

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Václav Kropáček**

DNA/RNA interkalační činidla jako antivirotika: možné mechanismy účinku  
DNA/RNA intercalating agents as antivirotics: possible mechanisms of action

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Hana Španielová, Ph.D.

Praha, 2021

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12. 8. 2021

Podpis

**Poděkování:**

Rád bych tímto poděkoval RNDr. Haně Španielové, Ph.D. za její cenné rady při psaní této práce. A také svojí rodině za veškerou podporu v rámci studia i mimo něj.

## **Abstrakt**

DNA/RNA interkalační činidla jsou látky, které mají schopnost vmezeřit se mezi páry bází nukleových kyselin. Tento jev je doprovázen narušením struktury, nebo funkce dané nukleové kyseliny. Některé z těchto látek patří mezi terapeutika pro léčbu nádorů, bakteriálních i parazitárních infekcí nebo jsou používány jako antivirotika. Tato práce shrnuje různé mechanismy, stojící na pozadí antivirového působení tří významných tříd interkalačních činidel, derivátů akridinů, chinolinů a chinolonů. Tyto sloučeniny mají mimo schopnosti interkalace do nukleových kyselin i další vlastnosti, jako je alkalizace buněčných organel, inhibice některých virových enzymů (helikázy, integrázy) a imunomodulace, které jim umožňují narušit životní cyklus virů.

**Klíčová slova:** Interkalace, antivirotika, virus lidské imunodeficiency (HIV), virus chřipky, virus hepatitidy C (HCV)

## **Abstract**

DNA/RNA intercalating agents are compounds with capability to insert themselves between nucleic acids base pairs. This phenomenon is accompanied by structural or functional disruption of said nucleic acid. Some of these compounds are used as therapeutics for cancer, bacterial or parasitic infection or are used as antivirals. This work summarizes different mechanisms which are responsible for antiviral effects of three significant classes of intercalating agents, acridine derivatives, quinolines and quinolones. Except for intercalation into nucleic acids, these compounds are also capable of alkalization of cellular organelles, inhibition of some viral enzymes (helicase, integrase) and immunomodulation. These abilities enable them to disrupt viral life cycle.

**Key words:** Intercalation, antivirals, human immunodeficiency virus (HIV), influenza virus, hepatitis C virus (HCV)

## Seznam zkratek:

ACE2	angiotenzin konvertující enzym 2
AP site	apurinové/apyrimidinové místo, abazické místo DNA
ATP	adenosin trifosfát
ARDS	syndrom akutní dechové tísně
B	báze
BH	protonovaná báze
DNA	deoxyribonukleová kyselina
CD4	diferenční klastr 4
CD81	diferenční klastr 81
CDK9	cyklin dependentní kináza 9
cGAS	cyklické-GMP-AMP syntáza
cGAMP	cyklický adenosin, guanosin trifosfát
CME	klatrinem zprostředkovaná endocytóza
CQ	chlorochin
CTD	C terminální doména
dsDNA	dvouvláknová DNA
dsNA	dvouvláknová nukleová kyselina
gp120	glykoprotein 120
GTP	guanosin trifosfát
HA	hemaglutinin
HA2	druhá podjednotka hemaglutininu
HCV	virus hepatitidy C
HCVcc	HCV odvozený z buněčné kultury
HCVpp	pseudopartikule HCV
HCQ	hydroxychlorochin
HIV	virus lidské imunodeficiency
IAV	chřipkový virus typu A
IBV	chřipkový virus typu B
IČ	interkalační činidlo
I $\kappa$ B	inhibitor jaderného faktoru kappa B
IRF3	interferon regulující faktor 3
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6

IN	integráza
K12	8-difluoromethoxy-1-ethyl-6-fluoro-1,4-didehydro-7-[4-(2-methoxyfenyl)-1-piperazinyl]-4-oxochinolin-3-karboxylová kyselina
MVB	mnoho váčkové těleso
NA	nukleová kyselina
NELF	negativní elongační faktor
NS3	nestruturní protein 3
NS5B	nestruturní protein 5B
NF- $\kappa$ B	jaderný faktor kappa aktivovaných B buněk
PI	inhibitor proteáz
P-TEFb	pozitivní faktor prodloužení transkripce
RNA	ribonukleová kyselina
RNAPII	RNA polymeráza II
ROIs	reaktivní kyslíkové radikály
SARS-CoV	koronavirus těžkého akutního respiračního syndromu
-ssRNA	jednovláknová RNA v negativním smyslu
STING	stimulátor genů interferonů
Tat	trans aktivátor transkripce
TAR	Tat odpovídající element
TNF- $\alpha$	faktor nádorové nekrózy alfa
TNFR	receptor faktoru nádorové nekrózy alfa
vRNPs	virové ribonukleoproteiny

## Obsah:

1. Úvod .....	1
2. Obecné vlastnosti DNA/RNA interkalačních činidel.....	2
3. Biologické účinky DNA/RNA interkalačních látek.....	6
4. Akridony a akridiny .....	7
4.1. Inhibice funkce virových proteinů .....	7
4.2. Ovlivnění virové transkripce .....	9
4.3. Indukce interferonu .....	9
5. Chlorochin a hydroxychlorochin.....	10
5.1. Alkalizace buněčných organel .....	11
5.1.1. Inhibice glykosylace v kontextu viru HIV .....	11
5.1.2. Inhibice glykosylace a virového receptoru v kontextu koronavirů .....	12
5.1.3. Alkalizace endosomu a vstup viru do buňky .....	12
5.1.4. Inhibice autofagie .....	13
5.2. CQ a imunomodulace.....	15
5.3. Srovnání antivirotických účinků CQ v <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> systémech.....	16
6. Chinolony.....	17
6.1. Inhibice HIV integrázy.....	18
6.2. Inhibice Tat proteinem zprostředkované transaktivace.....	18
7. Závěr.....	20

## 1. Úvod

Onemocnění způsobená virem doprovázejí lidstvo, potažmo veškerý život, odnepaměti. Po dlouhou dobu byly epidemie virového původu vykládány jakožto důsledky nadpřirozený jevů, případně působením neznámých jedů. Samo označení virus nalézá svůj původ v latinském slově pro jed.

Viry jakožto samostatné entity byly poprvé popsány počátkem 20. století. Od té doby se snažíme porozumět životnímu cyklu a na živých buňkách závislé reprodukci těchto obligátně buněčných parazitů, s cílem odhalit jejich slabá místa a terapeuticky na ně cílit.

Výsledkem těchto snah je široké spektrum sloučenin s antivirotickým účinkem, inhibujících samo navázání viru na cílovou buňku, proniknutí, kroky jeho replikace, případně jeho složení (assembly) a únik z buňky ven.

Recentně byla zaměřena pozornost na látky schopné interagovat s nukleovými kyselinami takovým způsobem, že mění jejich konformaci, inhibují jejich účinnou replikaci interakcí s vazájkými se enzymy, případně jsou schopny způsobit rozsáhlé posunové mutace, efektivně zbavující proteinové produkty jejich funkce. Tyto látky, interkalační činidla, vynikají svojí schopností vmezeřit se mezi jednotlivé báze nukleových kyselin, jak DNA tak RNA. Disponují potentními mutagenními a cytostatickými vlastnostmi. Sféra jejich využití sahá od antibiotik a antiparazitik, přes chemoterapeutika nádorových onemocnění, až po antivirotické látky.

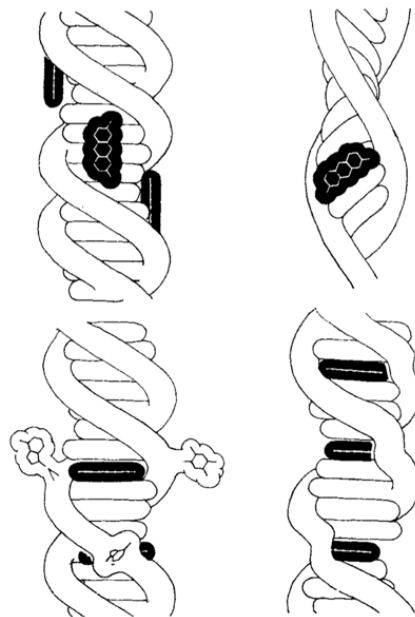
Antivirotické působení interkalačních činidel však není způsobeno pouze jejich schopností včlenění se mezi báze nukleových kyselin, mnohé jsou schopny alterovat pH buněčných organel, ovlivňovat sekreci prozánětlivých mediátorů, nebo narušit průběh některých signálních kaskád. Další jsou schopny narušit správnou funkci rozličných virových proteinů. Souhrn těchto různorodých jevů stojí na pozadí jejich zhojného vlivu na životní cyklus virů. Od samotného vstupu do buňky, přes replikaci virového genomu až po posttranslační modifikace jejich proteinů.

V této práci se budu snažit shrnout nejpodstatnější mechanismy, kterými interkalační činidla (akridiny, akridony a látky příbuzné chininu: chlorochiny, a chinolony) a jejich deriváty zasahují a inhibují různé kroky životního cyklu vybraných virů. A to viru lidské imunitní nedostatečnosti HIV, chřipkového viru a HCV viru lidské hepatitidy C.

## 2. Obecné vlastnosti DNA/RNA interkalačních činidel

Pojem interkalace poprvé ve svých pracích zmiňuje L.S. Lerman, který na základě svých pozorování změny vlastností DNA (*in vitro*), po inkubaci s akridinovými barvivy formuloval možnost včlenění planární, aromatické molekuly (interkalátoru) kolmo k ose helixu mezi nukleotidové báze, za současného protažení helixu, bez přerušení vodíkových můstků mezi sousedícími páry bazí. Pozorované změny zahrnovaly narušení struktury helixu (rozvolnění „uncoiling“), zvýšení rigidity dané oblasti, prodloužení řetězce, zvýšení viskozity a snížení density. Díky rozvolnění v místech vazby interkalátoru vykazovaly nukleové kyseliny vystavené zkoumaným barvivům, snížení sedimentačního koeficientu. (Lerman, 1961; Luzzati et al., 1961).

Obrázek 1: 4 různé modely interakce akridinu s DNA, pro případ interkalace je za platný považován model vpravo dole (Lerman, 1964).



Ještě před Lermanem, si však zajímavých vlastností těchto látek povšiml G. Oster (, který zaznamenal pokles fluorescenčního signálu („fluorescent quenching“) a změnu vlnové délky světla absorbovaného akriřlavinem a aminoakridinem poté, co byla do pozorovaného roztoku přidána nukleová kyselina. Pokud byl roztok ošetřen deoxyribonukleázou, absorbní spektrum barviv nebylo ovlivněno. Na základě těchto pozorování Oster předpokládal možný vznik komplexu mezi molekulami akriřlavinu a řetězci nukleové kyseliny zasunutím planární molekuly barviva mezi, též planární, báze nukleotidů. V článku Oster dále zmiňuje možný potenciál akriřlavinu jakožto silného bakteriostatika a nepublikovaná pozorování vlivu akriřlavinu na růst kořene fazolu (inhibice) a výskyt chromozomových zlomů v rostlinných buňkách.

Pozorovaná interkalační činidla (IČ) (akridin, akriřlavin, daunomycin, ethidium) vykazují shodné rysy. Charakteristickým znakem je přítomnost vícera planárních, dusíkatých



(hetero)cyklů s konjugovaným systémem dvojných vazeb, základní stavební jednotkou je benzenové jádro sestávající se z šesti uhlíků. Pokud počet  $\pi$  elektronů odpovídá Hückelovu pravidlu, lze dané činidlo považovat za aromatickou látku. Jejich uhlíková kostra je nepolární, hydrofobní. Celkový náboj interkalátoru je ovlivnitelný atomy, nacházejícími se na postranních řetězcích.

