat korábbi jelentős nemzetközi eredményeinkre alapoztuk. Ezek röviden: elsőként írtuk le hogy emberi retrovírusok képesek syntitium-képzésre fogékony sejtekben (Nagy K, 1983), és nem-lymphoid sejteket is fertőznek (Clapham et al. 1983). Elsőként izoláltuk a HIV vírusát magyar fertőzöttekből (Nagy 1988), meghatároztuk a hazai domináns HIV altípusokat (Nagy K. 1996), jellemeztük az itt előforduló gyógyszer-rezisztens genetikai vírus variánsokat (Juhász E. 2008), a proteáz inhibitor *saquinavir* vírus elleni hatását (Nagy K 1994), és bizonyítottuk a HIV proteáz szerepét a HIV korai replikációs fázisában (Nagy K. 1994).

A HIV fertőzés korai lépései – a vírusnak a sejtbe való belépése, a receptor kötődés mechanizmusa, a térszerkezeti változások, a membrán fúzió – még mindig nem ismertek kellőképpen.

Ebben az OTKA által támogatott kutatásban a szerves szintetikus kémia, a sejtbiológia és a molekuláris virológia szakértőiből álló munkacsoportot hoztunk létre két vezető hazai orvosegyetem munkatársaiból. Korábbi kutatómunkánk folytatásaként célul tűztük ki a vírus – sejt kapcsolat, a HIV fertőzés korai molekuláris eseményeinek, a HIV entry alternatív redox mechanizmusainak jellemzését az általunk kifejlesztett tiolált pyrimidin nukleotidok: a 35-mer 4-thio-deoxyuridylate ( $s^4dU$ )<sub>35</sub> vagy Suligovir©, a 4-thio-uridylate ( $s^4UMP$ ) vagy UD29 és hat új támadáspontú derivátum felhasználásával. E vegyületeknek a sejtfelszíni diszulfid kötések módosító, a HIV fertőzés elemi fázisát képező folyamataira való hatásának vizsgálatára specifikus *in vitro* quantitative HIV fertőzési módszereket, az eredményes HIV

fertőzéshez CCR5 és/vagy CXCR4 koreceptorokat használó egyedülálló rekombináns HIV pszeudovirionokat fejlesztettünk ki és alkalmaztunk.

## ANYAGOK

Erdeti új vegyületként általunk szintetizált poly thiolált pyrimidine nukleotidokat állítottunk elő, és használtuk a kísérletek folyamán. Ezek: 4-thio-deoxyuridylate ( $s^4dU$ )<sub>35</sub>, 4-thio-uridylate ( $s^4UMP$ ) vagy UD29 és további 6, új támadáspontú pyrimidine derivátum (UD30, UD31, UD29-new, MOD-94, MOD-2012 és DS53). Szintézisük és kémiai szerkezetük általános leírása megtalálható a publikált cikkekben, de előállításuk részleteit szabadalmi okokból nem közölhettük.

## ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

A kísérleteink során alkalmazott módszerek részleteit a publikált cikkek tartalmazzák.

**Sejtbiológiai módszerek:** a következő modern sejtbiológiai módszereket használtuk: *in vitro* HIV-1 fertőzési eljárások, szincícium indukciós/inhibíciós assayk, MAGI-assay (*multinuclear activation of galactosidase inhibition*) a HIV replikáció egyetlen ciklusának tanulmányozására alkalmas rekombináns HeLa sejtekkel, amelyek human CD4-et expresszálnak, és HIV-1 LTR és  $\beta$ -galactosidase génekkel vannak transzfektálva (HeLaCD4- LTR/ $\beta$ -gal cells)(Nagy K 1994), kvantitatív HIV-1 p24 ELISA, XTT akut és krónikus cytotoxicitási assay, amely a mitokondriális dehydrogenáz aktivitás alapján határozza meg a sejt viabilitást.

