

Ингибиторы интегразы ВИЧ-1 как новый компонент противовирусной терапии

Т.А.Приказчикова, А.М.Сычева, Ю.Ю.Агапкина, Д.А.Александров, М.Б.Готтих

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского
Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Химический факультет
119991 Москва, Ленинские горы, факс (495) 939–3181

Рассмотрены структурные и функциональные особенности интегразы ВИЧ-1 и представлено современное состояние исследований по поиску эффективных блокаторов данного фермента. Представлены основные классы ингибиторов каталитической активности интегразы, для которых установлен механизм действия и исследована ингибирующая активность в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Библиография — 80 ссылок.

Оглавление

I. Введение	445
II. Интегразы ВИЧ-1: структура и функции	446
III. Ингибиторы активности интегразы ВИЧ-1	447
IV. Заключение	457

I. Введение

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) поражает иммунную систему и вызывает одно из опаснейших заболеваний — синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД). Это заболевание является причиной одной из самых масштабных современных эпидемий: по оценкам Совместной программы ООН по ВИЧ/СПИДу (UNAIDS), общее число ВИЧ-инфи-

цированных людей по всему миру в 2007 г. составило более 33 млн. человек. В Российской Федерации с 1987 г. по настоящее время официально зарегистрировано 403 тыс. случаев заражения ВИЧ. Однако фактическое число ВИЧ-инфицированных людей, живущих в России, очевидно, выше. По данным UNAIDS, в России сейчас насчитывается до 1 млн. инфицированных ВИЧ. Необходимо также отметить, что в России темпы распространения ВИЧ-инфекции продолжают нарастать. По данным Роспотребнадзора, за первые восемь месяцев текущего года в нашей стране зарегистрировано 28 974 новых случаев заражения ВИЧ, что на 12% больше, чем за аналогичный период прошлого года.

Для лечения ВИЧ-инфицированных людей в настоящее время разрешены препараты, ингибирующие три стадии жизненного цикла вируса: обратную транскрипцию, протеолитическое созревание и проникновение в клетку.^{1,2} Стандартной признана комплексная терапия, так называемая высокоэффективная противовирусная терапия (Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART), которая включает три препарата: ингибитор протеазы ВИЧ, или ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы этого вируса, и два нуклеозидных ингибитора обратной транскриптазы. В тех случаях, когда стандартная терапия оказывается малоэффективной, дополнительно применяют единственный известный на настоящий момент ингибитор проникновения вируса в клетку — энфувиртид (enfuvirtide, называемый также DP-178 или T-20).² Это синтетический пептид, последовательность которого соответствует последовательности аминокислот 643–678 гликопротеина gp160 ВИЧ-1. Необходимость одновременного использования нескольких препаратов обусловлена быстрой эволюцией ВИЧ, которая приводит к появлению устойчивых к препаратам форм вируса.

Т.А.Приказчикова. Кандидат химических наук, научный сотрудник НИИФХБ. Телефон: (495)939–5407, e-mail: taprik@yandex.ru
Область научных интересов: модификация нуклеиновых кислот, белково-нуклеиновые взаимодействия.

А.М.Сычева. Студентка химического факультета МГУ. Телефон: (495)939–5407, e-mail: anna.sycheva@gmail.com
Область научных интересов: механизм действия ретровирусных интеграз и обратных транскриптаз, ретровирусные векторы.

Ю.Ю.Агапкина. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник того же факультета. Телефон: (495)939–5407, e-mail: agapkina@belozersky.msu.ru
Область научных интересов: ДНК-связывающие белки, модификации ДНК, ДНК-белковые взаимодействия.

Д.А.Александров. Кандидат химических наук, инженер НИИФХБ. Телефон: (495)939–5407, e-mail: alex-1-a-rus@yandex.ru
Область научных интересов: ДНК-связывающие белки, модификации ДНК, ДНК-белковые взаимодействия.

М.Б.Готтих. Доктор химических наук, профессор того же института. Телефон: (495)939–5407, e-mail: gottikh@belozersky.msu.ru
Область научных интересов: модификация нуклеиновых кислот, белково-нуклеиновые взаимодействия, механизм действия ретровирусных интеграз и обратных транскриптаз.

Дата поступления 24 января 2008 г.

Больные зачастую плохо переносят такую терапию. При ее проведении требуется, чтобы больной регулярно принимал большое количество лекарств, а также, в ряде случаев, соблюдал особую диету. Кроме того, препараты, входящие в состав HAART, достаточно токсичны, и их применение часто приводит к повышению уровня холестерина в крови пациентов и к липодистрофии. Наконец, важно отметить, что современная комплексная терапия не позволяет полностью остановить репликацию ВИЧ или, иными словами, полностью вылечить СПИД, она только дает возможность продлить время жизни больных СПИДом.^{1,2} Все это связано с особенностями репликативного цикла вируса.

Вирус иммунодефицита человека относится к семейству ретровирусов, геном которых в составе вириона представлен молекулой РНК. После проникновения вируса в клетку человека происходят синтез ДНК-копии вирусного генома и встраивание (интеграция) этой вирусной ДНК в геном человеческой клетки. Оба эти процесса осуществляются вирусными ферментами — обратной транскриптазой и интегразой соответственно. После встраивания генома ВИЧ в клеточную ДНК остановить размножение вируса уже практически невозможно, поскольку дальнейший синтез вирусных белков и РНК в клетке происходит уже под действием клеточных ферментов. Таким образом, полностью подавить развитие вируса можно только на ранних стадиях проникновения вируса в клетку, обратной транскрипции и интеграции. К настоящему моменту создано большое число ингибиторов активности обратной транскриптазы ВИЧ, часть из которых используется в HAART-терапии. Однако вирусная обратная транскриптаза относится к классу полимераз, и большинство ее блокаторов в той или иной степени подавляет действие клеточных ферментов этого класса, что приводит к значительным побочным эффектам. По этой причине создание лекарственного препарата на основе ингибитора каталитической активности интегразы ВИЧ-1 представляет очень важную задачу.

В октябре 2007 г. Администрация по продуктам питания и лекарственным препаратам США (Food and Drug Administration, FDA) одобрила к применению новое средство для лечения СПИДа — препарат Исентресс (Ралтегравир), который производится фирмой Merck Pharmaceuticals. Интерес к этому событию обусловлен тем, что Исентресс относится к принципиально новому классу противовирусных препаратов — это первый разрешенный к применению ингибитор каталитической активности интегразы ВИЧ-1.