Interkalátory lze dále rozdělit do skupin dle počtu podjednotek, které jsou schopny vmezeřit se do nukleové kyseliny. A to na monointerkalátory, bisinterkalátory, trisinterkalátory etc. (V případě polyinterkalátorů jsou podjednotky spojeny linkerem).

Samotný akt interkalace, tedy vmezeření IČ mezi base NA je energeticky výhodný proces, na němž se pravděpodobně s největší měrou podílí tzv. „hydrofobní transfer“. Spočívající ve snaze nepolární molekuly o přestup z vodního prostředí do relativně hydrofobní „kapsy“ mezi nukleotidovými bázemi (Ihmels et al., 2005). Roli hrají také slabé vazebné interakce, van der Waalsovy síly (Řeha et al., 2002).

Molekula IČ může vzhledem ke „kapse“ mezi basemi, do které je začleněna zaujímat dvě polohy odvozené od vzájemné pozice hlavní osy („long molecular axis“) vůči rovině vodíkových můstků sousedících bází, jak je znázorněno na obrázku číslo 2.

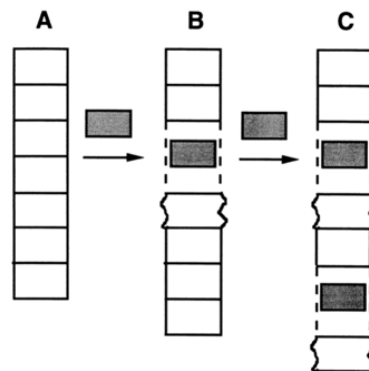


Obrázek 2: Nákres polohy molekuly interkalátoru (černě) vůči sousedícím párům bází (šedě). V případě a) je molekula orientována paralelně, v případě b) kolmo vůči rovině H-můstků bází své „kapsy“. Převzato z Ihmels et al., 2005.

Vyjma inkorporace IČ mezi 2 sousední báze, bylo popsáno vmezeření IČ selektivně do abazických oblastí DNA (tzv. AP site – apurinic/apyrimidinic site, oblast DNA) (Hess et al., 2002).

Jak ve své práci popisují Rao a Kollman (1987), všeobecně pozorovatelným principem v rámci interkalace je tzv. „neighbor exclusion principle“. „Každé druhé místo potenciálně vhodné k interkalaci („kapsa“) zůstává neobsazené.“ Již Lerman (1963) pozoroval, že nedochází k začleňování molekul IČ „za sebou“ ale, že se mezi jednotlivými molekulami nachází vždy několik párů bází. Popisovaný jev je zobrazen na obrázku číslo 3.

Obrázek 3: Bílé čtverce znázorňují báze, šedý čtverec molekulu interkalátoru, zvlnění představuje distorzi. Převzato z Ihmels et al., 2005.



Stabilita komplexu IČ-NA není příliš silná, v případě monointerkalátorů dochází asociaci a zpětné disociaci extrémně rychle. Lerman, (1961) pozoroval reverzibilitu této události.

Tato vlastnost může negativně ovlivňovat terapeutické využití „jednoduchých“ monointerkalátorů. Příkladem by mohla být hypotetická situace, kdy vmezeřená molekula může oddisociovat ještě před tím, než vůbec dojde k interakci DNA s vazebným proteinem v reakci, kterou jsme chtěli inhibovat.

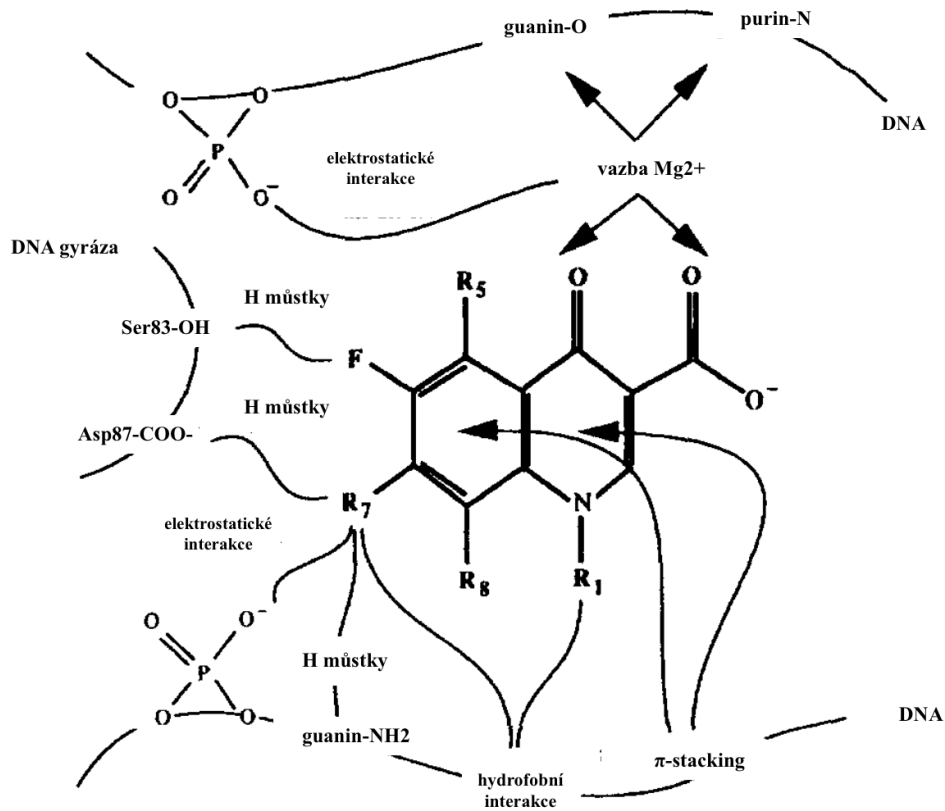
Tento problém, by mohl být řešitelný vysokou koncentrací interkalátoru v prostředí, což by však (mimo jiné díky nízké specifitě mono-interkalátorů) mohlo (*in vivo*) vést k řadě nechtěných interakcí IČ-NA, s negativními důsledky pro normální buněčné pochody. Anebo využitím polyinterkalátorů, které by díky vyššímu počtu interakcí mohly být stabilnější a zároveň více specifické.

Pro udržení molekuly IČ mezi bázemi DNA je nutné působení stabilizačních sil. Mezi nejdůležitější jsou započítávány  $\pi - \pi$  patrové interakce (stacking), van der Waalovy síly a hydrofobní interakce. Hlavní stabilizační silou se zdá být disperzní energie, jedna z van der Waalových sil, v důsledku které dochází k tzv. „Londonovu efektu“ kdy je přitažlivé síly dosaženo indukci rychle oscilujících synchronizovaných dipólů mezi přibližujícími se molekulami báze a interkalátoru (Řeha et al., 2002). Vzhledem ke své aromatické povaze, disponují IČ oblaky delokalizovaných  $\pi$  elektronů, schopných společné interakce za vzniku přitažlivé síly tzv. stacking. Stacking je významnou silou v rámci stabilizace DNA helixu a hraje důležitou roli v udržení IČ (Gago, 1998).

V případě vazby slabě kladně nabitých IČ (9-amidoacridin), byl popsán vliv elektrostatických interakcí (Medhi et al., 1999). Souhrn různých sil za interkalaci zodpovídajících je zobrazen na obrázku číslo 4.

Frederick (1990) pozorovala vyboulení „buckle“ a pokroucení „propeller twist“ bází sousedících s molekulou interkalátoru (v tomto případě daunomycinu). Oba typy distorze byly způsobeny snahou sousedících nukleotidových bází o co nejtěsnější kontakt s molekulou daunomycinu za účelem udržení van der Waalových sil, napomáhajících stabilizaci komplexu.

Ustanovená distorze sousedících bází (a tedy i „kapes“, do kterých by se za normálních okolností mohla vmezerit další molekula IČ) navíc přináší možné vysvětlení tzv. „neighbor exclusion principle“.



Obrázek 4: Souhrn různých sil působících na interkalátor (chinolon), zde ještě v interakci s bakteriálním enzymem gyrázou. Chinolony jsou navíc schopny chelatovat  $Mg^{2+}$  ionty. Převzato a upraveno z Llorente et al., 1996.

### 3. Biologické účinky DNA/RNA interkalačních látek

Interkalační činidla jsou látky oplývající širokou škálou účinků. Mnohá jsou díky svým cytostatickým vlastnostem, intenzivně zkoumaná v rámci terapie nádorových onemocnění. Jedná se zejména o deriváty elipticinů, actinomycinů (daktinomycin) a akridinů (Goftar et al., 2014). Tyto látky jsou schopny narušit funkci topoizomeráz (Bastow et al., 1994), enzymů, které mění terciální strukturu DNA a asistují v rámci replikace. Inhibice funkce těchto enzymů je zprostředkována vazbou interkalátoru za vzniku stabilizovaného ternárního komplexu topoizomeráza:DNA:IČ. Což vede v rapidně se dělících nádorových buňkách k fragmentaci DNA a následnému potlačení proliferace, či přímo navození buněčné smrti (Bailly et al., 2000). Některá interkalační činidla vykazují antibakteriální působení a v průběhu 20. století byla využívána k ošetření povrchových poranění (Browning et al., 1992). Chinolonové deriváty byly využívány jako potentní antibiotika, například k léčbě infekcí močového traktu (Emmerson et al., 2003). Antibakteriálního působení je dosaženo jak přímou interkalací do bakteriální DNA, což vede k její distorzi a narušení replikace a transkripce (Wainwright, 2001). Tak inhibicí bakteriální topoizomerázy II (gyrázy) a topoizomerázy IV, obdobným mechanismem, jako v případě nádorových buněk – stabilizací ternárního komplexu gyráza:DNA:IČ (Malik et al., 2006).

Deriváty chininu, chlorochin a hydroxychlorochin byly, ještě před nástupem rezistentních kmenů plasmodií, masivně využívány jako léčba i profylaxe malárie (Slater 1993). Existuje celá řada teorií popisujících mechanismy, kterými CQ působí na plasmódia. Patří mezi ně znemožnění trávení hemoglobinu v důsledku alkalizace potravní vakuoly, nebo tvorba komplexů s hemem, který je uvolňován v průběhu trávení hemoglobinu. Tvorba komplexů hem-CQ vede k znemožnění polymerizace hemu, což je mechanismus, kterým za normálních okolností plasmodium konvertuje toxický hem do stabilní formy (Fitch 1983). CQ je navíc schopen inhibovat funkci hem-polymerázy, enzymu, který katalyzuje polymerizaci hemu (Chou et al., 1992). Tato pozorování ukazují, že chinolony jsou schopné působit „na více frontách“, jsou schopny interkalace do NA (Yielding et al., 1971), enzymatické inhibice i změny pH buněčných kompartmentů (Okhuma et al., 1981).

Práci jsem se rozhodl zaměřit 3 skupiny interkalačních činidel a jejich deriváty, jedná se o akridiny, chinoliny a chinolony. Důvodem pro toto vymezení je jak historie výzkumu těchto látek, kdy to byly právě akridiny, které stály u popisu fenoménu interkalace do nukleových kyselin (Lerman 1961). Tak relativní dostatek literatury popisující akridiny, chinoliny a chinolony v kontextu antivirotického působení. Deriváty chinolinů jsou navíc celosvětově relativně dostupná a levná farmaka a mají za sebou roky pozorování vlivu na lidské zdraví

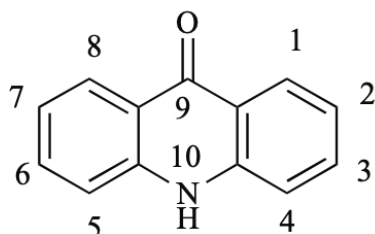
#### 4. Akridony a akridiny

Jedná se o látky odvozené od akridinu a dále akridonu (viz obrázky 5 a 6). Samotný akridon(9-akridanon) je planární aromatickou molekulou sestávající se z akridinové kostry (3 benzenové kruhy s dusíkem jako heteroatomem na 10. pozici) s karbonylovou skupinou připojenou na 9. uhlíku (Potts et al., 1995).