**Expressziós plasmidok:** lentivirális expressziós plasmidokat készítettünk amelyek *i.)* a HIV koreceptor (CCR5, vagy CXCR4 vagy mindkettő) preferenciát meghatározó HIV Env géneket tartalmazzák, *ii.)* defektív HIV *gag-pol* géneket tartalmazzák LTR szekvenciák között, ill. a detektáláshoz szükséges riporter géneket (luciferáz, zöld fluoreszcens protein /GFP/,  $\beta$ -galactosidase).

**Molekuláris virológiai módszerek:** Különleges molekuláris virológiai eljárásokkal HIV-1 pseudovirionokat hoztunk létre plazmid transzfekciókkal, amelyek fertőző, de replikációra képtelen defektív vírusokat eredményeztek, amelyek alkalmasak a HIV-1 entry mechanizmus elemzésére.

**Biostatistikai eljárások**at alkalmaztunk a kísérleti vegyületeink gátló IC<sub>50</sub> és IC<sub>90</sub> értékeinek meghatározására. E mellett a *Hill analízist* és *Student* tesztet használtunk.

**Biztonsági előírások:** a potenciálisan veszélyes fertőző anyagokra, DNS kezelésre vonatkozó biztonsági előírásokat szigorúan betartottuk. Ilyen anyagok kezelésére laboratóriumunknak érvényes engedélye van.

## EREDMÉNYEK

OTKA kutatási eredményeinket 28 prezentációban foglaltuk össze és ismertettük angol és magyar nyelven. Négy eredeti tudományos közleményt publikáltunk, mind angol nyelven, amelyek impakt faktora IF: 6.149. Ezekben ismertettük kísérleteink részleteit ill. az elért kutatási eredményeket, felismeréseket.(Ld. az OTKA honlapon). Tudományos szaklapokban három kontinens nemzetközi konferenciáin előadott 12 absztrakt került publikálásra. Tizenegy további összefoglaló (6 angol, 5 magyar nyelven) konferencia kiadványként került közlésre. Egy un. edited work japán kooperációban ( Saitame Egyetem) készült.

Fontos megjegyezni, hogy kutatásaink eredményeiből egy PhD dolgozat készült: *A human immunodeficiencia vírus korai replikációs ciklusának molekuláris elemzése* címmel, amelyet OTKA programunk egyik munkatársa (K.Sz) készített a Semmelweis Egyetem Pathológiai Doktori iskolájának 8/3 Mikrobiológia Programján belül.

Abból a célból, hogy nemzetközi szinten, független laboratóriumok is ellenőrizzék eredményeinket, néhány thiolált pyrimidin vegyületünket kiküldtük (szigorú titoktartási kötelezettség mellett) a hasonló HIV antivirális vegyületek tesztelésében és értékelésében világszerte elismert *Southern Research Institute*-ba (431 Aviation Way, Frederick, Maryland, USA), akik hivatalosan megerősítették kísérleti molekuláink potens *in vitro* antivirális aktivitását a primer HIV fertőzésre. Ez a megerősítés további lendületet adott azon terveinknek, hogy érdemes lenne e vegyületekre, vagy ezek egyikére szabadalmi oltalmat szerezni.

A Magyar Tudományos Akadémia által szervezett 7. World Science Forum (Budapest, 2015) „Microbes and Society” szekciójában lehetőséget kaptunk kutatómunkánk ismertetésére.

Fontosabb kutatási eredményeinket a III. Nemzeti AIDS Konferencián is ismertettük, amelyet az EMMI Egészségügyi Államtitkársága Nemzeti AIDS Bizottsága ill. a László Kórház és az Országos Epidemiológiai Központ szervezett Budapesten 2015.-ben.

A témavezető (N.K.) számos alkalommal nyilatkozott az írott és elektronikus sajtóban napi- és hetilapokban, rádió és TV csatornáknak, népszerűsítve kutatási témánkat.

