

## ANTİRETROVİRALLERE DİRENÇ MEKANİZMALARI VE DİRENÇ TESTLERİ

Hakan ABACIOĞLU

Antiretroviral ajanlara direnç gelişimi temel olarak kullanılan ilaçlara, hastalara ve virüse bağlı faktörlerle ortaya çıkar. İlaçlara ilişkin faktörler arasında ilaçların potensi, farmakokinetik özellikleri ve çapraz dirence neden olan mutasyonların seçilmesi yer alır. Hastalar açısından ise, yan etkiler ve çok sayıda ilaç alımına bağlı tedaviye uyum sorunları ve önceden ilaç kullanımı dirençli kökenlerin seçilmesine neden olan başlıca faktörlerdir. Virusa ilişkin faktörler arasında ise viral dinamiğin çok hızlı olması ve revers transkriptaz (RT) enzimine bağlı transkripsiyonel hatalar en önemlileridir.

Yapılan çalışmalarda, HIV-1'in plazmadaki yarı ömrünün 6-48 saat olduğu ve infekte bireylerde her gün yaklaşık günde  $10^9$ - $10^{10}$  yeni virusun yapıldığı gösterilmiştir (7). Diğer yandan, revers transkriptaz (RT) enzimi her replikasyon döngüsünde yaklaşık  $3 \times 10^{-5}$  sıklıkla hata yapmakta ve yaptığı hatayı düzeltememektedir (13). Diğer bir deyişle, her replikasyon sonrasında viral genomda en az bir mutasyon ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyonlardan bazıları virus açısından etkisiz (nötral) ya da replikatif yönden defektif viral partiküllerin oluşumuna yol açarak zararlı olabilirken, bazıları da immün yanıt ya da antiretroviral ilaç gibi seçici baskılar karşısında mutant virusa replikatif avantaj sağlayabilmektedir (6). Önceden hiç antiretroviral tedavi almamış hastalardan izole edilen moleküler HIV klonlarında nükleozid ve non-nükleozid RT inhibitörleri ile proteaz inhibitörlerine dirence neden olan mutasyonlara rastlanmıştır (14). Tedavi uyumsuzluğu ya da ilaçların farmakolojik özelliklerine bağlı olarak viral replikasyonun tam olarak baskılanamaması, bu tür dirençli mutantların seleksiyonuna ve sonuçta tedavi başarısızlığına neden olmaktadır.

Antiretroviral ilaçlara direnç, en genel anlamıyla, *pol* genindeki genotipik değişimler (mutasyonlar) ile ilişkilidir. Bu mutasyonların bir bölümü erken dönemde ortaya çıkmakta ve inhibitör-spesifik bir dirence neden olmaktadır. Primer mutasyonlar olarak da adlandırılan bu değişiklikler RT ya da proteaz enzimlerinin aktif bölgelerinde olmaktadır (12). Genomda ortaya çıkan sekonder mutasyonlar, ilaç direncinin düzeyini arttırmaktan çok virusun replikatif özelliklerini arttıran kompensatuvar değişikliklere yol açmaktadır. Örneğin, proteaz inhibitörleri tarafından seleksiyona uğrayan mutant virusların bir bölümünde, gag ve gag-pol poliproteinlerinin viral proteaz tarafından kesildiği bölgelerde mutasyonlar belirlenmiş (cleavage site mutations) ve bu mutasyonların proteazın katalitik etkinliğini 2-10 kat arttırdığı saptanmıştır (5).