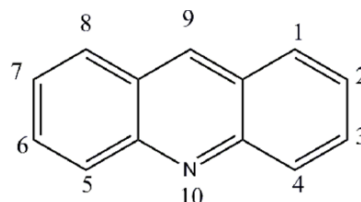
Díky svojí stavbě a schopnosti vmezeřit se mezi páry bazí nukleových kyselin (Lerman, 1961; Adams, 2002), splňují kritéria interkalačních činidel.

Jako první si jejich účinků povšimli Ehrlich a Benda roku 1912. Jejich antibiotické a antiseptické vlastnosti později podrobněji popsal Browning (1922 a,b). Mechanismus antibakteriálního působení tkví právě ve schopnosti interkalace vedoucí k již dříve diskutované distorzi DNA a buněčné smrti (Wainwright, 2001).

V průběhu 20. století našly své uplatnění jako pigmenty, ve formě přísad do antiseptických mastí nebo jako potenciální léčiva malárie. Možností, kterými deriváty akridonů mohou ovlivňovat virovou infekci je vícero. Patří mezi ně potlačení replikace interkalací do virové NA, či přímá interakce s proteiny zajišťujícími processing virového genomu (polymerázy, helikázy). Indukce interferonové odpovědi. A také v případě HIV suprese virové transkripce ovlivněním NF- $\kappa$ B kaskády.



Obrázek 5: Struktura akridonu.  
Převzato z Sepúlveda et al., 2013.



Obrázek 6: Struktura akridinu.  
Převzato z Rugar et al., 2018.

##### 4.1. Inhibice funkce virových proteinů

Interkalační činidla patří mezi látky schopné inhibovat funkci eukaryotních i virových helikáz. Předpokládaných mechanismů účinku je více a patří mezi ně: Stabilizace NA duplexu vmezeřením interkalačních činidel, což by vedlo k zvýšení energetických nároků při rozplétání dsNA a snížení, nebo rovnou zastavení činnosti helikázy. Distorze specifických oblastí duplexu rozpoznávaných danou helikázou (Bachur et al., 1992).

Předpokládá se, že potlačení funkce virové helikázy je jedním z mechanismů majícím na svědomí inhibici exprese viru lidské hepatitidy C. HCV spadá do čeledi Flaviviridae, genomem je +ssRNA (dle Baltimore IV. třída). Kapsida je ikosahedrální symetrie obalená lipidovou dvouvrstvou obsahující povrchové glykoproteiny E1 a E2 účastnící se interakcí s buňkou (Flint et al., 2000). Po průniku do buňky zprostředkovaném endocytózou (viz 4.1.3. Alkalizace endosomu a vstup viru do buňky) následuje translace virové RNA hostitelskými ribozomy za syntézy polyproteinu, který je následně štěpen na funkční jednotky za asistence virových a hostitelských proteáz. Mezi esenciální proteiny životního cyklu HCV spadá NS3 helikáza/proteáza a NS5B RNA dependentní RNA polymeráza (viz kapitola 5.1.) (Kolykhalov, et al., 2000; monografie Chevaliez et al., 2006).

Vzhledem k obtížím kultivace samotného HCV, jsou pozorování prováděna za využití dvou hlavních modelových systémů. Jedná se o HCVcc (cell-culture derived HCV) a HCVpp (retrovirus based pseudotyped particles HCV). HCVcc je genetickou chimérou JFH1 (Japanese fulminant hepatitis 1) a HCV, která je schopná replikace a produkce nových virionů v buněčných kulturách. „HCVpp jsou retrovirové partikule, které do svého lipidového obalu inkorporují HCV glykoproteiny E1 a E2.“ Produkce je dosaženo souběžnou transfekcí příhodných buněk třemi různými plasmidy (pro reportérový gen, gag-pol proteiny HIV a HCV E1/2 glykoproteiny). Výsledné partikule je možné využít při studiu průniku HCV do hostitelských buněk (Riva et al., 2019).

Dle Tacketta (2001) se NS3 helikáza vyznačuje citlivostí vůči struktuře duplexu. Její narušení vlivem působení IČ může vést ke snížení nebo úplné ztrátě schopnosti helikázy navázat se na daný úsek. Další možností je i vznik stabilního ternárního komplexu enzym:ssNA:IČ, čímž dojde k uvěznění helikázy a znemožnění jejího dalšího postupu (Tuteja et al., 1997).

Na nejednoznačnost mechanismu působení akridonových sloučenin poukazuje též výzkum Stankiewicz-Drogon et al., (2008; 2010). Předmětem výzkumu byla schopnost vybraných akridonových derivátů (odvozených od akridon-4 karboxylové kyseliny) potlačit amplifikaci HCV, schopnost interkalace do dsDNA a míra inhibice NS3 helikázy. V průběhu testování byl identifikován velmi silný inhibitor NS3 [2-fluoro-5-methoxy-N-(pyridine-3-yl)-akridon-4-karboxamid], s preferencí pro interkalaci do dsRNA a potlačující replikaci HCV. Předpokládanými mechanismem účinku bylo potlačení funkce NS3 díky distorzi RNA duplexu. Avšak vzhledem k tomu, že některé testované sloučeniny [2-chloro-N-(4-chloropyridin-2-yl)-5-methoxyacridone-4-carboxamid] vykazující mizivou schopnost interkalace, byly také schopny velmi efektivně inhibovat funkci virových proteinů, nabízí se další možné vysvětlení

ve formě přímé interakce IČ s virovým enzymem. Nebo kombinace obého (Stankiewicz-Drogon et al., 2010).

#### 4.2.Ovlivnění virové transkripce

Tamazacrin [(1,4-bis[3-(6-oxo-6H-v-triazolo[4,5,1-de]akridin-5-yl)amino-propyl]piperazin], derivát bistriazoloakridonu, byl shledán schopným v *in vitro* podmínkách selektivně potlačit expresi HIV. Přesný mechanismus není jasný. Látka byla *in vitro* schopna inhibovat funkci virové integrázy, ale předpokladem je, že v buňkách interferuje s procesem virové transkripce (Turpin et al., 1998).

Derivát akridonu RD6-5071 [1-hydroxy-10-methyl-9,10-dihydroakrid-9-on] je schopen potlačit replikaci HIV v TNF- $\alpha$  stimulovaných, chronicky infikovaných buňkách. Navíc je *in vitro* schopen inhibovat funkci PKC. (Fujiwara et al., 1999). Předpokládaným mechanismem účinku je následovný. TNF- $\alpha$  je po vazbě na svůj receptor TNFR schopen spustit dráhu vedoucí, za asistence PKC k aktivaci NF- $\kappa$ B (Krönke et al., 1990). Role PKC spočívá ve fosforylaci (a tím pádem odsouzením k degradaci) I $\kappa$ B, který za normálních okolností vytváří komplex s NF- $\kappa$ B a tím inhibuje jeho funkci. Ve chvíli, kdy je NF- $\kappa$ B uvolněn, putuje do buněčného jádra, kde po vazbě na příslušné  $\kappa$ B elementy indukuje transkripci. Celý tento mechanismus je virem zneužitelný pro posílení vlastní transkripce. HIV ve svém 5'-LTR elementu totiž obsahuje sekvence schopné vázat buněčné jaderné faktory, mezi nimi NF- $\kappa$ B (Duh et al., 1989; Swingler et al., 1994; Baba et al., 2004).

#### 4.3.Indukce interferonu

Jako jeden z prvních si možnosti indukce protivirové odpovědi po aplikaci interkalačních činidel (akridinová oranž a další) u myši povšiml Diederich (1973). Povahu pozorované odpovědi určil jako interferonovou, případně interferonu podobnou. (Ještě před Diederichem publikuje podobné výsledky Krueger (1970) za užití tiloronu).

Pépin (2017) popisuje vyvolání interferonové odpovědi směsí akridinových derivátů (akriflavinu a proflavinu), které v rámci interkalace do buněčné DNA způsobí mírné poškození a únik stop nukleové kyseliny do cytoplasmy. Přítomnost dsDNA v cytoplasmě neunikne buněčným mechanismům „DNA-sensing“. Za schopnost buňky „vnímat“ přítomnost DNA v prostoru cytoplasmy a její imunologickou reakci na ní, zodpovídá cGAS-STING kaskáda. V cytoplasmě se nacházející cGAS (cGAMP [cyclic-GMP-AMP] syntáza) je po navázání DNA aktivována, což vede k vazbě ATP a GTP, za vzniku cGAMP, druhého posla. cGAMP se následně váže na STING (stimulator of interferon genes), ten interaguje s I $\kappa$ B kinázou, která

fosforyluje IRF3 (interferon regulatory factor 3) (Ishikawa et al., 2009), který po translokaci do jádra indukuje expresi genů pro interferon  $\beta$  (Sun et al., 2013; Wu et al., 2013).

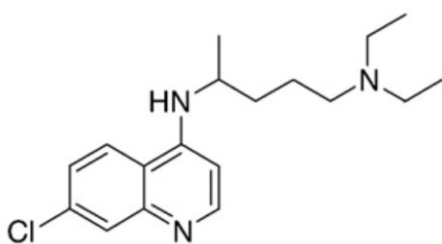
## 5. Chlorochin a hydroxychlorochin

Jedná se o heterocyklickou dusíkatou molekulu, 9-aminochinon [(N4-(7-Chloro-4-chinoliny)-N1,N1-diethyl-1,4-pentanediamine)]. Je derivátem chininu. Syntetizován roku 1934 týmem Johanna Andersaga v Bayer Laboratories, původně pod označením resochin (Andersag et al., 1942; převzato z Solomon et al., 2009). Aktuálně nejrozšířenějším využitím chlorochinu (CQ) je prevence a léčba malárie (zaveden roku 1947), od toho používají je však zvolna ustupováno v důsledku výskytu CQ-rezistentních kmenů původců malárie, plazmodií. Poté, kdy byla pozorována schopnost CQ vázat se k DNA (Irvin et al., 1949), byla jako mechanismus zodpovědný za tuto interakci navržena interkalace (Hahn et al., 1966). Tato hypotéza byla později potvrzena (Yielding et al., 1971).

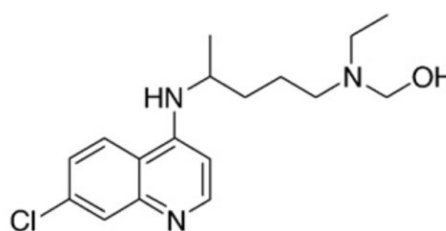
Hydroxychlorochin (HCQ) je méně toxickým analogem CQ s navázanou hydroxy skupinou na postranním řetězci. Poprvé byl syntetizován v roce 1946 (McChesney, 1983). HCQ a CQ mají podobnou strukturu a obdobný mechanismus působení (Liu et al., 2020).

Přínos užívání CQ/HCQ v rámci terapie virových onemocnění je intenzivně zkoumán zejména v případě HIV (Sperber et al., 1995, 1997). Mechanismy, jakými CQ na viry působí však nejsou univerzální a dosud plně objasněné. Mezi zkoumané účinky CQ spadá inhibice virové RNA dependentní RNA polymerázy a to jak interkalací do NA viru, tak vyvázáním iontů  $Zn^{2+}$  nutných pro její funkci. Alkalizace buněčných organel vedoucí k alteraci dějů v průběhu endocytózy a posttranslační modifikace virových proteinů. Dále vykazují schopnost imunomodulace (suprese produkce prozánětlivých cytokinů). Jiang (1996) dále uvádí schopnost CQ inhibovat (dosud neznámým mechanismem) Tat proteinem zprostředkovanou transaktivaci, klíčový krok v rámci životního cyklu HIV (diskutována v kap. Chinolony).