## A LEGFONTOSABB EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- 1.) Nyolc, eredeti thiolált pyrimidin vegyület került szintézisre és nagyobb mennyiségben előállításra, amelyek bizonyos fokú antivirális aktivitással rendelkeznek a primer HIV fertőzés gátlására *in vitro*. Ezek poly-thiolál, hosszú láncú molekulák, amelyek nem képesek bejutni a sejtbe. Az egyes újabb vegyületek azután kerültek szintézisre, miután a megelőzőeket sejt- és molekuláris biológiai tesztekben jellemeztük, ami lehetőséget adott arra, hogy az újabb vegyületeket a közben kapott eredmények figyelembe vételével módosíthattuk.
- 2.) A thiolált pyrimidin derivátumok CD4 molekulán való kötőhelyének modifikálásával a HIV vírus sejtbe való belépése (entry) gátlásának új megközelítését írtuk le.
- 3.) A HIV entry mechanizmus *in vitro* vizsgálata során kísérletes bizonyítékot szolgáltatunk arra vonatkozóan, hogy a thiolált vegyületek, különösen azok enol formái reaktív –SH csoportokat tartalmaznak, amelyek gátolják a glyceraldehyde-phosphate dehidrogenázt (GAPDH). A fehérjék alapvető –SH csoportjai funkcióinak megváltoztatásával a használt vegyületeink a PDI gátlóktól eltérő módon lépnek kölcsönhatásba a sejt felszíni thiol/disulfide folyamatokkal.
- 4.) Eredményeink arra utalnak, hogy e kéntartalmú pyrimidin molekulák a sejt felszíni redoxaktív -SH csoportokkal ill. a HIV burok gp120 fehérje –SH molekuláival lépnek kölcsönhatásba, amelyek elengedhetetlenek az eredményes HIV fertőzés (entry) szempontjából.

- 5.) Olyan sejtbiológiai eljárásokat dolgoztunk ki, ill. alkalmaztunk, mint pl. a szincícium indukció/gátlás és a MAGI assay amelyek lehetővé teszik a HIV fertőzést gátló anyagok kvantitatív meghatározását a vírus fertőzés egyszeri ciklusában.
- 6.) Különböző kemokin receptor preferenciával rendelkező HIV pszeudovirionokat állítottunk elő amelyek a fertőzés kvantitatív meghatározására ún. riporter géneket hordoznak.
- 7.) Antivirális aktivitású thiolált pyrimidin vegyületeket alkalmazásával megerősítettük, ill. új megvilágításba helyeztük a sejt felszíni lipid tutajok (raft) szerepét az elsődleges HIV fertőzésben *in vitro* és a HIV sejtbe való belépése során.
- 8.) Kísérletesen bizonyítottuk, hogy az alkalmazott thiolált pyrimidinek eltérő gátló hatással rendelkeznek a különböző koreceptor preferenciájú HIV pszeudotípusok fitnessére és fertőzőképességére. Ez egy lényeges felismerés, mivel a HIV fertőzések döntő többségét a CCR5 receptort használó makrofág tróp HIV-1 törzsek okozzák.
- 9.) A thiolált vegyületek HIV-1 fertőzést gátló hatása *in vitro* szelektív a H9 lymphoid sejtekre, összehasonlítva a MAGI monolayer sejtekkel.
- 10.) Végezetül kutatási projektünk eredményeként kísérleti bizonyítékokat szolgáltatunk arra vonatkozólag, hogy a thiolált pyrimidin derivátumok, - elsősorban a **DS53** – képesek *in vitro* meggátolni az elsődleges HIV-1<sub>III<sub>B</sub></sub> fertőzést, a CCR5, CXCR4 vagy mindkét koreceptort használó HIV pszeudovirionnal való fertőzést, és a vírus indukálta sejtfüziót. A DS53 alacsony toxicitású, HIV-1 elleni antivirális koncentrációja IC<sub>50</sub> 0.75 μM a sejtfüzió meggátlására és IC<sub>50</sub> 0.6 μM a vírus sejtbe lépésének (entry) gátlására. Vírusgátló hatása új támadásponton alapul és ennek megfelelően a HIV entry inhibitorok lehetséges új csoportját képviseli, amely felhasználás esetén hozzájárulhat a HIV/AIDS még hatékonyabb kezeléséhez.