Ингибиторы интеграции обладают высоким терапевтическим потенциалом по двум причинам.¹ Во-первых, интеграза является одним из ключевых участников репликативного цикла вируса. Так, показано, что при подавлении активности этого фермента репликация вируса может некоторое время продолжаться благодаря образованию кольцевых форм вирусной ДНК в клеточном ядре, однако такая эпизодическая ДНК нестабильна и быстро подвергается деградации.³ Во-вторых, интеграза не имеет клеточного эквивалента, и, следовательно, подавление активности интегразы не должно нарушать процессов нормального клеточного метаболизма.

Для того чтобы читатели могли лучше понять принципы действия ингибиторов интегразы и проблемы, возникающие при их создании, в настоящем обзоре приводится краткая информация о строении и функциях самого фермента. Подробную информацию можно найти в обзорах^{4,5}.

II. Интегразы ВИЧ-1: структура и функции

Интегразы ВИЧ-1 представляет собой белок с молекулярной массой 32 кДа, состоящий из 288 аминокислотных остатков. Ее относят к семейству полинуклеотидилтрансфераз, в которое входят ретровирусные интегразы, транспозазы, белки рекомбинации RuvC и RuvX, а также ряд других белков.⁶ Ферменты данного семейства катализируют процессы, приводящие к перемещению ДНК или ее фрагментов внутри генома либо между геномами. Данные процессы осуществляются без привлечения дополнительных источников энергии и, в конечном итоге, без изменения числа фосфодиэфирных связей. Для ферментов данного семейства характерно формирование очень устойчивых комплексов с ДНК-субстратом, однако катализируемые ими реакции протекают без образования ковалентной связи между белком и ДНК.⁷

Для осуществления интеграции интегразе необходимо связать сразу две молекулы ДНК: вирусную (называемую ДНК-субстратом) и клеточную (называемую ДНК-мишенью). При этом вирусная ДНК связывается сиквенс-специфично (интеграза узнает концевые последовательности участков U5 и U3 длинных концевых повторов (ДКП) вирусной ДНК (рис. 1)), а связывание клеточной ДНК не зависит от ее нуклеотидной последовательности. Интеграция протекает в несколько стадий.^{8,9} Она начинается в цитоплазме ВИЧ-инфицированных клеток, где по завершению обратной транскрипции вирусного РНК-генома интеграза связывает вирусную ДНК-копию (ДНК-субстрат), формируя так называемый прединтеграционный комплекс (ПИК). Структурная организация ПИК, а также роль его компонентов до настоящего времени полностью не установлены. Известно, что помимо интегразы и вирусной ДНК в его состав входят вирусная обратная транскриптаза, ряд вирусных и клеточных белков.^{10,11} Каталитически активный ПИК может быть выделен из ВИЧ-инфицированных клеток.¹²

Связав вирусную ДНК, интеграза катализирует реакцию 3'-процессинга, представляющую собой эндонуклеазное расщепление ДНК, в результате которого с 3'-конца каждой цепи ДНК-субстрата удаляется динуклеотид GT. Затем ПИК транспортируется из цитоплазмы в ядро инфицированной клетки, где интеграза катализирует реакцию переноса цепи. В ходе этой реакции 3'-гидроксильные группы процессингованных цепей вирусной ДНК атакуют межнуклеотидные фосфаты обеих цепей клеточной ДНК (ДНК-мишени) с образованием ковалентно-связанного продукта. Переэтерификации подвергаются межнуклеотидные связи, расположенные в различных цепях ДНК-мишени на расстоянии пяти пар нуклеотидов друг от друга. Встраивание вирусной ДНК может осуществляться в любое место клеточной ДНК, но преимущественно направлено на последовательности генома с нарушенным или ослабленным стэкинг-взаимодействием.¹³

В структуре интегразы ВИЧ-1 можно выделить три домена: N-концевой, каталитический и C-концевой.^{14,15} До настоящего времени, несмотря на многократные попытки, не удалось получить точной информации о пространственной структуре полноразмерного фермента. Неудачи связаны с низкой растворимостью интегразы, а также с ее конформационной подвижностью и склонностью к агрегации, которые осложняют процесс кристаллизации интегразы. Тем не менее с помощью рентгеноструктурного анализа и спектроскопии ЯМР было установлено строение отдельных доменов, а также строение белков, включающих N-концевой и каталитический домены интегразы.^{5, 16–20}

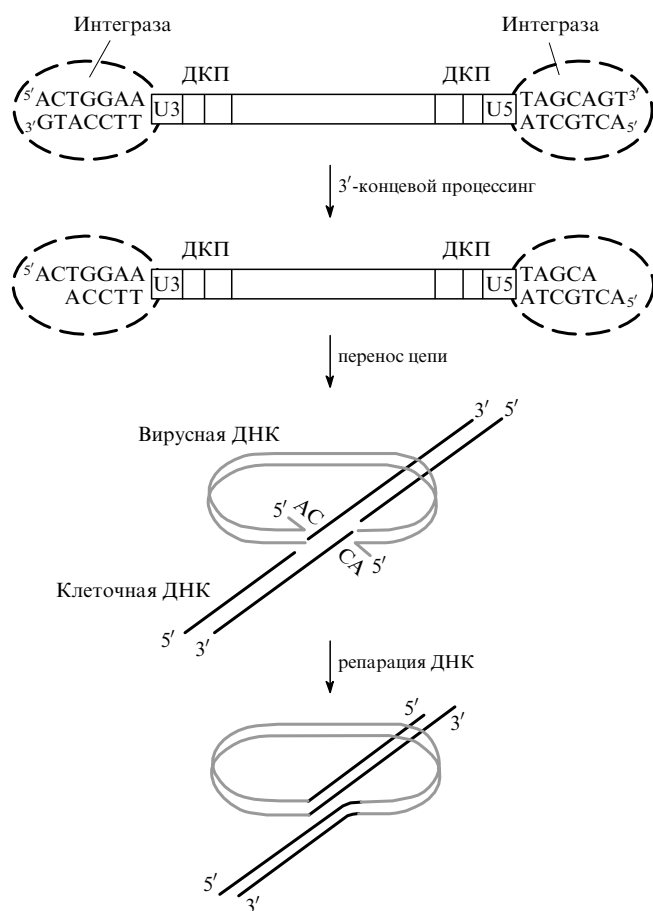


Рис. 1. Схема интеграции вирусной ДНК в клеточную ДНК под действием вирусной интегразы.