Zdá se však, že schopnost interkalace není dominantním jevem zodpovědným za vliv CQ na průběh virových infekcí.



Obrázek 7: Chlorochin (Solomon et al., 2009)



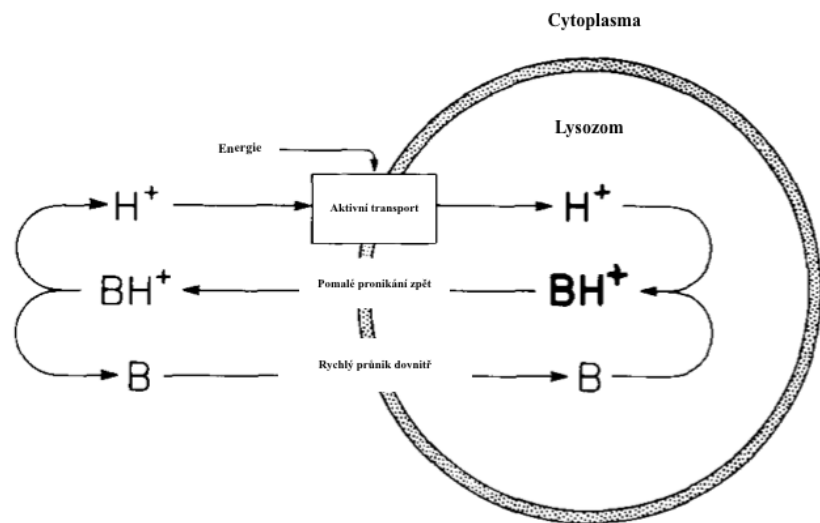
Obrázek 8: Hydroxychlorochin (Solomon et al., 2009)



## 5.1. Alkalizace buněčných organel

Ve své deprotonované formě je CQ lipofilní a tudíž schopen prostupu cytoplasmatickou membránou buněk. Jakožto slabá diprotická báze (Homewood et al., 1972) putuje do organel s nízkým pH (endosomy, Golgiho komplex, lysozomy), zde dochází k jeho protonaci, stává se hydrofilním a již nemůže prostupovat membránou. V dané organelle vzrůstá jeho koncentrace, což způsobuje zvýšení pH v těchto organelách (Ohkuma et al., 1981; Poole et al., 1981). CQ je tzv. „lysosomotropní látkou“ termín byl dle Ashfaqa (2011), zaveden De Duve (1974) a jeho spolupracovníky roku 1974 pro popis látek selektivně pronikajících do lysozomu“.

Obrázek 9: Model udržování pH lysozomu za přítomnosti lysozomotropní látky dle Polla a Okhuma, převzato a upraveno (Poole et al., 1981).



### 5.1.1. Inhibice glykosylace v kontextu viru HIV

Zvýšené pH v Golgi vede k inhibici terminální glykosylace posttranslačně modifikovaných proteinů. (Thorens et al., 1986). Příčinou je narušení funkce některých buněčných glykotransferáz, pro které je esenciální fyziologická hodnota pH (Rivinoja et al., 2009).

V případě infekce virem HIV byla pozorována produkce defektních virových partikulí se sníženou infektivitou, dané viriony na svém povrchu vykazovaly sníženou hladinu glykoproteinu gp120 (Tsai et al., 1990). Pozorovaný efekt je připisován snížené produkci jinak intenzivně glykosylovaného proteinu gp120 (A. Savarino et al., 2001). gp120 v rámci infekce HIV zprostředkovává vazbu virionu k povrchu buňky. A to interakcí s buněčným receptorem CD4 (Klatzmann et al., 1984, Bour et al., 1995). Následuje fúze membrán virové partikule a buňky zprostředkovaná gp41, což vede k depozici virové kapsidy do cytoplasmy (Marsh 1984, Freed et al., 1990). Savarino (2004) pozoroval synergický efekt CQ kombinovaného s inhibitory virových proteáz (PI). CQ dále zvyšoval citlivost HIV k daným IP, což by

potenciálně mohlo vést ke snížení terapeutických dávek PI v rámci antiretrovirové terapie a úlevě od vedlejších účinků spolu se snížením finančních nákladů.

### **5.1.2. Inhibice glykosylace a virového receptoru v kontextu koronavirů**

Alkalizace Golgiho aparátu vede k narušení terminální glykosylace proteinů (Thorens et al., 1986). Jedním z vysoce posttranslačně glykosylovaných proteinů, který tato inhibice ovlivňuje je membránový receptor ACE2 (angiotenzin-converting enzyme 2). Snížená glykosylace ACE2 pravděpodobně stojí za snížením jeho afinity ke koronavirovému S proteinu (spike protein), který zprostředkovává vazbu virové partikule na hostitelovu buňku (Vincent et al., 2005). Tento jev pravděpodobně stojí na pozadí pozorovaného snížení infekivity SARS-CoV v *in vitro* podmínkách (Vincent et al., 2005, Savarino et al., 2006).

### **5.1.3. Alkalizace endosomu a vstup viru do buňky**

Obalené viry využívají pro vstup do buňky několikero cest. Patří mezi ně zejména přímá fúze cytoplasmatické membrány s virovým obalem (např. HIV), kalveolin zprostředkovaná endocytóza a klatrinem zprostředkovaná endocytóza (CME clathrin mediated endocytosis). V rámci posledních dvou zmiňovaných je virová partikule po vazbě na příslušný receptor vtažena do membránového váčku, který se následně stává časným endosomem, dochází k jeho acidifikaci a mění se v pozdním endosom (MVB multi-vesicular-body), který následně fúzuje s lysozomem za vzniku endolysozomu. (Mellman et al., 1986; Doherty et al., 2009). Pokud by virová partikule nebyla schopná endosom včas opustit, došlo by k její degradaci.

Převážně klatrinem zprostředkovanou endocytózu využívá pro svůj vstup do buňky virus chřipky (Wang et al., 2009). Jedná se o obalený -ssRNA virus s helikální kapsidou. Spadající do čeledi Orthomyxoviridae v jejíž rámci rozlišujeme 4 různé typy (A, B, C a D) Genom je rozdělen 8 do (IAV, IBV) nebo 7 (ICV) segmentů. V rámci této práce se budu dále blíže věnovat primárně chřipkovému viru typu A. Přichycení IAV na membránu hostitelské buňky probíhá díky vazbě jeho povrchového proteinu hemaglutininu (HA) na zbytky kyseliny sialové nacházející se v terminálních oblastech buněčných membránových glykoproteinů a glykolipidů. Po úspěšné vazbě následuje CME. Cesta virionu pokračuje endosomem, kde snížení pH útrobu organely (na hodnotu ~ 5–5,5), vede k aktivitě virových obalových proteinů (změna konformace HA vede k odhalení HA2 podjednotky, která se vnoří do endosomální membrány) zajišťujících fúzi virové membrány s membránou endosomu (Yoshimura et al., 1982). Předpokládá se, že CQ/HCQ jakožto látky snižující pH endosomu, jsou schopny tomuto kroku virové infekce zabránit. Nízké endosomální pH dále aktivuje M2 iontový kanál, jehož

funkcí je okyselení virové kapsidy, což má za následek depozici virových ribonukleoproteinů (vRNPs) do buněčné cytoplasmy (Pinto et al., 2006).

Yoshimura (1982) pozoroval potlačení replikace IAV subtypu H1N1 pokud byl CQ přítomen během brzkého stadia infekce („CQ nebyl přidán déle jak 10 minut po inokulaci“).

Obdobné výsledky popisuje též Di Trani (2007) (pro H1N1, H3N2, H5N9 a další), dodávajíc, že „citlivost vůči CQ se u různých subtypů IAV liší, s nejvyšší pravděpodobností na základě odlišných nároků na výšku pH endosomu daných různým elektrostatickým potenciálem HA2 podjednotek“.

HCV je schopen průniku do buněk více než jedním způsobem (patří mezi ně též CME) (Matsuda et al., 2014). Vzhledem k tomu, že infektivita jako modelu využívaných retrovirových partikulí exprimujících na svém povrchu E1 a E2 glykoproteiny (HCVpp), byla závislá na pH, lze předpokládat, že po vazbě na příslušný receptor (jedním z nich je pravděpodobně CD81) dochází k endocytóze a pH mediovaném průniku (Hsu et al., 2003). Obdobný mechanismus vstupu (receptorem zprostředkovaná endocytóza) byl pozorován u řady dalších členů čeledi Flaviviridae. Předpokladem je, že vlivem snížení endosomálního pH dochází k aktivaci E1 glykoproteinu, který způsobí fúzi membrán virionu a pozdního endosomu (Flint et al., 1999). Vzhledem k pH dependentní povaze tohoto jevu se lze domnívat, že obdobně jako v případě CME IAV by mohl být inhibovatelný HCQ/CQ. Ashfaq (2011) tuto domněnku potvrzuje, CQ byl schopen inhibovat infekčnost HCVpp, obdobného názoru dosahuje též Blanchard (2006).

#### **5.1.4. Inhibice autofagie**

Alkalizace buněčných organel způsobená CQ však nevede jen ke zvratu glykosylace, ale také k potlačení autofagie. Zvýšením lysozomálního pH je docíleno inhibice fúze lysozomu s fagosomem, což vede k zamezení vzniku autolysozomu a degradaci jeho obsahu. (Seglen et al., 1979; Carew et al., 2011). Existují hypotézy, že autofagie (proces v jehož průběhu buňka degraduje poškozené, či zbytné části sebe sama) za normálních okolností buňce prospěšný jev, může v některých případech vést k indukci tzv. autofágní buněčné smrti („autophagic cell death“) (Kroemer et al., 2008; Jung et al., 2020).

Sun (2012) a jeho tým pozoroval masivní indukci autofagie v alveolárních epitelálních buňkách myši infikovaných subtypem IAV H5N1. Pozorovaný jev byl spojenou se zvýšeným poškozením plicní tkáně a pravděpodobně přispívá k rozvoji tzv. ARDS (acute respiratory distress syndrome), který je příčinou vysoké smrtnosti subtypu H5N1 (~ 60%) (Wang et al.,