## Irodalom

1. Clapham, P., **K. Nagy**, R. Cheingsong-Popov, M. Exley, and R.A. Weiss (1983): Productive infection and cell-free transmission of human T-cell leukemia virus in a non-lymphoid cell line. *Science* 222: 1125-1127
2. **Nagy K.**, Young M., Baboonian C., Merson J., Whittle P., Oroszlan S. (1994) Antiviral activity of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors in a single cycle of infection: evidence for a role of protease in the early phase *J.Virol* 68:757-765
3. Juhász E, **Ghidán A**, Kemény B, **Nagy K.** (2008): Emergence of antiretroviral drug resistance in therapy-naive HIV infected patients in Hungary *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 55(4):383-394
4. **Kanizsai Sz.**, Juhász E., **Ghidán Á.**, **Aradi J**, **Nagy K.** (2009): Antiretroviral effect of poly-thiolated compounds as HIV entry inhibitors *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 56(3) Suppl. 2nd CEFORM, p.57.
5. **Nagy K.**, P. Clapham, R. Cheingsong-Popov, and R.A. Weiss (1983). Human-T-cell leukemia virus type I: Induction of syncytia and inhibition by patients' sera. *Int. J. Cancer* 32: 321-328
6. **Nagy K.**, J. Albert, and D. Bánhegyi (1988) Isolation of HIV from Hungarian AIDS and ARC patients (in Hungarian) *Laboratóriumi Diagnosztika* XV/4: 213-216.
7. **Nagy K.**, Young M., Baboonian C., Merson J., Whittle P., Oroszlan S. (1994) Antiviral activity of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors in a single cycle of infection: evidence for a role of protease in the early phase *J.Virol* 68:757-765
8. **Nagy K.**, Barabás É., Várkonyi V., Horváth A. (1996) Determination of HIV-1 subtype in Hungary by synthetic peptides representing the V3 loop of *env* *Pathol.Oncol.Res.* 2:268-271
9. Beck, Z., Kis, A., Berenyi, E., Kovacs, P., Fesüs, L., **Aradi, J.** (2009): 4-Thio-uridylylate (UD29) interferes with the function of protein –SH and inhibits HIV replication in vitro. *Pharmacol Reports* 61, 343–347
10. **Kanizsai S**, **Ongrádi J**, **Aradi J**, **Nagy K** (2014) Thiolated pyrimidine derivatives may interfere thiol groups concentrated at lipid rafts of HIV-infected cells. *Acta Microbiol Immunol Hung* 61(4):447–458
11. **Kanizsai S**, **Ghidán A**, **Ongrádi J**, **Nagy K** (2012) Antiretroviral effect of 4-thio-uridylylate against human immunodeficiency virus type. *Acta Microbiol Immunol Hung* 59(4):499–510
12. **Kanizsai Sz.**, **Ongrádi J.**, **Aradi J.**, **Nagy K.** (2016): New approach for inhibition of HIV entry: modifying CD4 binding sites by thiolated pyrimidine derivatives *Pathol Oncol Res.* 22(3) DOI 10.1007/s12253-016-004-y



CHARACTERIZATION OF HIV ENTRY MECHANISM BY THIOLATED PYRIMIDINE  
DERIVATIVES WITH ANTIVIRAL ACTIVITY

**FINAL REPORT**

March, 2016

**Principal investigator**

*Károly Nagy*

*(Institute of Medical Microbiology, Semmelweis University, Budapest)*

BACKGROUND AND STATE-OF-THE-ART OF HIV

Human immunodeficiency virus (HIV) infection and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) are still serious public health issues worldwide. Since the identification of HIV as etiologic agent of AIDS more than three decades ago, AIDS has killed millions of people, every day 6.000 new infections occur, and the virus infected so far more than 70 million people as estimated by the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS).