Каталитический домен обладает наиболее консервативной первичной структурой по сравнению с другими доменами интегразы ВИЧ-1 и сходен по строению с каталитическими доменами других ретровирусных интеграз и транспозаз.²¹ В состав каталитического домена входят аминокислотные остатки с 50-го по 212-й. Три из них, Asp64, Asp116 и Glu152, формируют активный каталитический центр фермента. Они образуют так называемый D,D(35)E-мотив, который характерен для каталитических доменов большинства ферментов класса полинуклеотидилтрансфераз.²¹ Мутации любого аминокислотного остатка из каталитической триады критичны для активности фермента.²² Предполагается, что интеграза ВИЧ-1 связывает два иона металла и осуществляет катализ с их участием.⁷ Вероятнее всего, в процессах *in vivo* роль металла-кофактора играют ионы Mg^{2+} , однако в исследованиях *in vitro* нередко в качестве кофактора интегразы используют ионы Mn^{2+} (см.²³).

Показано, что изолированный каталитический домен способен катализировать *in vitro* реакцию дезинтеграции, т.е. реакцию, обратную переносу цепи,²⁴ в то время как для осуществления 3'-процессинга и переноса цепи необходим полноразмерный фермент.¹⁴

Первичная структура N-концевого домена (с 1-го по 49-й аминокислотные остатки), как и структура каталитического домена, сходна со структурой N-концевых доменов других ретровирусных интеграз.²⁵ Роль N-концевого домена в процессах, которые осуществляет интеграза, наименее ясна.

Известно, что этот участок фермента содержит четыре аминокислотных остатка — His12, His16, Cys40 и Cys43, — которые образуют так называемый ННСС-мотив, характерный для большинства ретровирусных интеграз.²⁵ Некоторые ферменты, содержащие подобный мотив, формируют Zn^{2+} -связывающий домен типа «цинковых пальцев», который наряду с координацией иона цинка выполняет и ДНК-связывающую функцию.²⁶ Показано,²⁷ что интеграза ВИЧ-1 действительно связывает ион Zn^{2+} в стехиометрическом соотношении 1 : 1, однако данные о взаимодействии N-концевого домена с ДНК в литературе отсутствуют. Мутантный фермент, в котором N-концевой домен либо отсутствовал, либо в его ННСС-мотив были введены замены, терял способность координировать ион цинка и, как следствие, осуществлять реакции 3'-концевого процессинга и переноса цепи.^{25, 27}

Предполагают, что роль N-концевого домена в функционировании интегразы связана с его участием в образовании каталитически активного мультимерного комплекса, так как показано, что координация интегразой ионов цинка стимулирует ее мультимеризацию и активность.²⁷ Кроме того, возможно, что с N-концевым доменом взаимодействуют некоторые клеточные белки, входящие в состав ПИК.

С-Концевой домен ретровирусных интеграз обладает наименьшей консервативностью по сравнению с N-концевым и каталитическим доменами. Данному домену приписывают функцию неспецифического связывания ДНК.^{28, 29} Показано, что участок С-концевого домена, содержащий с 220-го по 270-й аминокислотные остатки, способен связывать ДНК с эффективностью, близкой к эффективности полноразмерного фермента.²⁹

Выше уже отмечалось, что в процессе интеграции интегразы связывает две молекулы ДНК: вирусную и клеточную. В этой связи возникает вопрос: способна ли одна молекула интегразы связывать сразу обе молекулы ДНК или она содержит только один центр связывания и во взаимодействии с двумя ДНК участвует, как минимум, димер интегразы? Исследования^{30, 31} свидетельствуют, что интеграза функционирует как мультимер. В частности, в работе³⁰ сообщается, что для интеграции вирусной ДНК в клеточную ДНК необходима тетрамерная организация интегразы, однако точное мультимерное состояние интегразы в реакциях 3'-процессинга и переноса цепи до сих пор не установлено. Действительно, помимо того что ферменту необходимо связать две разные молекулы ДНК, он должен осуществить также связывание и процессинг двух концов вирусной ДНК и встроить их в клеточную ДНК на расстоянии пяти пар нуклеотидов друг от друга.³²

Отсутствие информации о строении полноразмерного фермента, его комплекса с ДНК, а также о составе и функционировании прединтеграционного комплекса осложняет и замедляет поиск ингибиторов интегразы.

III. Ингибиторы активности интегразы ВИЧ-1

Исходя из общих представлений о механизме действия интегразы ВИЧ-1, можно предложить несколько вариантов ее ингибирования: блокирование связывания вирусной ДНК; ингибирование 3'-процессинга; воздействие на комплекс интегразы с вирусной ДНК и подавление реакции переноса цепи; ингибирование белок-белковых взаимодействий при образовании активной мультимерной формы интегразы или при ее взаимодействии с другими белковыми компонентами ПИКа.

Найти соединения, способные препятствовать связыванию вирусной ДНК с интегразой ВИЧ-1 в составе сложного нуклеопротеинового комплекса, до сих пор не удалось. Ингибиторы остальных стадий интеграции активно разрабатываются. Для поиска соединений, способных ингибировать интеграцию, в настоящее время применяют два основных подхода: скрининг библиотек химических соединений различных классов и компьютерное моделирование предполагаемой структуры ингибитора. В обоих случаях исследователи сталкиваются с проблемами, затрудняющими разработку высокоэффективных и специфичных ингибиторов интегразы ВИЧ.

Основная проблема при компьютерном моделировании ингибиторов связана с отсутствием точной информации о строении полноразмерного фермента и его комплекса с ДНК. В случае скрининга библиотек химических соединений проблема заключается в несоответствии используемой для тестирования ингибиторов модельной системы интеграции реально существующей. Процесс интеграции *in vitro* воспроизводят, применяя рекомбинантную интегразу и ДНК-дуплексы, имитирующие концевые последовательности вирусной ДНК. По причине плохой растворимости и склонности интегразы к агрегации часто в исследованиях *in vitro* используют препараты рекомбинантного фермента (либо выделенного в присутствии детергента, либо содержащего мутации, повышающие его растворимость). Однако рекомбинантные интегразы, выделенные по разным методикам, обычно проявляют различную каталитическую активность и различную чувствительность к ионам-кофакторам.³¹ Часто фермент, выделенный в присутствии детергента или содержащий мутации, неактивен в присутствии природного кофактора — иона Mg^{2+} , но способен катализировать интеграцию в присутствии иона Mn^{2+} . Как правило, интеграса, характеризующаяся различной активностью в присутствии ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} , проявляет различную чувствительность к ингибиторам.³³ Так, нередко соединения, ингибирующие интегразу *in vitro* в присутствии ионов Mn^{2+} , неактивны в присутствии ионов Mg^{2+} и в ВИЧ-инфицированных клетках.