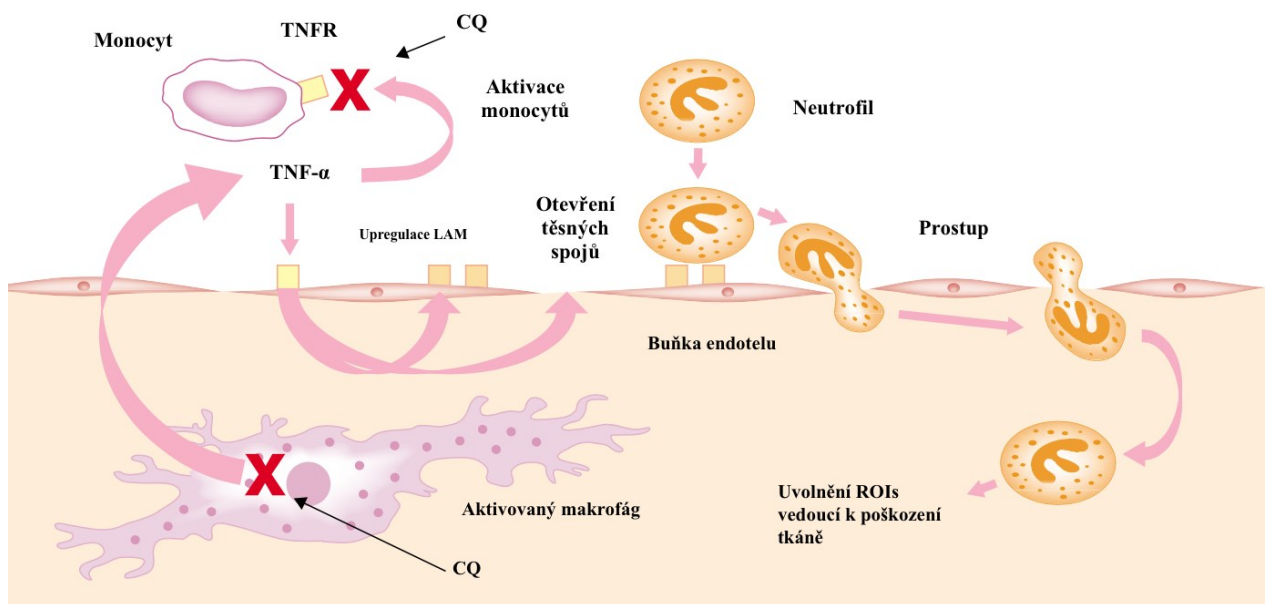
2009). Inhibice autofágie podáním CQ vedla k významnému zlepšení šancí na přežití u infikovaných myší. Je však nutno podotknout, že samotný koncept autofágií indukované buněčné smrti není dosud plně prozkoumán a je možné, že jedná „jen“ o buněčnou smrt z jiných příčin, provázenou autofágií. Kdy autofágie není příčinou, ale doprovodem buněčné smrti. Závěr že právě inhibice autofágie způsobená CQ vede k zlepšení vyhlídek na přežití hlodavců není, vzhledem k šíři účinků jakými CQ disponuje, dokonale průkazný (Kroemer et al., 2008). V rámci testování terapeutického vlivu CQ na myši infikované IAV subtypem H5N1 dospěl k pozitivním výsledkům také Yan (2013), pozoroval dramatické snížení mortality myší infikovaných H5N1, kterým byl podáván CQ. Yan dále zkoumal, zda lze CQ využít jakožto prostředek prevence před infekcí H5N1. Daná pozorování však nezaznamenala významný pozitivní vliv. V tomto souhlasí s Vigerustovou (2007) studií. Kdy CQ užíván jako prevence před infekcí IVA (subtypem H1N1) u myší a frettek, též nevykazoval signifikantní preventivní efekt. Vigerust navíc nezaznamenal ani žádné významné terapeutické účinky (z pohledu zlepšení zdravotního stavu) CQ u již infikovaných zvířat. (U infikovaných frettek neošetřených CQ však byla pozorována výrazně vyšší koncentrace viru v laváži nosních dutin).

Autofágie však není významným cílem antivirové terapie jen díky svému potenciálně patologickému vlivu. Zhou (2009) se domnívá, že autofágie hraje podpůrnou roli v rámci životního cyklu IAV, její inhibice (nebylo použito CQ/HCQ) vedla k supresi produkce virionů.

Jedna z teorií uvádí, že váčky, se kterými je asociován replikační komplex HCV jsou autofagosomálního původu, tento jev byl totiž pozorován již u jiného +RNA viru a to u poliviru (Suhy et al., 2000; Sir et al., 2012). Též je možné, že asistenční roli ve virové replikaci nehrají samotné váčky, ale autofagosomální proteolýza. Přesná role autofágie v rámci životního cyklu HCV není dosud plně objasněna. Bylo však pozorováno, že HCV je schopen indukovat vznik autofagosomů (Mohl et al., 2012) (též je schopen také jeho modelový replikon (Taguwa et al., 2011). Některé proteiny asociovaná s tímto procesem jsou dokonce schopné působit jako provirové faktory (*in vitro*) (Dreux et al., 2009) Dalo by se předpokládat, že inhibice autofágie HCQ/CQ by mohla vést k narušení životního cyklu HCV. Mizui (2010) reportuje potlačení HCV replikace za přítomnosti CQ, předpokládá, že mechanismem účinku je právě inhibice autofágie.

## 5.2.CQ a imunomodulace

CQ je díky svým protizánětlivým účinkům využíván v rámci terapie některých autoimunitních onemocnění (revmatoidní artritida, lupus). Kýžený efekt spočívá v inhibici produkce interleukinu 6 (IL-6) (Sperber et al., 1993), IL-1, TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor alfa) (Jeong et al., 1997, Karres et al., 1998). CQ je také schopen potlačit produkci interferonu gama a také snížit koncentraci TNFR (TNF- $\alpha$  receptor) na povrchu buněk (Jeong et al., 1997), čímž ještě více suprimuje TNF- $\alpha$  signalizaci. Překotná sekrece těchto prozánětlivých mediátorů v průběhu akutní infekce v plicní tkáni (IAV) vede k aktivaci monocytů a otevírá těsné spoje (tight-junctions) mezi buňkami endotelu, čímž usnadňuje vstup neutrofilů z lumen do tkáně, kde následně způsobují vedlejší škody při likvidaci infekce. Smrt buněk v důsledku uvolnění ROIs (reactive oxygen radicals) vede k dalšímu uvolňování prozánětlivých mediátorů a následná imunitní hyperaktivace může vést (ve spojení s dříve diskutovanou autofágií) k rozvoji ARDS. Uvedený mechanismus působení CQ na TNF- $\alpha$  signalizaci je zobrazen na obrázku číslo 10.



Obrázek. 10: Schéma vlivu CQ na TNFR zprostředkovanou imunitní odpověď, převzato a upraveno (Savarino et al., 2003).

Imunitní hyperaktivace v počátečních fázích akutní infekce HIV může představovat zdravotní riziko pro HIV pozitivní pacienty (Bentwich, et al., 2000). Spolu s vlivem na glykosylaci gp120 by tedy HCQ/CQ mohl být ku pomoci.

### 5.3. Srovnání antivirotických účinků CQ v *in vitro* a *in vivo* systémech

CQ je prokazatelně schopen *in vitro* suprimovat replikaci IAV (Ooi et al., 2006; Di Trani et al., 2007). Existují však případy, kdy byl pozorován nárůst produkce nových virionů (H1N1) u buněk ošetřených CQ oproti kontrole. Zdá se, že klíčovým faktorem je čas.

Wu (2015) v souladu s Ooi a di Trani pozoroval supresi IAV replikace, u buněk, které byly CQ vystaveny před infekcí, či velmi brzo po ní (ošetření CQ 45 minut před přidáním IAV) a zároveň nebyly vystaveny vlivu CQ po celou dobu infekce (médium vyměněno po 2 hodinách od přidání IAV). V tomto případě byla předpokládáným mechanismem účinku inhibice endocytózy alkalizací endosomálního pH. Pokud však byly infikované buňky vystaveny CQ i nadále (až 48 hodin) v průběhu infekce, Wu pozoroval signifikantní nárůst koncentrace hemaglutininu. Nárůst koncentrace HA odpovídá nárůstu produkce nových virových partikulí. Z tohoto pozorování Wu a jeho tým vyvozuje, že prodloužená inkubace CQ vede k podpoře virové replikace v infikovaných buňkách.

V rámci testování *in vivo* na zvířecím modelu byly publikovány relativně rozporuplné výsledky. Yan (2013) pozoroval významné navýšení životaschopnosti myší (infikovaných H5N1) ošetřených CQ (z 0% u kontrol na 70% s CQ, 8 den od infekce), úbytky tělesné hmotnosti (kritérium využívané pro zhodnocení průběhu infekce chřipkovým virem na myším modelu) byly též sníženy. Jakožto preventivní prostředek, však CQ nevykazoval významný efekt. Snížení smrtnosti myší infikovaných H5N1 pozoroval též Sun (2012). Naproti tomu Vigerust (2007) nezaznamenal na myším ani fretčím modelu (po infekci H1N1) signifikantní zlepšení zdravotního stavu, pokud byl CQ využit terapeuticky. Významné výsledky nemělo ani testování CQ jako prostředku prevence.

Pokud jde o možnosti využití CQ jakožto prevence před infekcí H1N1 u lidí, Paton (2011) v průběhu studie (dvojitě zaslepené, placebem kontrolované) probíhající během chřipkové epidemie neznamenal žádný významný preventivní efekt.

V experimentech *in vitro* bylo pozorováno snížení infekivity produkovaných virionů HIV (Tsai et al., 1990) i potlačení virové replikace v rámci buněčné kultury T lymfocytů a monocytů (Sperber et al., 1993). V rámci *in vivo* terapie HIV pozitivních pacientů bylo pozorováno snížení koncentrace HIV virionů v krvi pacientů (užívajících HCQ) (Sperber et al., 1995; 1997). Naproti tomu Paton (2012) v rámci zaslepené, placebem kontrolované studie pozoroval nárůst koncentrace HIV virionů v krvi osob užívajících HCQ. Možným vysvětlením jsou, dle Patona, protizánětlivé účinky HCQ, které mohly vést k oslabení imunitní odpovědi namířené proti HIV infikovaným buňkám pacientů.

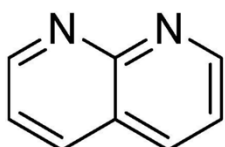
V *in vitro* systému byla reportována schopnost CQ potlačit replikaci HCV replikonu (Mizui et al., 2010). Pilotní studie na malém vzorku HCV pozitivních pacientů ukazuje, že skupina, které byl podáván CQ vykazuje nižší koncentraci virové RNA v krvi. Zdá se tedy, že CQ potlačuje replikaci HCV v lidském systému a mohl by být potenciálním kandidátem pro další výzkum v rámci léčby hepatitidy C (Peymani et al., 2016).

## 6. Chinolony

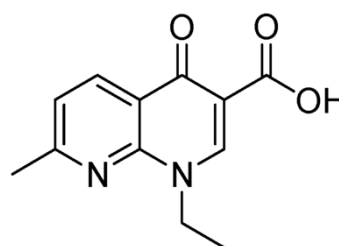
Chinolony jsou deriváty naphthyridinu (viz obr. 11), jedním z prvních izolovaných chinolonů byla kyselina nalixidová (viz obr. 12). Jedná se o vedlejší produkt syntézy dříve diskutovaného chlorochinu. Poprvé byla identifikována a popsána Lesherm a jeho týmem v 50. letech 20. století (Leshner et al., 1962, převzato z Bisacchi, 2015). Látka vykazovala *in vitro* antibakteriální působení a brzy se chinolonové deriváty uchytily coby účinná antibiotika (Emmerson et al., 2003). Chinolony dnes můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin. Fluorochinolony, obsahující atom fluoru na pozici C6 a 6-amino-chinolony, mající na téže pozici amino skupinu (Cecchetti et al., 1995).

Mechanismem působení chinolonových antibiotik spočívá ve stabilizaci ternárního komplexu gyrázy (bakteriální topoizomerázy II) a topoizomerázy IV interagující s bakteriální DNA. Tento jev vede k inhibici replikace. Předpokládaným mechanismem účinku je přímá interakce s proteinem a částečná interkalace chinolonu do dsDNA (Laponogov et al., 2009). Za interkalaci jsou zodpovědná 2 kondenzovaná benzenová jádra oplývající vysokou hustotou  $\pi$  elektronů, umožňující formaci stacking interakcí. Připojené zbytky jsou schopny vazby do velkého, nebo malého žlábků (v případě vazby do dsDNA) (Llorente et al., 1996)

Dle recentních studií jsou chinolony schopné inhibovat také virovou replikaci. Mechanismus účinku se zdá být obdobným, tedy interakce s proteiny zajišťujícími processing virového genomu a interkalace. Jeden z těchto derivátů, 4-chinolon elvitegravir, je potentním inhibitorem HIV integrázy a využívá se v aktuální antiretrovirové terapii (Wang et al., 2019).



Obrázek. 11: 1,8-naphthyridin (Fuertes et al., 2020).



Obrázek. 12: kyselina nalixidová (Naeem et al., 2016).