### RT İNHİBİTÖRLERİ VE DİRENÇ

Şu ana kadar FDA onayı almış RT inhibitörlerinin altısı nükleozid analogu, üçü ise non-nükleozid inhibitörlerdir. Bu ilaçlar enzimin polimeraz etkinliğini hedef almaktadır. HIV-1 RT enzimi dimerik yapıda bir proteindir. İki zincirden birini p66, diğerini ise p66'nın proteolitik parçalanma ürünü olan p55 oluşturmaktadır. Her iki zincirde ortak olan 4 bölge bulunmaktadır. Bunlara parmaklar (fingers), avuç içi (palm), baş parmak (thumb) ve bağlantı (connection) adı da verilmektedir (9). P66 zincirinin karboksil ucunda, yukarıdakilere ek olarak, RT enziminin RNaseH etkinliğinden sorumlu olan diziler yer almakta-

dır. Yine, p66 zincirinin avuç içi bölgesinde yer alan 110, 185 ve 186. pozisyonlardaki aspartik asit rezidüleri polimerazın katalitik etkinliğinden sorumludur. Tüm non-nükleozid RT inhibitörlerinin (NNRTI) bağlanma bölgesi, katalitik bölgeye yakın, avuç içi ve baş parmak arasındaki hidrofobik bir cebin içinde yer almaktadır (16). Bu bölgeye bağlanan NNRTI'leri, nükleotidlerin DNA zincirine eklenmesini sağlayan kimyasal tepkimeyi inhibe ederek etkimektedir (16). NNRTI'lerine direnç gelişimi temel olarak ilaçların bağlanma bölgesinde ortaya çıkan mutasyonlar ile ilişkilidir. Bu mutasyonlar, 98-108 ile 179-190. kodonlar arasında yoğunlaşmaktadır (Tablo 1). Y181C,I mutasyonu nevirapine ve delarvidine karşı, N103N mutasyonu ise tüm NNRTI'lerine (nevirapine, delarvidine ve efavirenz) karşı çapraz direncin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (6).

Nükleozid RT inhibitörlerinin (NRTI) etkili olabilmeleri için hücrel kinazlar tarafından fosforillenip aktif formları olan nükleozid trifosfat formuna dönüştürülmeleri gereklidir. Bu form zincire katıldığında, riboz halkasının 3' pozisyonunda -OH grubu taşımadıklarından, DNA sentezinin durmasına neden olur. NRTI'lerine dirence neden olan primer mutasyonlar enzimin dNTP bağlama bölgesinde yer almaktadır. Bu mutasyonların, analogların enzime doğru pozisyonda bağlanamamasına ya da bağlandıktan sonra stabilitelelerinde ya da reaktivitelerinde azalmaya neden olarak etkili oldukları öne sürülmektedir (8). M184V mutasyonu, tek başına, lamivudine karşı yüksek düzeyde direncin gelişmesine yol açarken, zalcitabine ve didanosine karşı da çapraz dirence neden olmaktadır (Tablo 1).

Çoklu NRTI direncine neden olan en önemli mutasyon Q151M'dir. Bu tür mutasyon taşıyan virüslerde ek olarak F77L ve F116Y mutasyonlarının çıkması çoklu direnç fenotipinin tam olarak ifade edilmesine neden olmaktadır (15). *Pol* geninin 69. pozisyonu civarında oluşan bir insersiyona bağlı olarak zidovudine, stavudine ile lamivudine ve kısmen de abacavire yüksek düzeyde direnç ortaya çıkmaktadır (11).