1. Общая стратегия разработки ингибиторов интегразы ВИЧ-1

Первичный скрининг блокаторов интегразы проводят *in vitro* с использованием рекомбинантной интегразы и коротких олигонуклеотидных дуплексов, которые имитируют концы длинных концевых повторов в вирусной ДНК.¹ При этом отдельно изучают подавление ингибиторами реакций 3'-процессинга и переноса цепи и для каждого препарата определяют значение IC_{50} — концентрацию ингибитора, при которой эффективность реакции снижается на 50%. Далее ингибиторы, проявившие активность на первой стадии испытаний, подвергают исследованиям на культуре клеток, зараженных ВИЧ. В результате определяют способность препарата подавлять репликацию вируса в клетках, а также его токсичность по отношению к клеткам (цитотоксичность).

Следующим шагом на пути создания эффективного блокатора интегразы является анализ взаимосвязи структуры и активности (Structure Activity Relationship, SAR) для изучаемого класса соединений. Данный вид исследований подразумевает синтез библиотеки соединений на основе структуры уже известного ингибитора и изучение влияния вносимых в структуру ингибитора изменений на его активность. Структурно-функциональные исследования позволяют улучшить фармакологические характеристики препарата. Наилучшие

ингибиторы, выявленные по результатам такого анализа, затем испытывают на животных (мышьях, собаках, макаках-резус) для выявления фармакокинетики соединения и его токсичности. В перспективе препараты, успешно прошедшие все эти тесты, направляют на клинические испытания. Как уже отмечалось выше, один ингибитор интегразы, Исентресс, уже прошел клинические испытания и получил разрешение на применение в качестве лекарства, второй ингибитор, JTK-303/GS-9137, находится на третьей стадии клинических испытаний (см. раздел III.5).

Разработка ингибиторов интегразы связана также с созданием новых вариантов комплексной терапии. Наиболее перспективно использование сразу нескольких препаратов, блокирующих различные стадии жизненного цикла вируса,¹ поскольку множественные мутации в геноме вируса, необходимые для приобретения устойчивости к такой терапии, снижают способность вируса к репликации. В связи с этим в настоящее время при исследовании активности ингибиторов интегразы и других вирусных ферментов особое внимание уделяют доказательству воздействия препарата на определенную стадию жизненного цикла вируса. Для того чтобы установить, что ингибитор действует именно на стадии интеграции, необходимо выполнение как минимум четырех условий.¹

Во-первых, в эксперименте по добавлению ингибитора на разных стадиях вирусной инфекции (time-of-drug-addition experiment) ингибитор должен действовать на стадии интеграции, т.е. после обратной транскрипции, но до стадии созревания вирусных частиц (между 4 и 16 ч после инфекции), и не должен действовать на более поздних стадиях. Этот эксперимент проводят следующим образом: культуру клеток заражают вирусом, а затем через определенные промежутки времени к ним добавляют среду, содержащую ингибитор. Таким путем удается установить стадию жизненного цикла вируса, на которой происходит подавление его репликации.

Во-вторых, в ядрах зараженных клеток, обработанных ингибитором, должно происходить накопление кольцевых вирусных ДНК, содержащих две тандемные копии ДКП-последовательности, и снижение числа интегрированных вирусных ДНК. Кольцевые молекулы ДНК образуются в результате циклизации вирусной ДНК клеточными ферментами. В-третьих, в штаммах вируса, устойчивых к данному ингибитору, мутации должны быть локализованы в гене интегразы. И наконец, в-четвертых, ингибитор должен быть неактивен (или менее активен) в экспериментах с рекомбинантной интегразой, несущей мутации, которые были выявлены у устойчивых штаммов вируса.

Такая стратегия разработки ингибиторов интегразы позволила выявить несколько классов соединений, представители которых демонстрируют высокую противовирусную активность в культуре зараженных клеток в сочетании с низкой цитотоксичностью и действуют именно на стадии интеграции. По механизму действия их можно разделить на три группы: ингибиторы 3'-процессинга, ингибиторы переноса цепи и ингибиторы олигомеризации фермента. Все эти группы ингибиторов рассматриваются в настоящем обзоре. Мы не ставили перед собой задачу описать все известные на данный момент ингибиторы, способные подавлять активность рекомбинантной интеграции ВИЧ-1 *in vitro*, поскольку они представляют собой очень широкий круг соединений, различных по структуре и ингибирующей активности. Здесь представлены только те соединения, для которых известен механизм действия и показана антивирусная активность в культуре ВИЧ-инфицированных клеток. Для того чтобы

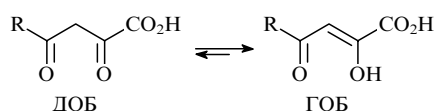
получить информацию обо всем спектре ингибиторов интегразы ВИЧ-1, можно обратиться к обзорам^{34–41}.

2. Ингибиторы переноса цепи

Соединения, ингибирующие перенос цепи, считаются на настоящий момент наиболее перспективными ингибиторами интеграции. Для всех соединений, рассмотренных в обзоре, сохранены названия, приведенные в оригинальных статьях.

а. Производные дикетосоединений

Тестирование в качестве ингибиторов интегразы ВИЧ-1 библиотеки соединений, состоящей из 250 000 образцов, выявило ряд наиболее активных из них.⁴² Все они оказались дикетосоединениями, а именно, производными 2,4-диоксобутановой кислоты (ДОБ) (в англоязычной литературе *diketoadicid*, ДКА). Позднее было показано, что в растворе эти соединения существуют в основном в енольной форме — в виде производных 2-гидрокси-4-оксобут-2-еновой кислоты (ГОВ),⁴³ — однако в оригинальных статьях они всегда приводятся в виде дикетосоединений.



Обнаруженные ингибиторы проявляли большую активность при ингибировании реакции переноса цепи, чем при ингибировании 3'-процессинга. Это позволило объединить их в одну группу и говорить о новом классе специфичных к переносу цепи ингибиторов интегразы.⁴² Для наиболее активных представителей этого класса ингибиторов — соединений L-731,988 и L-708,906 (табл. 1) — значения IC_{50} в реакции переноса цепи с использованием рекомбинантной интегразы составляли 0.05 и 0.10 мкмоль $\cdot$ л⁻¹ соответственно, а в реакции 3'-процессинга — 6 и 1 мкмоль $\cdot$ л⁻¹ (см.⁴²). Данные соединения подавляли также активность прединтеграционного комплекса, причем в том же диапазоне концентраций, в котором происходило ингибирование реакции переноса цепи (IC_{50} = 0.08 и 0.15 мкмоль $\cdot$ л⁻¹ соответственно). Кроме того,

Таблица 1. Структура и активность ингибиторов интегразы ВИЧ-1 — производных 2,4-диоксобутановой кислоты.