The discovery of the cause of AIDS led not only to the development of assays detecting the virus in blood samples, but also antiretroviral compounds for keeping the virus infection under certain control. The effort to identify therapeutic targets and develop effective treatment has led to extensive characterization of HIV and a better understanding of its replication cycle. The highly active antiretroviral therapy (HAART) has dramatically delayed the progression to AIDS and reduced morbidity and mortality of patients infected by HIV-1. The long-term effectiveness of antiretroviral treatment, however has been limited by two factors: the emergence of drug resistant HIV strains, and that the drugs developed so far acted only while the virus already infected the cells being inhibitors of the virally coded enzymes such as reverse transcriptase (RT), and protease (PR). Control of HIV infection by HAART, does not completely restore health. Patients on HAART remain at increased risk of developing cardiovascular disease, and HIV infection significantly increases the risk of developing kidney disease, osteoporosis, and a number of non-AIDS defining malignancies. These HIV-associated morbidities that persist despite treatment, the high cost of HAART, and the

requirement for daily adherence to HAART to control infection, all underline the need for new strategies to control HIV infection.

The multi-step process by which HIV enters cells provides a series unique targets for interventions to prevent viral entry, including receptor and coreceptor binding and membrane fusion. Efforts to prevent these steps have led to discovery of new class of anti-HIV drugs: the *HIV entry inhibitors*. Entry of HIV-1 into human lymphoid cells requires the cooperation of the viral envelope glycoproteins gp120 and gp41, and of two host-cell proteins, the primary receptor CD4 and chemokine coreceptors such as CCR5 or CXCR4. More recently a third cell-surface protein the oxidoreductase *protein disulfide isomerase* (PDI) was found to play a critical role in HIV-entry. Several inhibitors of PDI as well as cell-surface-thiol interacting agents including thioredoxin, influence HIV infection indicating that *redox processes* active in viral entry could be potential targets for treatment of HIV infection . PDI inhibitors however modify or block physiological role of the enzyme, so are not suitable to develop to effective entry inhibitor drugs.

Fully elucidating the early steps of HIV replication is crucial not only for identifying new antiretroviral drugs, but also for improving the design of retroviral vectors for gene therapy. In addition to conformational changes in cell surface receptors, coreceptors of HIV and viral envelope proteins, *redox changes* in these proteins are also required for successful HIV-1 entry and infection. HIV Env has an unusually high amount of disulfide-bonded molecule with 9 out of a total of 10 disulfide bonds occurring within the outer viral membrane domain of gp120. Viral and cell membrane fusion are enabled by the reduction of disulfide bonds of Env by a lymphocyte surface-associated reductase activity. The involvement of redox changes of Env as part of the HIV-lymphocyte interaction is supported by the observation that an unusually dense cluster of disulfide bonds occurs close to the receptor binding surfaces. They concentrate on lipid rafts of the cell membrane, as we and others reported earlier .Redox processes active in viral entry could be potential targets for treatment of HIV infection.

Fusion of biological membranes, as required for entry of enveloped viruses, occurs in sequences of cellular processes. In the case of HIV, fusion is induced by envelope glycoprotein trimers upon interaction with adequate receptor molecules on the target cell membrane. HIV entry inhibitors are desirable therapeutic approaches that block virus from entering target cells and thereby prevent *de novo* infections and also limit both viral integration and subsequent viral spread in the already infected host. HIV-1 entry inhibitor

licensed for clinical use is *maraviroc* which alter conformation of the CCR5, CXCR4 antagonist *plerixafor* (influencing bone marrow cell homing as side effect), and the only FDA-approved HIV fusion inhibitor *enfuvirtide (T20)*, preventing the formation of the gp41 six-helix bundle required for membrane fusion. However they are not orally bioavailable, and viral variants to all entry inhibitors have already been identified.