### **6.1. Inhibice HIV integrázy**

Byla pozorována schopnost chinolon-3-karboxylových kyselin inhibovat funkci integrázy. Ta je klíčovým enzymem životního cyklu HIV. Zprostředkovává neselektivní integraci virové DNA po reverzní transkripci do hostitelova chromosomu. Celý proces se sestává ze 2 hlavních kroků. V prvním (probíhajícím ještě v cytoplasmě hostitelské buňky) nasedá integráza na čerstvě reverzně transkribovanou virovou DNA a katalyzuje odštěpení posledních 2 nukleotidů z jejich 3' konců ( $3'-\text{CAGT} \rightarrow 3'\text{CA-OH}$ ), vzniká tím na nich reaktivní -OH skupina nutná pro další krok. Po přesunu do buněčného jádra katalyzuje integráza nukleofilní atak OH skupiny virové DNA na DNA hostitelskou, tzv. strand transfer. Následuje ligace a HIV je integrován ve formě proviru. (Chiu et al., 2004). Vzhledem ke své jedinečnosti, je integrace HIV slibným cílem v rámci vývoje antiretrovirotik.

Chinolon-3-karboxylové kyseliny obsahují strukturní motiv shodný s motivem některých dalších inhibitorů integrázy. Jedná se o přítomnost dvou vzájemně koplanárních keto skupin s jednou karboxylovou (diketokyseliny), případně jedné keto skupiny a jedné karboxylové (monoketokyseliny). S využitím této znalosti byly syntetizovány nové potentní inhibitory integrázy (Sato et al., 2006). Mechanismem působení sloučenin obsahujících tento motiv je inhibice strand transferu (Hazuda et al., 2000). Předpokládá se, že deriváty chinolon-3-karboxylových kyselin tohoto dosahují jak přímou interakcí s enzymem vazbou do jeho aktivního místa. Tak schopností chelatovat  $\text{Mg}^{2+}$  ionty (Dayam et al., 2008; Hajimahdí et al., 2016), které integráze slouží jakožto kofaktor (odstiňují negativní náboje fosfátových skupin fosfodiesterové kostry nukleových kyselin) a jsou nezbytné pro její správnou funkci.

Byla popsána schopnost některých derivátů chinolonů (3-heterocyklyl chinolony) potlačit funkci NS5B. NS5B je HCV RNA dependentní RNA polymeráza, zodpovídající za replikaci virového genomu. Inhibice její funkce je tedy zásahem do esenciálního kroku životního cyklu viru. Principem je vazba chinolonu do alosterického místa 2 (obsahujícího hydrofobní štěrbinu). Předpokládá se, že tato oblast polymerázy hraje roli v průběhu její polymerizace (Kumar et al., 2012; Chinnaswamy et al., 2010).

### **6.2. Inhibice Tat proteinem zprostředkované transaktivace**

Transkripce provirové DNA HIV je zprostředkovávaná buněčnou RNA polymerázou II. Za normálních okolností je transkripce provirové DNA neúplná. CTD RNAPII (C terminální doména) není dostatečně fosforylovaná pro udržení elongace a dochází k předčasné terminaci (Laspia et al., 1989). Ta je ještě podpořena přítomností proteinu NELF (negative elongation



factor). HIV však umí tuto komplikaci vyřešit. Tat protein (produkt genu *tat*) se váže na komplex P-TEFb (RNAPII elongation factor), který jako svojí katalytickou podjednotku obsahuje kinázu CDK9 a cyklin T1 (Wei et al., 1998). Komplex Tat/P-TEFb se následně váže na TAR (Tat responsive element) sekvenci nacházející se na, dle provirové DNA, nově syntetizovaném RNA vláknu. Katalytická podjednotka P-TEFb je poté schopna fosforylovat NELF, čímž způsobí jeho odstoupení a zároveň fosforyluje polymerázovou CTD. Tato akce vede k zachování elongace a dokončení transkripce (Kao et al., 1987).

Fluorochinolony jsou schopné s tímto procesem interferovat. Baba 1997 reportoval inhibici replikace HIV v přítomnosti derivátu K12. Vzhledem k tomu, že K12 nenarušoval funkci RT ani IN a byl schopen potlačit TNF- $\alpha$  indukovanou transkripci HIV v chronicky infikovaných buňkách. Dospěl Baba k závěru, že mechanismus působení spočívá v dosud neznámé interakci s komponenty transaktivace zprostředkované Tat proteinem. Dle Cecchetti (2000) jsou deriváty 6-aminochinolonů schopné vazby do nukleových kyselin HIV a vytvářejí komplexy s virovou TAR RNA. Pozorované chinolony (WM5) se vážaly do stem-bulge regionu TAR. Výsledná kompetice mezi Tat a chinolonem vede k supresi transaktivace (Richter et al., 2004). Chinolony jsou také schopny vyvázat Mg<sup>2+</sup> ionty, což by také mohlo negativně ovlivňovat průběh transaktivace. Zdá se, že dvoumocné ionty kovů mají na její průběh vliv, neboť TAR RNA v jejich přítomnosti mění konformaci (Zacharias et al., 1995; Parolin et al., 2003).

## 7. Závěr

DNA/RNA interkalační činidla jsou látky disponující řadou účinků, kterými interferují s životním cyklem virů. Tato práce shrnuje mechanismy antivirového působení tří významných tříd interkalačních činidel, a to akridinů, chinolinů a chinolonů.

Akridiny a jejich deriváty jsou historicky nejdéle známé interkalátory. Hlavní těžiště jejich protivirových účinků spočívá v narušení interakce replikačních enzymů s virovou nukleovou kyselinou, potlačení virové transkripce inhibicí NF- $\kappa$ B kaskády a povzbuzení imunitní odpovědi organismu indukci interferonu způsobenou aktivací cGAS-STING kaskády.

Další skupina interkalátorů, chinoliny jsou primárně využívány pro své antiparazitické účinky v rámci terapie malárie, jejich schopnost alkalizovat buněčné organely však přináší protivirový efekt v podobě potlačení na nízkém pH závislých kroků virové endocytózy a glykosylace virových proteinů. Jejich protizánětlivé účinky, poté mohou zmírňovat některé vážné komplikace respiračních infekcí, například syndrom akutní dechové tísně.

Poslední skupina, chinolony jsou světu známy coby účinná antibiotika. Jsou však také schopny potlačit funkci integrázy a inhibovat průběh Tat proteinem způsobené transaktivace viru lidské imunodeficiencie.

Naneštěstí je vzhledem k pleitropii, kterou účinky interkalačních činidel disponují, studium jejich vlivu na živé systémy relativně obtížné. Mnohé mechanismy vedoucí k potlačení virové replikace, nejsou dosud uspokojivě popsány. Taktéž je nutno podotknout, že výzkum interkalátorů v kontextu antivirotik je poodsunut do stínu, který vrhají jiná, aktuálně více efektivní a specifická terapeutika (inhibitory proteáz a nukleosidové analogy v případě HIV, nebo inhibitory neuramidázy v případě viru chřipky). Výzkum interkalátorů by však, vzhledem k nemilé vlastnosti virů neustále přicházet s novými metodami rezistence, neměl ustávat.

### Seznam použité literatury:

(\* značeny sekundární citace a přehledové články).

Adams, A. (2002). Crystal structures of acridines complexed with nucleic acids. *Current Medicinal Chemistry*, 9(18), 1667–1675.

Andersag, H., Breitner, S., Jung, H., (1942). Quinoline compound and process of making the same. German Pat. 683 692. Chem. Abstr. 36, 4973.

Ashfaq, U. A., Javed, T., Rehman, S., Nawaz, Z., Riazuddin, S. (2011). Lysosomotropic agents as HCV entry inhibitors. *Virology Journal*, 8(1), 163.

Baba, M., Okamoto, M., Makino, M., Kimura, Y., Ikeuchi, T., Sakaguchi, T., Okamoto, T. (1997). Potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transcription by piperazinyloxoquinoline derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(6), 1250–1255.

\*Baba, M. (2004). Inhibitors of HIV-1 Gene Expression and Transcription. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 4(9), 871–882.

Bachur, N. R., Yu, F., Johnson, R., Hickey, R., Wu, Y., Malkas, L. (1992). Helicase inhibition by anthracycline anticancer agents. *Molecular Pharmacology*, 41(6), 993–998.

\*Bailly, C. (2000). Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Current Medicinal Chemistry*, 7(1), 39–58.

Bentwich, Z., Maartens, G., Torten, D., Lal, A. A., Lal, R. B. (2000). Concurrent infections and HIV pathogenesis. *AIDS (London, England)*, 14(14), 2071–2081.

\*Bisacchi, G. S. (2015). Origins of the Quinolone Class of Antibacterials: An Expanded ‘Discovery Story’. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(12), 4874–4882.

Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., Rouillé, Y. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology*, 80(14), 6964–6972.

Bour, S., Geleziunas, R., Wainberg, M. A. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiological Reviews*, 59(1), 63–93.

a) Browning, C. H., Cohen, J. B., Gulbransen, R. (1922). The Antiseptic Properties of Cyanide Dyes. *British Medical Journal*, 1(3196), 514–515.

b) Browning, C., H., Cohen, J. B., Gaunt, R., Gulbransen, R. (1922). Relationships between antiseptic action and chemical constitution with special reference to compounds of the pyridine, quinoline, acridine and phenazine series. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 93(653).

Carew, J. S., Espitia, C. M., Esquivel, J. A., Mahalingam, D., Kelly, K. R., Reddy, G., Giles, F., J., Nawrocki, S. T. (2011). Lucanthone Is a Novel Inhibitor of Autophagy That Induces Cathepsin D-mediated Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 286(8), 6602–6613.

Cecchetti, V., Clementi, S., Cruciani, G., Fravolini, A., Pagella, P. G., Savino, A., Tabarrini, O. (1995). 6-Aminoquinolones: A new class of quinolone antibacterials? *Journal of Medicinal Chemistry*, 38(6), 973–982.

Chevaliez, S., Pawlotsky, J.-M. (2006). HCV Genome and Life Cycle. In S.-L. Tan (Ed.), *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Norfolk (UK): Horizon Bioscience.

Chinnaswamy, S., Cai, H., Kao, C. (2010). An update on small molecule inhibitors of the HCV NS5B polymerase: Effects on RNA synthesis *in vitro* and in cultured cells, and potential resistance in viral quasispecies. *Virus Adaptation and Treatment*, 2, 73–89.

\*Chiu, T. K., Davies, D. R. (2004). Structure and function of HIV-1 integrase. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 4(9), 965–977.

Chou, A., C., Fitch, C., D. (1992) Heme polymerase: modulation by chloroquine treatment of a rodent malaria. *Life Sci.* 51: 2073-2078.

Dayam, R., Al-Mawsawi, L. Q., Zawahir, Z., Witvrouw, M., Debyser, Z., Neamati, N. (2008). Quinolone 3-Carboxylic Acid Pharmacophore: Design of Second Generation HIV-1 Integrase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(5), 1136–1144.

de Duve, C., de Barse, T., Poole, B., Trouet, A., Tulkens, P., Van Hoof, F. (1974). Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochemical Pharmacology*, 23(18), 2495–2531.

Di Trani, L., Savarino, A., Campitelli, L., Norelli, S., Puzelli, S., D'Ostilio, D., Vignolo, E., Donatelli, I., Cassone, A. (2007). Different pH requirements are associated with divergent inhibitory effects of chloroquine on human and avian influenza A viruses. *Virology Journal*, 4(1), 39.

Diederich, J., Lodemann, E., Wacker, A. (1973). Basic dyes as inducers of interferon-like activity in mice. *Archiv Für Die Gesamte Virusforschung*, 40(1–2), 82–86.

Doherty, G. J., McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 857–902.

Dreux, M., Chisari, F. V. (2009). Autophagy proteins promote hepatitis C virus replication. *Autophagy*, 5(8), 1224–1225.