## PROTEAZ İNHİBİTÖRLERİ VE DİRENÇ

HIV-1 proteaz enzimi *pol* geninin 5' ucundan kodlanan 99 aminoasitlik bir aspartik proteindir. Homodimerik yapıdaki bu enzim gag (p55) ve gag-pol (p160) poliprotein ürünlerini 9 ayrı spesifik bölgeden keserek, fonksiyonel kor proteineri (p17, p24, p7 ve p6) ile RT, integraz ve proteaz enzimlerinin oluşmasını sağlar (1). Proteaz inhibitörleri (PI) enzimin aktif bölgesine bağlanarak, gag ve gag-pol poliproteinlerinin kesilmesine engel olur ve böylece olgun virionların oluşmasını inhibe edilir. RTI'lerinin aksine, PI'leri kronik olarak infekte hücrelerden infeksiyöz virus oluşmasını engelleyebilmektedir (10). PI'lerine direnç proteaz enziminin aktif bölgesinde ve ilaçların bağlanma bölgelerinde ortaya çıkan nükleotid değişimleri ile ilişkilidir (12). PI'lerine karşı oluşan primer mutasyonlar (Tablo 1) virusun ilaca duyarlılığını ancak 5 kat dolayında azaltmakta, ancak daha sonra oluşan sekonder mutasyonlara bağlı olarak yüksek düzeyde direnç gelişimi söz konusu olmaktadır. Primer mutasyonların aksine, sekonder mutasyonlar tüm proteaz inhibitörlerine karşı çapraz direnç gelişimine yol açmaktadır (3). Bu nedenle, bir PI'ne karşı direnç gelişmiş hastalarda diğer PI'leri de etkisiz kalmaktadır. PI'leri tarafından seleksiyona uğrayan sekonder mutasyonların bir bölümü gag ve gag-pol poliproteinlerinin viral proteaz tarafından kesildiği bölgelerde ortaya çıkmaktadır. P1/p6 bileşkesinde L'den F'ye değişim ve p7/p1 bileşkesinde QA'dan RV'ye değişim proteazın katalitik etkinliğini 2-10 kat arttırmaktadır (5).

Tablo 1. Kullanımda olan RT ve proteaz inhibitörlerine direnç genotipleri.

İlaç türü	İlacın adı	Mutasyonlar		Yorum
		Primer	Sekonder	
NRTI	Zidovudine (AZT)	K70R, T215Y/F	M41L, D67N, L210W, K219Q/E	Direnç düzeyi mutasyon sayısı ile orantılıdır
	Didanosine (ddI)	L74V	K65R, M184V	L74V, T215Y/F'nin neden olduğu AZT direncini baskılar
	Zalcitabine (ddC)		K65R, T69D, L74V, V75T, M184V	Primer mutasyonlara ilişkin yeterli klinik veri yoktur
	Stavudine (d4T)	V75T	Yok	In-vitro saptanan direnç. In-vivo çok nadir
	Lamivudine (3TC)	M184V	Yok	Duyarlılığın 1000 kat azalmasına neden olur. ddI ve ddC'ye karşı çapraz direnç (5 kat). M184V, T215Y/F'nin neden olduğu AZT direncini baskılar
	Abacavir	M184V	K65R, L74V, Y115F	10 kat direncin ortaya çıkması için tüm mutasyonlar gerekli. ddI, ddC ve 3TC ile çapraz direnç
	Çoklu NRTI direnci	QX151M (tek başına)	A62V, V75I, F77L, F116Y (+Q151M)	AZT (x190), ddI (x50), ddC (x20), d4T (x10), 3TC (x10) in-vivo
NNRTI	Nevirapine	K103N, V106A, V108I, Y181C/I, Y188C, G190A		Y181C >100 kat dirence ve diğer NNRTI'lerine çapraz dirence neden olur
	Delavirdine	K103N, Y181I/C, P236L		P236L in-vitro saptanan direnç. In-vivo çok nadir
	Efavirenz	K103N	L100I, V08I, Y188L, G190S	Yüksek düzeyde direnç için çok sayıda mutasyon gerekli
PI	Ritonavir	V82A/F/T/S	K20M/R, V32I, L33F, M36I, M46I/L, 154V/L, M63I, A71V/T, 184V, L90M	Yüksek düzeyde direnç için >3 mutasyon gerekli
	Indinavir	M46I/L, V82A/F/T	L101/R7V, K20M/R, L24I, V32I, 154V, L63I, A71V/T, G73S, 184V, L90M	Mutasyon sayısı arttıkça çapraz direnç olasılığı artar
	Saquinavir	G48V, L90M	L10I, 154V, L63I, A71V/T, G73S, V82A, 184V	
	Nelfinavir	D30N	M36I, M46I, L63I, A71V, V77I, 184V, N88D, L90M	
	Amprenavir	150V	L10F, M46I/L, 174V, 184V	Sekonder mutasyonlar in-vitro. In-vivo korelasyon belirsiz