## VERIFICATION OF THE RESEARCH

All these factors above drive efforts to perform advanced research to clarify the molecular steps of primary HIV infection *in vitro*, the virus-cell interactions in details, in order to develop more effective anti-HIV interventions *in vivo* with novel targeting.

## AIMS

The research program of our AIDS and Human retrovirus laboratory has been studying virus-cell interactions on HIV models. We reported firstly, that a human retrovirus is capable inducing syncytia in susceptible cells (Nagy K 1983), and able to infect non-lymphoid cells (Clapham1983). We isolated firstly HIV from Hungarian patients (NagyK1988), determined dominant HIV subtypes (Nagy K 1996), characteristics of HIV drug resistance in our country (Juhász2008), the antiviral effect of a protease inhibitor, *saquinavir* (Nagy K 1994) and provided evidence for a role of protease in early phase of HIV infection (Nagy K 1994). Early steps of HIV infection - HIV entry, the mechanism of receptor binding, conformational changes and fusion – however, are not yet opened up in details. The cell-surface thiol-containing molecules other than PDI, acting alone, or in concert may have a greater effect on HIV-1 Env-mediated fusion.

In this Research supported by OTKA, we formed a team of experts of organic synthetic chemists, cellular biologists and molecular virologists of two leading medical universities of Hungary. As a continuation of our research program, we aimed to characterize virus-cell interactions, early events of HIV infection, alternative redox mechanisms involving HIV entry by using two thiolated oligonucleotides developed by us: a 35-mer 4-thio-deoxyuridylate ( $s^4dU$ )<sub>35</sub> or Suligovir©, and 4-thio-uridylate ( $s^4UMP$ ) or UD29 and 6 of their derivatives with novel targets - based on their modifying effect on redox changes during cell surface disulfide exchange processes - in specific *in vitro* HIV infectivity assays using unique recombinant HIV-1 viral pseudotypes utilizing CCR5 or CXCR4 or both of the cellular coreceptors for entry.

## MATERIALS

Poly- thiolated oligonucleotides as original compounds synthesized and developed by us such as a 35-mer 4-thio-deoxyuridylate (s<sup>4</sup>dU)<sub>35</sub>, 4-thio-uridylate (s<sup>4</sup>UMP) or UD29 and further 6 new pyrimidine derivatives (designated UD30,UD31,UD29-new,MOD-94, MOD-2012 and DS53) have been prepared and used throughout our experiments. Information about their synthesis and chemical structures can be found in our research papers, but details of the preparations were not published because of possible *patent submission*.

## METHODS

The details of the methods used can be found in our published papers and other communications. For short:

***Cellular biological methods:*** We were using state-of-the-art cellular biological methods such as *in vitro* HIV-1 infectivity assays; syncytium induction and inhibition assays; multinuclear activation of galactosidase inhibition (MAGI) assay with recombinant HeLa cells expressing human CD4, transfected with HIV-1 LTR and  $\beta$ -galactosidase gene (HeLaCD4- LTR/ $\beta$ -gal cells) (Nagy K. 1994), allowing single cycle of HIV-1 replication; quantitative HIV-1 p24 ELISAs; XTT assay measuring acute and chronic cytotoxicity based on spectrophotometric measurements of cell viability on mitochondrial *dehydrogenase* activity in living cells.

***Expression plasmids:*** We prepared lentiviral expression plasmids containing *i.*) genes encoding various HIV Env glycoproteins determining HIV coreceptor (CCR5 or CXCR4 or both) preferences, and *ii.*) plasmids with defective HIV *gag-pol* genes between LTR sequences which contain reporter genes such as *firefly luciferase*, green fluorescent (GFP) protein or  $\beta$ -galactosidase respectively.

***Molecular virological methods:*** By ingenious molecular virological methods HIV-1 *pseudotype viruses* have been prepared by plasmid transfections which resulted infectious but replication defective virions suitable to analyze HIV-1 entry mechanism into cells.