Ингибитор		Ингибирующая активность (IC_{50}), мкмоль $\cdot$ л ⁻¹		
название	структура	в реакции переноса цепи	в подавлении активности ПИК	в подавлении репликации ВИЧ-инфекции в клетках
L-731,988		0.05	0.08	1.0
L-708,906		0.10	0.15	2.0

дикетосоединения подавляли репликацию вируса в культуре клеток, при этом значения IC_{50} для L-731,988 и L-708,906 составляли 1 и 2 мкмоль $\cdot$ л⁻¹ соответственно.⁴²

Доказательством того, что в клетке производные 2,4-диоксобутановой кислоты действуют именно на интегразу, послужили следующие факты. Во-первых, селекция вирусов, устойчивых к этим ингибиторам, показала, что мутации, приводящие к резистентности, локализованы именно в гене интегразы. Интеграза устойчивого к действию ингибитора L-731,988 штамма вируса содержала замену Met154Ile, а интеграза устойчивого к L-708,906 штамма несла мутации Thr66Ile и Met154Ile (или Ser153Tyr). Во-вторых, в ядрах клеток, обработанных этими ингибиторами, происходило накопление кольцевых форм вирусной ДНК — эффект, обычно наблюдаемый при заражении клеток вирусом, дефектным по интегразе. Кроме того, наблюдали уменьшение количества интегрированной вирусной ДНК. И наконец, в-третьих, в зараженных клетках в присутствии этих ингибиторов кинетика как обратной транскрипции, так и 3'-процессинга не изменялась по сравнению с контрольным экспериментом. Это означает, что исследуемые дикетосоединения не действуют на стадии обратной транскрипции и являются специфическими ингибиторами реакции переноса цепи. Тем не менее было показано, что ингибитор интегразы L-708,906 снижает также (хотя и при более высоких концентрациях) активность рекомбиназы RAG 1/2, которая обеспечивает создание репертуара антител и Т-клеточных рецепторов.⁴⁴ Следовательно, при создании ингибиторов интегразы нельзя упускать из виду возможность их взаимодействия с клеточными ферментами и появления связанных с этим цитопатических эффектов.

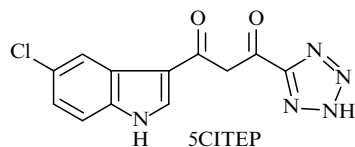
В работе⁴⁵ детально изучено взаимодействие ингибитора L-731,988 с интегразой. Показано, что ингибитор не взаимодействует с изолированным ферментом вплоть до микромолярных концентраций. Для его связывания с интегразой необходимо присутствие ДНК-субстрата, а именно, U5- или U3-концевых последовательностей вирусной ДНК. При этом константа диссоциации комплекса интегразы с L-731,988, определенная в присутствии 100 нмоль $\cdot$ л⁻¹ U5-субстрата, составляла 75 нмоль $\cdot$ л⁻¹ и была близка по величине к IC_{50} в реакции переноса цепи.

Неспецифическая ДНК не стимулировала взаимодействия ингибитора с ферментом. Кроме того, увеличение концентрации субстратной ДНК, избыток которой мог выступать в качестве ДНК-мишени, приводило к снижению стабильности комплекса ингибитора с интегразой. На основании полученных данных авторы предположили, что ингибитор L-731,988 подавляет реакцию переноса цепи, конкурируя с ДНК-мишенью за место ее связывания, причем для взаимодействия ингибитора с интегразой необходима определенная конформация активного фермент-субстратного комплекса. Иными словами, ингибиторы этого класса связываются не с самой интегразой, а с ее комплексом с вирусной ДНК и препятствуют дальнейшему связыванию клеточной ДНК.

Сопоставив данные по связыванию ингибитора L-731,988 с интегразой с результатами мутационного анализа, авторы работы⁴⁶ высказали предположение о механизме действия дикетосоединений. Согласно выдвинутой ими гипотезе, дикетосоединения координируют оба иона Mg^{2+} , участвующие в катализе и расположенные в активном центре фермента, подавляя тем самым каталитическую активность интегразы. Тот факт, что интегразы устойчивых к ингибиторам данного класса штаммов вируса содержали аминокислотные замены

в непосредственной близости от аминокислотных остатков Asp64 и Glu152, входящих в каталитическую триаду интегразы, позволил предположить, что производные 2,4-диоксобутановой кислоты взаимодействуют с активным центром фермента или с его непосредственным окружением.

Практически одновременно с информацией об ингибирующем действии производных 2,4-диоксобутановой кислоты появились данные о другом ингибиторе интегразы — 3-гидрокси-3-(2*H*-тетразол-5-ил)-1-(5-хлориндол-3-ил)пропене (5CITEP) (см.¹⁶).



Рентгеноструктурный анализ каталитического домена интегразы, закристаллизованной в присутствии ингибитора 5CITEP, показал, что ингибитор располагается в активном центре фермента между аминокислотными остатками каталитической триады — Asp64, Asp116 и Glu152 (рис. 2). Согласно карте электронной плотности, 5CITEP образовывал ряд контактов с аминокислотными остатками интегразы, важными для осуществления каталитического акта и ДНК-связывания. Так, аминокислота Glu152 участвует в образовании водородной связи с гидроксильной группой енольной формы 5CITEP. Кроме того, возможно образование водородных связей между Gln148 и атомом азота индольного фрагмента 5CITEP, а также между Asn155, Thr66, Lys159, Lys156 и атомами азота тетразольного кольца 5CITEP. Прямых контактов между 5CITEP и двумя другими аминокислотными остатками каталитической триады, Asp64 и Asp116, обнаружено не было.

Полученные структурные данные представляли большой интерес для понимания механизма действия 5CITEP, L-731,988 и дикетосоединений, поскольку ряд исследований свидетельствовал в пользу того, что эти соединения могут быть отнесены к одному и тому же классу ингибиторов интегразы. Так, 5CITEP, как и производные 2,4-диоксобута-

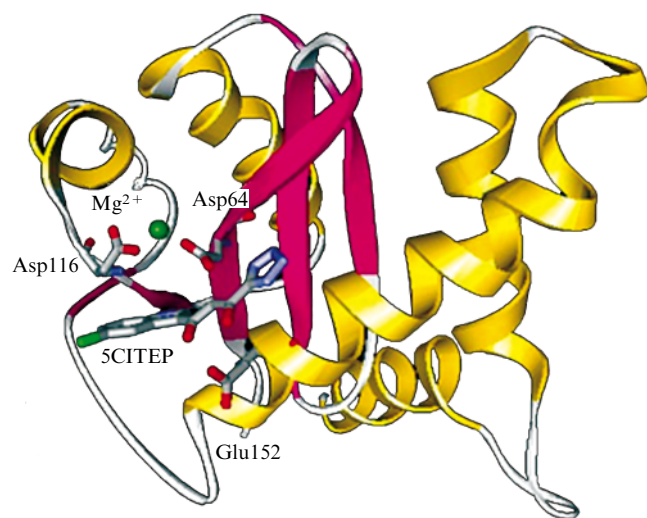


Рис. 2. Структура комплекса ингибитора 5CITEP с каталитическим доменом интегразы ВИЧ-1 (данные рентгеноструктурного анализа).¹⁶

Таблица 2. Структура и активность ингибиторов класса дикетосоединений в присутствии кофакторов Mg^{2+} и Mn^{2+} .