\*Drlica, K., Hiasa, H., Kerns, R., Malik, M., Mustaev, A., & Zhao, X. (2009). Quinolones: Action and Resistance Updated. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9, 981–998

Duh, E. J., Maury, W. J., Folks, T. M., Fauci, A. S., Rabson, A. B. (1989). Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(15), 5974–5978

\*Emmerson, A. M., Jones, A. M. (2003). The quinolones: Decades of development and use. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51 Suppl 1, 13–20.

Fitch, C., D. (1983) Mode of action of antimalarial drugs. In: *Malaria and the Red Cell*, Ciba Foundation Symposium 94, pp. 222-232, Pitman Press, London.

Flint, Mike, Maidens, C., Loomis-Price, L. D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Higginbottom, A., Levy, S., McKeating, J. A. (1999). Characterization of Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein Interaction with a Putative Cellular Receptor, CD81. *Journal of Virology*, 73(8), 6235–6244.

Flint, M., McKeating, J. A. (2000). The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection. *Reviews in Medical Virology*, 10(2), 101–117.

Frederick, C. A., Williams, L. D., Ughetto, G., van der Marel, G., A., van Boom, J., H., Rich, A., Wang, A., H,-J. (1990). Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: Adriamycin and daunomycin. *Biochemistry*, 29, 2538-2549.

Freed, E. O., Myers, D. J., Risser, R. (1990). Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4650–4654.

\*Fuertes, M., Masdeu, C., Martín-Encinas, E., Selas, A., Rubiales, G., Palacios, F., Alonso, C. (2020). Synthetic Strategies, Reactivity and Applications of 1,5-Naphthyridines. *Molecules*.

Fujiwara, M., Okamoto, M., Okamoto, M., Watanabe, M., Machida, H., Shigeta, S., Konno, K., Yokota, T., Baba, M. (1999). Acridone derivatives are selective inhibitors of HIV-1 replication in chronically infected cells. *Antiviral Research*, 43(3), 189–199.

Gago, F. (1998). Stacking Interactions and Intercalative DNA Binding. *Methods*, 14(3), 277–292.

\*Goftar, M., Moradi-Kor, N., Kor, Z. (2014). DNA INTERCALATORS AND USING THEM AS ANTICANCER DRUGS. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2, 812–822.

Hahn, F. E., O'Brien, R. L., Ciak, J., Allison, J. L., Olenick, J. G. (1966). Studies on modes of action of chloroquine, quinacrine, and quinine and on chloroquine resistance. *Military Medicine*, 131(9), Suppl:1071-1089.

Hajimahdi, Z., Zabihollahi, R., Aghasadeghi, M. R., Ashtiani, S. H., Zarghi, A. (2016). Novel quinolone-3-carboxylic acid derivatives as anti-HIV-1 agents: Design, synthesis, and biological activities. *Medicinal Chemistry Research*, 9(25), 1861–1876.

Hazuda, D. J., Felock, P., Witmer, M., Wolfe, A., Stillmock, K., Grobler, J. A., Espeseth, A., Gabryelski, L., Schleif, W., Blau, C., Miller, M. D. (2000). Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5453), 646–650.

Hess, S., Davis, W. B., Voityuk, A. A., Rösch, N., Michel-Beyerle, M. E., Ernsting, N. P., Kovalenko, S., A., Lustres, J. L. P. (2002). Excited-State Photophysics of an Acridine Derivative Selectively Intercalated in Duplex DNA. *ChemPhysChem*, 3(5), 452–455.

Homewood, C. A., Warhurst, D. C., Peters, W., Baggaley, V. C. (1972). Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquine. *Nature*, 235(5332), 50–52.

Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C. M., McKeating, J. A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(12), 7271–7276.

Ihmels, H., Otto, D., (2005). Intercalation of Organic Dye Molecules into Double-Stranded DNA General Principles and Recent Developments. *Top Current Chemistry*, 258, 161-204.

Irvin, J. L., Irvin, E. M., Parker, F. S. (1949). The Interaction of Antimalarials with Nucleic Acids: I. Acridines: II. Quinolines. *Science*, 110(2860), 426–428.

Ishikawa, H., Ma, Z., Barber, G. N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*, 461(7265), 788–792.

Jeong, J. Y., Jue, D. M. (1997). Chloroquine inhibits processing of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *The Journal of Immunology*, 158(10), 4901–4907.

Jiang, M.-C., Lin, J.-K., Chen, S. S.-L. (1996). Inhibition of HIV-1 Tat-Mediated Transactivation by Quinacrine and Chloroquine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226(1), 1–7.

Jung, S., Jeong, H., Yu, S.-W. (2020). Autophagy as a decisive process for cell death. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(6), 921–930.

Kao, S. Y., Calman, A. F., Luciw, P. A., Peterlin, B. M. (1987). Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature*, 330(6147), 489–493.

Karres, I., Kremer, J.-P., Dietl, I., Steckholzer, U., Jochum, M., Ertel, W. (1998). Chloroquine inhibits proinflammatory cytokine release into human whole blood. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 274(4), R1058–R1064.

Kolykhalov, A. A., Mihalik, K., Feinstone, S. M., Rice, C. M. (2000). Hepatitis C Virus-Encoded Enzymatic Activities and Conserved RNA Elements in the 3' Nontranslated Region Are Essential for Virus Replication In Vivo. *Journal of Virology*, 74(4), 2046–2051.

Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T., Gluckham, J.-C., Montagnier, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, 312(5996), 767–768.

\*Kroemer, G., Levine, B. (2008). Autophagic cell death: The story of a misnomer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(12), 1004–1010.

Krönke, M., Schütze, S., Scheurich, P., Meichle, A., Hensel, G., Thoma, B., Kruppa, G., Pfizenmaier, K. (1990). Tumour necrosis factor signal transduction. *Cellular Signalling*, 2(1), 1–8.

Kumar, D. V., Rai, R., Brameld, K. A., Riggs, J., Somoza, J. R., Rajagopalan, R., Janc, J., W., Xia, Y., M., Ton, T., L., Huiyong, H., Lehoux, I., Ho, J., D., Young, W., B., Hart, B., Green, M. J. (2012). 3-Heterocyclyl quinolone inhibitors of the HCV NS5B polymerase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(1), 300–304.

Laponogov, I., Sohi, M. K., Veselkov, D. A., Pan, X.-S., Sawhney, R., Thompson, A. W., McAuley, K., E., Fisher, L., M., Sanderson, M. R. (2009). Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(6), 667–669.

Laspia, M. F., Rice, A. P., Mathews, M. B. (1989). HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell*, 59(2), 283–292.

Lerman, L. S. (1961). Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *Journal of Molecular Biology*, 3(1), 18-IN14.

Lerman, L. S. (1963). THE STRUCTURE OF THE DNA-ACRIDINE COMPLEX\*.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 49(1), 94–102.

\*Liu, J., Cao, R., Xu, M., Wang, X., Zhang, H., Hu, H., Li, Y., Hu, Z., Zhong, W., Wang, M. (2020). Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro. *Cell Discovery*, 6(1).

Llorente, B., Leclerc, F., Cedergren, R. (1996). Using SAR and QSAR analysis to model the activity and structure of the quinolone—DNA complex. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 4(1), 61–71.

Luzzati, V., Masson, F., Lerman, L. S. (1961). Interaction of DNA and proflavine: A small-angle X-ray scattering study. *Journal of Molecular Biology*, 3(5), 634–639.

\*Marsh, M. (1984). The entry of enveloped viruses into cells by endocytosis. *Biochemical Journal*, 218(1), 1–10.

Matsuda, M., Suzuki, R., Kataoka, C., Watashi, K., Aizaki, H., Kato, N., Yoshiharu, M., Suzuki, T., Wakita, T. (2014). Alternative endocytosis pathway for productive entry of hepatitis C virus. *Journal of General Virology*, 95(12), 2658–2667.

McChesney, E. W. (1983). Animal toxicity and pharmacokinetics of hydroxychloroquine sulfate. *The American Journal of Medicine*, 75(1A), 11–18.

Medhi, C., Mitchell, J. B. O., Price, S. L., Tabor, A. B. (1999). Electrostatic factors in DNA intercalation. *Biopolymers*, 52(2), 84–93.

Mellman, I., Fuchs, R., Helenius, A. (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annual Review of Biochemistry*, 55, 663–700.

Mizui, T., Yamashina, S., Tanida, I., Takei, Y., Ueno, T., Sakamoto, N., Ikejima, K., Kitamura, T., Enomoto, N., Sakai, T., Kominami, E., Watanabe, S. (2010). Inhibition of hepatitis C virus replication by chloroquine targeting virus-associated autophagy. *Journal of Gastroenterology*, 45(2), 195–203.

Mohl, B.-P., Tedbury, P. R., Griffin, S., Harris, M. (2012). Hepatitis C Virus-Induced Autophagy Is Independent of the Unfolded Protein Response. *Journal of Virology*, 86(19), 10724–10732.

Mousavizadeh, A., Bamdad, T., Abdoli, A., Choobin, H. (2018). Effect of Chloroquine on Autophagic Process in PBMCs of Chronic HCV Patients. *Iranian Journal of Allergy, Asthma & Immunology*, 17, 228–229.



\*Naeem, A., Badshah, S., Muska, M., Ahmad, N., Khan, K. (2016). The Current Case of Quinolones: Synthetic Approaches and Antibacterial Activity. *Molecules*.

Ohkuma, S., Poole, B. (1981). Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances. *Journal of Cell Biology*, 90(3), 656–664.

Okamoto, M., Okamoto, T., Baba, M. (1999). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by combination of transcription inhibitor K-12 and other antiretroviral agents in acutely and chronically infected cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(3), 492–497.

Ooi, E. E., Chew, J. S. W., Loh, J. P., Chua, R. C. (2006). In vitro inhibition of human influenza A virus replication by chloroquine. *Virology Journal*, 3(1), 39.

Oster, G. (1951). Fluorescence quenching by nucleic acids. *Transactions of the Faraday Society*, 47, 660.

Parolin, C., Gatto, B., Del Vecchio, C., Pecere, T., Tramontano, E., Cecchetti, F., Frolini, A., Masiero, S., V., Palù, G. (2003). New anti-human immunodeficiency virus type 1 6-aminoquinolones: Mechanism of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 889–896.

Paton, N. I., Lee, L., Xu, Y., Ooi, E. E., Cheung, Y. B., Archuleta, S., Wong, G., Wilder-Smith, A. (2011). Chloroquine for influenza prevention: A randomised, double-blind, placebo controlled trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(9), 677–683.

Paton, N. I., Goodall, R. L., Dunn, D. T., Franzen, S., Collaco-Moraes, Y., Gazzard, B. G., Williams, I. G., Fisher, M., J., Winston, A., Fox, J., Orkin, C., Herieka, E., A., Ainsworth, J., G., Post, F., A., Wansbrough-Jones, M., Kelleher, P. Hydroxychloroquine Trial Team, for the. (2012). Effects of Hydroxychloroquine on Immune Activation and Disease Progression Among HIV-Infected Patients Not Receiving Antiretroviral Therapy: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 308(4).

Pépin, G., Nejad, C., Thomas, B. J., Ferrand, J., McArthur, K., Bardin, P. G., Williams, B., R., G., Gantier, M. P. (2017). Activation of cGAS-dependent antiviral responses by DNA intercalating agents. *Nucleic Acids Research*, 45(1), 198–205.

Peymani, P., Yeganeh, B., Sabour, S., Geramizadeh, B., Fattahi, M., R., Keyvani, H., Azarpira, N., Coombs, K., M., Ghavami, S., Lankarani, K., B. (2016). New use of an old drug: Chloroquine reduces viral and ALT levels in HCV non-responders (a randomized, triple-blind, placebo-controlled pilot trial). *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 94(6), 613–619.