***Biostatistical methods*** for the determination of inhibitory concentrations IC<sub>50</sub> and IC<sub>90</sub> values of thiolated compounds Hill analysis and two-tailed Student's test were used.

All the ***biological safety instructions*** for handling potential hazardous agents or DNA have been strictly kept. Our lab has all the necessary permissions and certificates allowing handling such materials.

## RESULTS

Results of our OTKA research have been summarized in 28 presentations in English and Hungarian languages. We prepared 4 original research papers, all in English, with a cumulative IF of 6.149, where all of the details of our research, results and discoveries had been published. (See OTKA report website). Twelve abstracts of research work presented at international scientific conferences of three continents had been published in relevant research papers and periodicals. Eleven abstracts were published in Conference proceedings ( 6 in English and 5 in Hungarian). We had one Edited Work ( in cooperation with Saitame University, Japan).

Moreover our research resulted a PhD Thesis entitled: *Molecular analysis of the early replication cycle of Human immunodeficiency virus* by one of our research team (K.Sz.) under the 8/3 PhD program ( Microbiology) of the Doctoral School of Pathological Science of Semmelweis University.

For international testing and recognition, some of our thiolated pyrimidine compounds had been sent to a world known evaluation center of such potential drugs *Southern Research Institute Inc.* ( 431 Aviation Way, Frederick, Maryland, USA), which confirmed potent antiviral activity on inhibiting HIV primary infection *in vitro* of our experimental molecules. This confirmation intensified our plan to make steps toward patent application for these compounds.

At the *7th World Science Forum* (Budapest 2015), organized by the Hungarian Academy of Sciences, at the “Microbes and Society” section we had the possibility to present data about our OTKA Research.

We also reported about important results at the *III. National AIDS Conference* in Budapest, organized by the National AIDS Committee of the Secretariat of Health and the St. Laszlo Hospital for AIDS patients and the National Epidemiological Center.

The principal investigator (N.K.) several times gave reports to the written and electronic media, newspapers, periodicals, radio and TV programs about the significance of our research.

## SUMMARY OF THE MOST IMPORTANT RESULTS

- 11.) As original molecules, 8 new thiolated pyrimidine compounds had been synthesized with potential inhibitory activity on primary HIV infection *in vitro*. These are poly-thiolated, long molecules, which are not able to penetrate into cells. Compounds were synthesized after the previous one has been characterized as inhibitor, to use the *in vitro* data to modify the new compound.
- 12.) New approach for inhibition of HIV entry by modification of CD4 binding sites by thiolated pyrimidine derivatives had been revealed.
- 13.) During the study of HIV entry mechanism *in vitro*, we provided experimental evidences, that our thiolated compounds, especially their enol form contain reactive -SH groups, which able to inhibit glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Modifying the function of essential protein -SH groups, our compounds interfere thiol/disulfide exchange processes on other way than PDI inhibitors.
- 14.) Results suggest that some of our sulfur containing pyrimidines interact with redoxactive -SH groups required for successful HIV entry, including redox active disulfide in the CD4 molecules as well as -SH groups in HIV viral envelope gp 120.
- 15.) We have developed and used cellular biological assays, such as sytnitium induction/inhibition assay and MAGI assay for quantitative determination of inhibitory activity on HIV entry by the compounds during single cycle infection, in time-of-addition experiments.
- 16.) We have developed and used HIV pseudovirions, with different chemokine preference, containing reporter genes (for quantitative determination of infection rate).
- 17.) Using thiolated pyrimidine compounds as viral inhibitor, we confirmed and gave a new aspect to the role of the cell surface lipid rafts in the primary HIV infection *in vitro* and HIV entry into susceptible cells.
- 18.) We provided experimental evidences, that the thiolated pyrimidines we used have different inhibitory capacity to the fitness and infectious capacity of HIV-pseudotypes with different co-receptor preference. This is very important, as the majority of HIV infections occur with macrophage tropic HIV-1 using CCR5 as chemokine receptor.
- 19.) Inhibition of HIV-1 infection by thiolated compounds *in vitro* was selective on H9 lymphoid versus MAGI monolayer cells.