Ингибитор	Инггибирующая активность (IC_{50} , кИ мкмоль $\cdot$ л $^{-1}$) в реакции переноса цепи	Ссылка
название	структура	
		Mg^{2+} Mn^{2+}
L-731,988		0.05 0.05 46
DKA 1		0.47 0.06 46
DKA 2		0.4 0.4 46 1.93 0.12 33
5CITEP		4.0 0.4 46 97.0 0.93 33

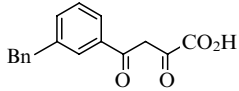
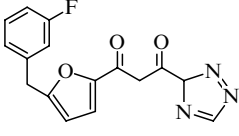
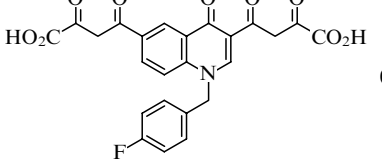
новой кислоты, проявлял большую ингибирующую активность в реакции переноса цепи,^{46, 47} чем в других процессах. Об одинаковом участке связывания этих соединений с ферментом говорили как эксперименты по конкурентному связыванию ингибиторов с интегразой,⁴⁶ так и сравнение данных рентгеноструктурного анализа комплекса каталитического домена фермента с 5CITEP с данными по мутациям в структуре интегразы устойчивых к производным дикетокислоты штаммов вируса.

Для того чтобы понять роль отдельных фрагментов в молекулах ингибиторов 5CITEP и L-731,988 в их связывании с ферментом и его ингибировании, была изучена активность ряда производных этих соединений (табл. 2) (см.[†]).^{33, 46, 47}

Исследование соединений L-731,988, 5CITEP, DKA 1 и DKA 2 позволило выявить две важные закономерности. Во-первых, при использовании в качестве кофактора интегразы ионов Mg^{2+} карбоксильные производные L-731,988 и DKA 2 проявляли большую ингибирующую активность, чем тетразольные производные DKA 1 и 5CITEP. Во-вторых, активность карбоксильных производных в присутствии разных кофакторов была одинаковой⁴⁶ или различалась не очень сильно,³³ в то время как активность тетразольных производных существенно зависела от использованного кофактора. Вероятно, низкой активностью тетразолсодержа-

[†] Синтез ингибиторов DKA 1 и DKA 2 — аналогов ингибиторов L-731,988 и 5CITEP — описан в работе⁴⁶.

Таблица 3. Структуры ингибиторов класса дикетосоединений, полученные в результате SAR-исследований.^{48, 49}

Ингибитор	структура	Ингибирующая активность (IC_{50} , μM)	
		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
DKA 3		0.01	1.11
S-1360		0.02	0.14
DKA 4		0.016	4.29

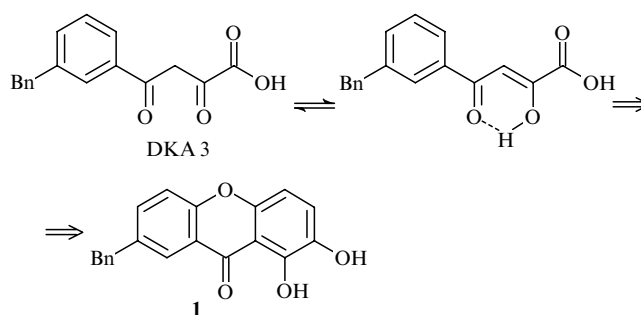
ших ингибиторов в присутствии ионов Mg^{2+} можно объяснить и их низкую противовирусную активность в клеточной культуре ($IC_{50} > 50 \mu\text{M}$).⁴⁶

Поиск оптимальной по активности и цитотоксичности структуры ингибитора класса дикетосоединений был проведен в рамках структурно-функциональных исследований (см. раздел III.3.а). Понятно, что подобные исследования включают тестирование активности большого числа соединений. В качестве примера в табл. 3 приведены структуры трех ингибиторов, полученных в результате подобной работы.

Следует особо отметить соединение S-1360, которое проявило высокую ингибирующую активность в экспериментах на ВИЧ-инфицированных клетках и стало первым ингибитором переноса цепи, дошедшим до стадии клинических испытаний (см. раздел III.5).

6. Производные нафтиридина

Из приведенных выше данных следует, что соединения, содержащие фрагмент $C(O)CR_2C(O)$, проявляют ингибирующую активность по отношению к интегразе ВИЧ-1. Однако биологическая лабильность этого структурного фрагмента делает затруднительным их использование в качестве хемотерапевтических агентов.⁵⁰ Исследования, направленные на поиск адекватной замены дикетосоединениям, привели к новому классу соединений — производным нафтиридина, обладающим высокой ингибирующей активностью.⁵¹ При моделировании структуры ингибитора нового класса, авторы работы⁵¹ взяли за основу дикетокислоту DKA 3. Учитывая, что кетоформа дикетокислоты DKA 3 находится в равновесии с энольной формой, в которой карбоксильная группа, дикетогруппа и соседнее к ней бензольное кольцо оказываются лежащими в одной плоскости, авторы решили, что такую структуру хорошо моделирует производное 1,2-катехола **1**. Такое соединение было синтезировано, и оно действительно подавляло активность интегразы *in vitro* ($IC_{50} = 600 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$) и репликацию вируса в культуре клеток.



Взятое в концентрации $6 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$, соединение **1** ингибировало вирус на 95%. Однако наличие в молекуле ингибитора **1** биологически лабильного катехолового фрагмента требовало дальнейших структурных усовершенствований.

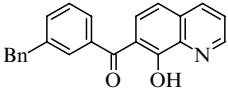
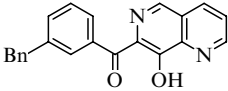
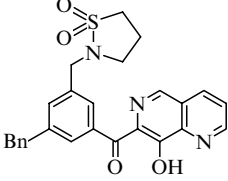
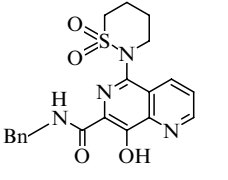
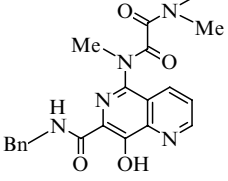
Результаты структурно-функциональных исследований показали, что одну из гидроксильных групп катехолового фрагмента можно заменить на гетероароматический атом азота. Кроме того, для снижения токсичности моделируемого соединения авторы отказались от полиароматической системы, убрав кислородный мостик.⁵¹ Результатом такого моделирования явились три новых ингибитора — производные 8-гидроксихинолина (соединение **2**) и 8-гидрокси[1,6]-нафтиридина (соединения **3** и **4**), структуры которых приведены в табл. 4.