## YENİ ANTİRETROVİRALLER VE DİRENÇ

Antiretrovirallere direncin yaygın olması nedeniyle, bir yandan yeni RTI ve PI'lerinin, diğer yandan da füzyon-bağlanma inhibitörleri, integraz inhibitörleri, *tat* inhibitörleri ve "zinc finger" inhibitörleri gibi viral replikasyon döngüsünün farklı basamaklarına etkili ajanların geliştirilme çabaları sürmektedir. Ne var ki, bu ajanlara karşı da in-vitro direnç saptanmaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. Geliştirilmekte olan bazı antiretrovirallere karşı direnç genotipleri.

İlaç türü	İlacın adı	Mutasyonlar
NRTI	(-)-FTC	M184V
	Adefovir	K65R, K70E
	L-FddC	M184V
	PMPA	K65R
	F-ddA	P119S
NNRTI	8-chloro-TIBO	K101E, K103N
	Alpha-APA RO18893	Y181C
	BHAP-U 88204E	L100I, V106A, Y181C/I
	Calanolide A	T139I
	E-EBU	Y181C
	Loviride	K103N, V108I, Y181C, Y188H/L, G190A
	Quinoxaline	G190E, V106A, P225H
	Trovirdine	K101Q, K103R, V108I, V179D, Y181C
	UC-10	K101E, K103N, V179D, Y181C
	UC-82	Y181C
	PI	141W94
BILA 1906 BS		V32I, M46I/L, A71V, I84A/V
DMP450		L10F, M46I, D60E, I84V
Palinavir		V32L, A71V, I84A, L63P
SC 52151		L24V, G48V, A71V, V75I, P81T, V82A, N88D
SKF 108922		V82A/T
VB 11,328		L10F, M46I, I47V, I50V, I84V
XM 323		L10F, K45I, M46L, V82A/I/F, I84V, L97V
Füzyon-bağlanma inhibitörleri		Dextran sulphate
	JM 2763	S274R, Q278H, I288V, A297T, P385L
	JM 3100	F145L, N270S, R272T, S274R, Q278H, I288V, N293H, A297T, P385L, Q410E, S433P, V457I
	RPR 103611	R22A, I84S
	Siamycin I	N188K, G332E, N351D, A550T, N633D, L762S

## ANTİRETROVİRAL DİRENÇ ÖLÇÜMÜ

Antiretroviral ilaçlara direncin belirlenmesinde kullanılan yöntemler genotipik ve fenotipik olarak iki grupta toplanmaktadır. Genotipik yöntemler viral genomda dirence neden olan mutasyonların belirlenmesine dayalıdır. Fenotipik olanlar ise in-vitro koşullarda belirli bir ilacın viral izolatu replikasyonunu % 50 ve % 90 oranında inhibe eden (IC50 ve IC90) konsantrasyonun saptanmasına yöneliktir.

Genotipik düzeyde direncin belirlenmesinde en sık DNA dizi analizi, mikroyonga (microchip) hibridizasyon ya da diğer adıyla "high density oligonucleotide array sequencing" ve "line probe assay (LIPA)" yöntemleri kullanılmaktadır (2). Bu yöntemlerin kullanılabilmesi için yaklaşık 1000 kopya/ml HIV-1 RNA molekülüne ve mutant genotipteki vi-

rusların toplam viral yükün % 20-25'ini oluşturmasına gerek vardır (12). Bu testler, subtip B HIV dizileri gözönüne alınarak hazırlanmaktadır. Ancak, farklı subtiplerin *pol* geninde polimorfik diziler içermesi, non-subtip B viruslarda direncin belirlenmesinde sorunlara neden olmaktadır.

Fenotipik yöntemler arasında periferik kan mononükleer hücre kültürü, HeLa CD4 kültürü ve son yıllarda geliştirilen rekombinan yöntemler yer almaktadır (2,12). İlk iki yöntemin en önemli dezavantajı geç sonuç vermesi, emek yoğun ve pahalı olmalarıdır. Rekombinan yöntemler ise hızlı sonuç vermesi ve otomatizasyona uygun olması nedeniyle giderek popülerite kazanmaktadır.