20.) Finally we presented experimental data showing that thiolated pyrimidine derivatives – especially the one designated as **DS53** – are able to inhibit *in vitro* infectivity of primary HIV-1<sub>IIIB</sub> strain and HIV-1 pseudovirions using chemokine receptors CCR5, CXCR4 or both for virus entry, as well as virally induced cell fusion. DS53 has low toxicity, its antiviral inhibitory activity against HIV-1 is IC<sub>50</sub> 0.75 μM on cell fusion and IC<sub>50</sub> 0.6 μM on viral entry. Its inhibitory mode of action is unique, and may represent a new class of potential HIV entry inhibitors to contribute to the successful treatment of HIV/AIDS.

## References

13. Clapham, P., **K. Nagy**, R. Cheingsong-Popov, M. Exley, and R.A. Weiss (1983): Productive infection and cell-free transmission of human T-cell leukemia virus in a non-lymphoid cell line. *Science* 222: 1125-1127
14. Juhász E, **Ghidán A**, Kemény B, **Nagy K**. (2008): Emergence of antiretroviral drug resistance in therapy-naïve HIV infected patients in Hungary Acta Microbiol. Immunol. Hung. 55(4):383-394
15. **Nagy K.**, Young M., Baboonian C., Merson J., Whittle P., Oroszlan S. (1994) Antiviral activity of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors in a single cycle of infection: evidence for a role of protease in the early phase J.Virol 68:757-765
16. **Kanizsai Sz.**, Juhász E., **Ghidán Á.**, **Aradi J**, **Nagy K**.(2009): Antiretroviral effect of poly-thiolated compounds as HIV entry inhibitors Acta Microbiol. Immunol. Hung. 56(3) Suppl. 2nd CEFORM, p.57.
17. **Nagy K.**, P. Clapham, R. Cheingsong-Popov, and R.A. Weiss (1983). Human-T-cell leukemia virus type I: Induction of syncytia and inhibition by patients' sera. Int. J. Cancer 32: 321-328
18. **Nagy K.**, J. Albert, and D. Bánhegyi (1988) Isolation of HIV from Hungarian AIDS and ARC patients (in Hungarian) Laboratóriumi Diagnosztika XV/4: 213-216.
19. **Nagy K.**, Young M., Baboonian C., Merson J., Whittle P., Oroszlan S. (1994) Antiviral activity of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors in a single cycle of infection: evidence for a role of protease in the early phase J.Virol 68:757-765
20. **Nagy K.**, Barabás É., Várkonyi V., Horváth A. (1996) Determination of HIV-1 subtype in Hungary by synthetic peptides representing the V3 loop of *env* Pathol.Oncol.Res. 2:268-271
21. Beck, Z., Kis, A., Berenyi, E., Kovacs, P., Fesüs, L., **Aradi, J** (2009): 4-Thio-uridylate (UD29) interferes with the function of protein –SH and inhibits HIV replication in vitro. Pharmacol Reports 61, 343–347
22. **Kanizsai S**, **Ongrádi J**, **Aradi J**, **Nagy K** (2014) Thiolated pyrimidine derivatives may interfere thiol groups concentrated at lipid rafts of HIV-infected cells. Acta Microbiol Immunol Hung 61(4):447–458
23. **Kanizsai S**, **Ghidán A**, **Ongrádi J**, **Nagy K** (2012) Antiretroviral effect of 4-thio-uridylate against human immunodeficiency virus type. Acta Microbiol Immunol Hung 59(4):499–510
24. **Kanizsai Sz.**, **Ongrádi J.**, **Aradi J.**, **Nagy K.** (2016): New approach for inhibition of HIV entry: modifying CD4 binding sites by thiolated pyrimidine derivatives Pathol Oncol Res. Vol22 No3. DOI 10.1007/s12253-016-004-y