В ходе дальнейших исследований, направленных на повышение ингибирующей активности и улучшение фармакологических свойств производных нафтиридина, были созданы^{52–54} ингибиторы L-870,810 и L-870,812 (см. табл. 4), которые долгое время считались наиболее перспективными ингибиторами интегразы. Соединение L-870,810, как и ингибиторы на основе 2,4-диоксубутановой кислоты, проявляло большую ингибирующую активность в реакции переноса цепи, чем в реакции 3'-процессинга.⁵² Так, в реакции переноса цепи величина IC_{50} составляла 8 или 15 $\text{нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ в зависимости от концентрации ДНК-мишени (0.5 или 5 $\text{нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ соответственно), а в ингибировании 3'-процессинга — 85–250 $\text{нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$. Чувствительность ингибитора к концентрации ДНК-мишени указывала на то, что ингибитор связывается с тем же сайтом в интеграционном комплексе, что и ДНК-мишень, а тот факт, что производное нафтиридина L-870,810 вытесняет дикетокислоту L-731,988 из комплекса интегразы с ДНК-субстратом, позволяет предположить, что эти соединения связываются с интегразой в едином или перекрывающихся сайтах.

Противовирусная активность ингибитора L-870,810 варьирует от 15 до 100 $\text{нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ в зависимости от концентрации сыворотки в клеточной среде (10 и 50% соответственно).⁵² Доказательством действия этого ингибитора на интегразу ВИЧ-1 служили накопление в обрабатываемых L-870,810 клетках кольцевой вирусной ДНК и снижение количества интегрированной вирусной ДНК. Помимо ингибирования интегразы ВИЧ-1, это соединение подавляло репликацию ВИЧ-2 и SIV (Simian Immunodeficiency Virus, вирус иммунодефицита обезьян).

Селекция устойчивых к действию ингибитора L-870,810 штаммов вируса привела к идентификации трех штаммов, содержащих следующие замены в аминокислотной последовательности интегразы: Phe121Tyr/Thr125Lys, Val72Ile/Phe121Tyr/Thr125Lys или Val72Ile/Phe121Tyr/Thr125Lys/Val151Ile.⁵² Вирусы, несущие соответствующие мутации, были в 4–100 раз менее чувствительны к действию L-870,810, однако не приобретали устойчивости к дикетосо-

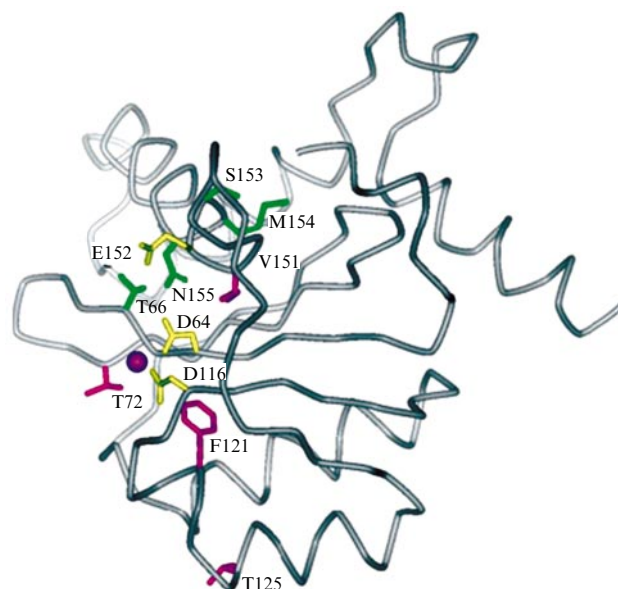
Таблица 4. Структуры ингибиторов, полученных на основе 8-гидроксихинолина и 8-гидрокси[1,6]нафтиридина.

Ингибитор	структура	Ингибирующая активность (IC_{50} , μM)	
		в реакции переноса цепи	в подавлении репликации ВИЧ-инфекции в клетках
2		0.37	5.0
3		0.04	6.2
4		0.01	0.39
L-870,810		0.008	0.10^a
L-870,812		0.04	0.25^a

^a Антивирусная активность определялась как IC_{95} в присутствии 50%-ной нормальной сыворотки человека.

единениям. Аналогично вирусы, устойчивые к ингибиторам на основе 2,4-диоксобутановой кислоты, были чувствительны к действию ингибитора L-870,810 на основе нафтиридина. Интересно, что в трехмерной структуре интегразы (точнее, ее каталитического домена) аминокислотные остатки, подвергающиеся заменам при селекции устойчивых вирусов, были локализованы вокруг каталитической триады. При этом аминокислотные замены, придающие вирусам устойчивость к L-870,810 и дикетосоединениям, располагались по разные стороны от активного центра фермента (рис. 3).

Компьютерное моделирование связывания этих соединений с активным центром интегразы позволяет предположить, что та часть молекулы ингибитора, которая отвечает за координацию металла-кофактора, лежит в непосредственной близости от каталитической триады, в то время как ориентация других частей молекулы и их взаимодействие с аминокислотными остатками интегразы, расположенными вокруг активного центра, зависят от структуры ингибитора.

**Рис. 3.** Локализация аминокислотных замен в каталитическом домене интегразы, приводящая к селекции устойчивого к ингибиторам вируса.

Желтым цветом показана каталитическая триада, сиреневым — координируемый ею ион магния. Аминокислотные остатки, замена которых приводила к селекции устойчивых к дикетосоединениям и производным нафтиридина штаммам вируса, обозначены зеленым и розовым цветами соответственно.

Обобщая полученные данные, можно утверждать, что ингибиторы на основе дикетокислот и нафтиридина связываются с интегразой в перекрывающихся сайтах и обладают сходным механизмом действия.

Оптимальным по ингибирующей активности и фармакокинетическим параметрам оказалось соединение L-870,812 (см.⁵⁴). Оно ингибировало репликацию ВИЧ-1 на 95% при концентрации $250 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ (в присутствии 50%-ной нормальной сыворотки человека). Более того, данное соединение обладало сравнительно низкой аффинностью к белкам сыворотки (93.2% этого ингибитора связывалось с белками сыворотки, в то время как для большей части исследованных соединений этот показатель составлял $> 95\%$). Кроме того, оно было способно подавлять репликацию SIV, интегразы которого высоко гомологична интегразе ВИЧ-1 ($IC_{95} = 350 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ в присутствии 50%-ной сыворотки макаки-резус).