Pinto, L. H., Lamb, R. A. (2006). The M2 Proton Channels of Influenza A and B Viruses \*.

Journal of Biological Chemistry, 281(14), 8997–9000.

Poole, B., Ohkuma, S. (1981). Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages. *Journal of Cell Biology*, 90(3), 665–669.

Potts, G. D., Jones, W. (1995). 9(10H)-Acridone. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 51(2), 267–268.

Rao, S. N., Kollman, P. A. (1987). Molecular mechanical simulations on double intercalation of 9-amino acridine into d(CGCGCGC) X d(GCGCGCG): Analysis of the physical basis for the neighbor-exclusion principle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(16), 5735–5739.

Řeha, D., Kabeláč, M., Ryjáček, F., Šponer, J., Šponer, J. E., Elstner, M., Suhai, S., Hobza, P. (2002). Intercalators. 1. Nature of Stacking Interactions between Intercalators (Ethidium, Daunomycin, Ellipticine, and 4',6-Diaminide-2-phenylindole) and DNA Base Pairs. *Ab Initio Quantum Chemical, Density Functional Theory, and Empirical Potential Study*. *Journal of the American Chemical Society*, 124(13), 3366–3376. doi: 10.1021/ja011490d

Richter, S., Parolin, C., Palumbo, M., Palù, G. (2004). Antiviral properties of quinolone-based drugs. *Current Drug Targets. Infectious Disorders*, 4(2), 111–116.

Richter, S., Parolin, C., Palumbo, M., Palù, G. (2004). Antiviral properties of quinolone-based drugs. *Current Drug Targets. Infectious Disorders*, 4(2), 111–116.

\*Riva, L., Dubuisson, J. (2019). Similarities and Differences Between HCV Pseudoparticle (HCVpp) and Cell Culture HCV (HCVcc) in the Study of HCV. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1911, 33–45.

Rivinoja, A., Hassinen, A., Kokkonen, N., Kauppila, A., Kellokumpu, S. (2009). Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases. *Journal of Cellular Physiology*, 220(1), 144–154.

\*Rupar, J., Dobričić, V., Aleksić, M., Brborić, J., Čudina, O. (2018). A review of published data on acridine derivatives with different biological activities. *Kragujevac Journal of Science*, 83–101.

Sato, M., Motomura, T., Aramaki, H., Matsuda, T., Yamashita, M., Ito, Y., Kawakami, H., Matsuzaki, Y., Watanabe, W., Yamataka, K., Ikeda, S., Kodama, E., Matsuoka, M., Shinkai, H. (2006). Novel HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from Quinolone Antibiotics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(5), 1506–1508.

Savarino, A., Gennero, L., Chen, H. C., Serrano, D., Malavasi, F., Boelaert, J. R., ) Sperber, K. (2001). Anti-HIV effects of chloroquine: Mechanisms of inhibition and spectrum of activity. *AIDS* (London, England), 15(17), 2221–2229.

\*Savarino, Adrea, Boelaert, J. R., Cassone, A., Majori, G., Cauda, R. (2003). Effects of chloroquine on viral infections: An old drug against today's diseases. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(11), 722–727.

Savarino, Andrea, Lucia, M. B., Rastrelli, E., Rutella, S., Golotta, C., Morra, E., Tamburrini, E., Perno, C., F., Boelaert, J., H., Sperber, K., Cauda, R. (2004). Anti-HIV Effects of Chloroquine: Inhibition of Viral Particle Glycosylation and Synergism With Protease Inhibitors. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 35(3), 223–232.

\*Savarino, Andrea, Trani, L. D., Donatelli, I., Cauda, R., Cassone, A. (2006). New insights into the antiviral effects of chloroquine. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(2), 67–69.

Seglen, P., O., Grinde, B., Solheim, A., E. Inhibition of the lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes by ammonia, methylamine, chloroquine and leupeptin. *Eur J Biochem*. 1979 Apr 2;95(2):215–225.

Sepúlveda, C., Fascio, M., García, C., D'Accorso, N., Damonte, E. (2013). Acridones As Antiviral Agents: Synthesis, Chemical and Biological Properties. *Current Medicinal Chemistry*, 20.

Sir, D., Kuo, C., Tian, Y., Liu, H. M., Huang, E. J., Jung, J. U., Machida, K., Ou, J. J. (2012). Replication of Hepatitis C Virus RNA on Autophagosomal Membranes \*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(22), 18036–18043.

\*Solomon, V. R., Lee, H. (2009). Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *European Journal of Pharmacology*, 625(1), 220–233.

Sperber, K., Quraishi, H., Kalb, T. H., Panja, A., Stecher, V., Mayer, L. (1993). Selective regulation of cytokine secretion by hydroxychloroquine: Inhibition of interleukin 1 alpha (IL-1-alpha) and IL-6 in human monocytes and T cells. *The Journal of Rheumatology*, 20(5), 803–808.

Sperber, Kirk, Louie, M., Kraus, T., Proner, J., Sapira, E., Lin, S., Stecher, V., Mayer, L. (1995). Hydroxychloroquine treatment of patients with human immunodeficiency virus type 1. *Clinical Therapeutics*, 17(4), 622–636.

Sperber, Kirk, Chiang, G., Chen, H., Ross, W., Chusid, E., Gonchar, M., Chow, R., Liriano, O. (1997). Comparison of hydroxychloroquine with zidovudine in asymptomatic patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Clinical Therapeutics*, 19(5), 913–923.

Stankiewicz-Drogon, A., Palchykovska, L. G., Kostina, V. G., Alexeeva, I. V., Shved, A. D., Boguszewska-Chachulska, A. M. (2008). New acridone-4-carboxylic acid derivatives as potential inhibitors of Hepatitis C virus infection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(19),

8846–8852.

Stankiewicz-Drogoń, A., Dörner, B., Erker, T., Boguszevska-Chachulska, A. M. (2010). Synthesis of New Acridone Derivatives, Inhibitors of NS3 Helicase, Which Efficiently and Specifically Inhibit Subgenomic HCV Replication. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(8), 3117–3126.

Suhy, D. A., Giddings, T. H., Kirkegaard, K. (2000). Remodeling the Endoplasmic Reticulum by Poliovirus Infection and by Individual Viral Proteins: An Autophagy-Like Origin for Virus-Induced Vesicles. *Journal of Virology*, 74(19), 8953–8965.

Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 786–791.

Sun, Y., Li, C., Shu, Y., Ju, X., Zou, Z., Wang, H., Rao, S., Guo, F., Liu, H., Nan, W., Zhao, Y., Yan, Y., Tang, J., Zhao, C., Yang, P., Liu, K., Wang, S., Lu, H., Li, X., Tan, L., Gao, R., Song, J., Gao, X., Tian, X., Qin, Y., Xu, K.-F., Li, D., Jin, N., Jiang, C. (2012). Inhibition of Autophagy Ameliorates Acute Lung Injury Caused by Avian Influenza A H5N1 Infection. *Science Signaling*, 5(212), ra16–ra16.

Swingler, S., Morris, A., Easton, A. (1994). Tumour necrosis factor alpha and interleukin-1 beta induce specific subunits of NFkB to bind the HIV-1 enhancer: Characterisation of transcription factors controlling human immunodeficiency virus type 1 gene expression in neural cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 203(1), 623–630.

Tackett, A. J., Wei, L., Cameron, C. E., Raney, K. D. (2001). Unwinding of nucleic acids by HCV NS3 helicase is sensitive to the structure of the duplex. *Nucleic Acids Research*, 29(2), 565–572.

Taguwa, S., Kambara, H., Fujita, N., Noda, T., Yoshimori, T., Koike, K., Morrishi, K., Matsuura, Y. (2011). Dysfunction of Autophagy Participates in Vacuole Formation and Cell Death in Cells Replicating Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*, 85(24), 13185–13194.

Thorens, B., Vassalli, P. (1986). Chloroquine and ammonium chloride prevent terminal glycosylation of immunoglobulins in plasma cells without affecting secretion. *Nature*, 321(6070), 618–620.

Krueger, R. E., Mayer, G. D. (1970). Tilorone hydrochloride: An orally active antiviral agent. *Science (New York, N.Y.)*, 169(3951), 1213–1214.

Tsai, W.-P., Nara, P. L., Kung, H.-F., Oroszlan, S. (1990). Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Infectivity by Chloroquine. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 6(4), 481–489.

Turpin, J. A., Buckheit, R. W., Derse, D., Hollingshead, M., Williamson, K., Palamone, C., Osterling, M., C., Hill, S., A., Graham, L., Schaeffer, C., A., Bu, M., Huang, M., Cholody, W., M., Michejda, C., J. Rice, W., G. (1998). Inhibition of Acute-, Latent-, and Chronic-Phase Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Replication by Bistriazoloacridone Analog That Selectively Inhibits HIV-1 Transcription. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42(3), 487-494.

Tuteja, N., Phan, T. N., Tuteja, R., Ochem, A., Falaschi, A. (1997). Inhibition of DNA unwinding and ATPase activities of human DNA helicase II by chemotherapeutic agents. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236(3), 636–640.

Vigerust, D. J., McCullers, J. A. (2007). Chloroquine is effective against influenza A virus in vitro but not in vivo. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 1(5–6), 189–192.

Vincent, M., J., Bergeron, E., Benjannet, S., Erickson, B., R., Rollin, P., E., Ksiazek, T., G., Seidah, N., G., Nichol, S., T. Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. *Virology*. 2005 Aug 22;2:69.

Wainwright, M. (2001). Acridine-a neglected antibacterial chromophore. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(1), 1–13.

Wang, H., Jiang, C. (2009). Influenza A virus H5N1 entry into host cells is through clathrin-dependent endocytosis. *Science in China Series C-Life Sciences*, 52(5), 464–469.

\*Wang, R., Xu, K., Shi, W. (2019). Quinolone derivatives: Potential anti-HIV agent-development and application. *Archiv Der Pharmazie*, 352(9), e1900045.

Wei, P., Garber, M. E., Fang, S. M., Fischer, W. H., Jones, K. A. (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*, 92(4), 451–462.

Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C., Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 826–830.

Wu, L., Dai, J., Zhao, X., Chen, Y., Wang, G., Li, K. (2015). Chloroquine enhances replication of influenza A virus A/WSN/33 (H1N1) in dose-, time-, and MOI-dependent manners in human lung epithelial cells A549. *Journal of Medical Virology*, 87(7), 1096–1103.

Yan, Y., Zou, Z., Sun, Y., Li, X., Xu, K.-F., Wei, Y., Jin, N., Jiang, C. (2013). Anti-malaria drug chloroquine is highly effective in treating avian influenza A H5N1 virus infection in an

animal model. *Cell Research*, 23(2), 300–302.

Yielding, K. L., Blodgett, L. W., Sternglanz, H., Gaudin, D. (1971). Chloroquine Binding to Nucleic Acids: Characteristics, Biological Consequences, and a Proposed Binding Model for the Interaction. In Fred E. Hahn (Ed.), *Proceedings of the Research Symposium on Complexes of Biologically Active Substances with Nucleic Acids and Their Modes of Action: Held at the Walter Reed Army Institute of Research Washington, 16–19 March 1970* (pp. 69–90). Berlin, Heidelberg: Springer.

Yoshimura, A., Kuroda, K., Kawasaki, K., Yamashina, S., Maeda, T., Ohnishi, S.-I. (1982). Infectious Cell Entry Mechanism of Influenza Virus. *Journal of Virology*, 43(1), 284–293.

Zacharias, M., Hagerman, P., J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995, 92, 6052.

Zhou, Z., Jiang, X., Liu, D., Fan, Z., Hu, X., Yan, J., Wang, M., Gao, G. F. (2009). Autophagy is involved in influenza A virus replication. *Autophagy*, 5(3), 321–328.