Genotipik ve fenotipik yöntemlerin tedaviye yanıtı izlemek amacıyla rutin kullanımlarına ilişkin ortak bir görüş henüz yoktur. Ancak, bu testlerin tam olarak standardize olmaları ve yüksek maliyetleri kullanımlarını kısıtlamaktadır. Şu an için tedaviye yanıtın izlenmesinde plazma HIV-RNA ölçümleri, CD4+ hücre sayımı ve klinik durumun izlenmesi önerilmektedir (12). HAART uygulanan hastalarda 12. haftadaki viral yük miktarının tedaviye yanıtın değerlendirilmesi açısından önemli olduğu; bu dönemde viral yükün 50 kopya/ml altına inmemesi durumunda tedavi protokolünün gözden geçirilmesi gerektiği öne sürülmektedir (4).

#### KAYNAKLAR

- 1- Boden D, Markowitz M: Resistance to human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors, *Antimicrob Agents Chemother* 42:2775 (1998).
- 2- Cockerill FR: Genetic methods for assessing antimicrobial resistance, *Antimicrob Agents Chemother* 43:199 (1999).
- 3- Condra JH, Schleif WA, Blahy OM, Gabryelski LJ, Graham DJ, Quintero JC, Rhodes L, Robbins HL, Roth E, Shivsprakash M, Titus D, Yang T, Teppler H, Squires KE, Deutsch PJ, Emini EA: In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors, *Nature* 374:569 (1995).
- 4- de Mendoza C, Soriano V, Gonzales-Lahoz J: Association between submaximal suppression of HIV replication and use of drug combinations without protease inhibitors, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18:604 (1999).
- 5- Doyon L, Croteau G, Thibeault D, Poulin F, Pilote L, Lamarre D: Second locus involved in human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors, *J Virol* 70:3763 (1996).
- 6- Hirsch MS, Conway B, D'Aquila RT, Johnson VA, Brun-Venizet F, Clotet B, Demeter LM, Hammer SM, Jacobsen DM, Kuritzkes DR, Loveday C, Mellors JW, Vella S, Richman DD: Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection: implications for clinical management, *JAMA* 279:1984 (1998).
- 7- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M: Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection, *Nature* 373:123 (1995).
- 8- Huang H, Chopra R, Verdine GL, Harrison SC: Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance, *Science* 282:1669 (1998).
- 9- Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA: Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor, *Science* 256:1783 (1992).
- 10- Lambert DM, Petteway SR, McDanal CE, Hart TK, Leary JJ, Dreyer GB, Meek TD, Bugelski PJ, Bolognesi DP, Metcalf BW, Matthews TJ: Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors irreversibly block infectivity of purified virions from chronically infected cells, *Antimicrob Agents Chemother* 36:982 (1992).

- 11- Larder BA, Bloor S AU, Kemp SD, et al: A family of insertion mutations between codons 67 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer multinucleoside analog resistance, *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10027 (1999).
- 12- Loveday C, Devereux H: Clinical implications of antiretroviral drug resistance, *J HIV Ther* 3:48 (1998).
- 13- Mansky LM, Temin HM: Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase, *J Virol* 69:5087 (1995).
- 14- Najera I, Holguin A, Quinones-Mateu ME, Munoz-Fernandez MA, Najera R, Lopez-Galindez C, Domingo E: pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus: mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy, *J Virol* 69:23 (1995).
- 15- Shafer RW, Kozal MJ, Winters MA, Iversen AK, Katzenstein DA, Ragni MW, Meyer WA, Gupta P, Rasheed J, Coombs R, et al: Combination therapy with zidovudine and didanosine selects for drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 strains with unique patterns of pol gene mutations, *J Infect Dis* 169:722 (1994).
- 16- Spence RA, Kati WM, Anderson KS, Johnson KA: Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors, *Science* 267:988 (1995).