Следующим шагом стало изучение противовирусных свойств ингибитора L-870,812 на инфицированных макаках-резус.⁵² Целью работы было исследование роли химиотерапии и клеточного иммунного ответа в подавлении репликации вируса. Животные хорошо переносили препарат L-870,812, и для него не было зарегистрировано признаков токсичности. При тестировании ингибитора L-870,812 на макаках-резус оказалось, что он проявляет противовирусную активность, причем терапия была наиболее эффективна на ранних стадиях инфекции, так как она позволяла установить специфическому клеточному иммунному ответу. Эффективность терапии на поздних стадиях инфекции зависела от иммунного статуса животного и уровня вируса в плазме крови на момент начала лечения. Полученные данные свидетельствуют в пользу ранней терапии ВИЧ-инфекции, а также в пользу сочетания химиотерапии и вакцинотерапии.

3. Ингибиторы 3'-процессинга

Ингибиторы этого класса подавляют обе стадии интеграции: и 3'-процессинг, и перенос цепи. Это происходит благодаря тому, что они взаимодействуют с активным центром самого фермента, а не его комплекса с ДНК-субстратом. Этот класс ингибиторов интегразы наиболее многочислен, однако подавление репликации вируса в культуре клеток описано только для двух групп ингибиторов: 5*H*-пирано[2,3-*d*:6,5-*d'*]дипиримидинов и производных стирилхинолина.

а. 5*H*-Пирано[2,3-*d*:6,5-*d'*]дипиримидины

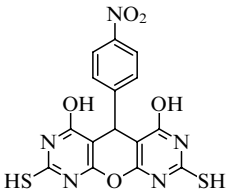
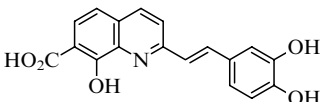
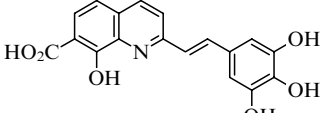
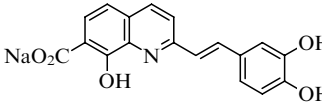
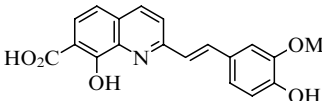
Наиболее активным ингибитором из этой группы соединений является 5-(4-нитрофенил)-2,8-дитио-4,6-дигидрокси-5*H*-пирано[2,3-*d*:6,5-*d'*]дипиримидин (V-165, табл. 5), который ингибирует как активность рекомбинантной интегразы, так и репликацию вируса в культуре клеток.⁵⁵ В противоположность ингибиторам на основе дикетосоединений и нафтиридинов, соединение V-165 более эффективно ингибирует 3'-процессинг, чем перенос цепи, поскольку оно предотвращает связывание ДНК-субстрата интегразой. Накопление в клетках кольцевых форм ДНК и снижение количества интегрированной ДНК подтверждают воздействие ингибитора V-165 на интеграцию. Вместе с тем соединение V-165 подавляет также активность обратной транскриптазы, что подтверждается как исследованиями на рекомбинантном ферменте, так и экспериментами time-of-addition. Исследователи наблюдали слабую корреляцию между антивирусной активностью препарата и подавлением активности рекомбинантной обратной транскриптазы и хорошую корреляцию между

антивирусной активностью и ингибированием рекомбинантной интегразы.

Недавно в результате селекции устойчивых к действию ингибитора V-165 штаммов вируса удалось идентифицировать один штамм ВИЧ-1, который содержал мутации не только в интегразе, но и в генах белков gp120, gp40 и обратной транскриптазы.⁵⁶ Тот факт, что соединение V-165 ингибирует именно активность интегразы, подтверждается наличием двойной мутации в ее аминокислотной последовательности: Thr206Ser в каталитическом домене и Ser230Asn в С-концевом домене. Интересно, что в отличие от мутаций, возникающих при культивировании вируса в присутствии ингибиторов переноса цепи и расположенных в связывающем ион Mg^{2+} каталитическом домене, мутации, возникающие при культивировании вируса в присутствии V-165, находятся не только в каталитическом, но и в С-концевом домене, основной функцией которого является связывание ДНК. Это подтверждает предложенный в работе⁵⁵ мульти-модальный механизм действия ингибитора V-165. Наличие мутаций в белках gp120 и gp40, участвующих в связывании вируса с клеточными рецепторами, указывает на возможное влияние ингибитора V-165 на этот процесс.

Детальное исследование действия ингибитора V-165 на репликацию вируса действительно показало, что он блокирует две стадии вирусного цикла: проникновение вируса в клетку и интеграцию.⁵⁶ Таким образом, на настоящий момент соединение V-165 является единственным ингибитором репликации ВИЧ-1, действующим *in vivo* на две стадии жизненного цикла вируса. С одной стороны, такой разнонаправленный характер действия V-165 повышает привлекательность его как ингибитора ВИЧ-1, но с другой стороны, способность этого соединения взаимодействовать с различ-

Таблица 5. Структура и активность ингибиторов 3'-процессинга.

Ингибитор		Ингибирующая активность (IC_{50} , $\mu\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$)		
название	структура	в реакции 3'-процессинга	в реакции переноса цепи	в подавлении репликации ВИЧ-инфекции в клетках
V-165		0.9	16.0	3.7–8.9
KHD161		2.4	1.0	1.3
SQ 1		0.3	0.4	1.2
SQ 2		0.8	—	20.0
FZ55		2.8	3.7	3.0

ными белками может стать причиной его токсичности. В настоящее время доклинические испытания ингибитора V-165 продолжаются.

6. Стирилхинолины

Принимая во внимание возможное участие в катализе двух ионов Mg^{2+} , авторы работы⁵⁷ решили создать ингибитор, содержащий две соединенные линкером хелатирующие субъединицы, который будет связывать оба иона металла и таким образом ингибировать каталитическую активность интегразы. В качестве первой хелатирующей субъединицы авторы предложили использовать 8-гидроксихинолин, а в качестве второй — полифенольный остаток. С этой целью они синтезировали ряд соединений, различающихся заместителями и их положениями в гидроксихинолиновой и фенольной частях.⁵⁸ Некоторые из них оказались способными подавлять активность рекомбинантной интегразы в реакциях 3'-процессинга и переноса цепи. Эти соединения составили новый класс ингибиторов интегразы — стирилхинолины. Структуры наиболее активных из них приведены в табл. 5.

Поскольку количество двухвалентных ионов, участвующих в катализе, а также непосредственная роль каждого из них остаются не вполне ясными, то механизм действия стирилхинолиновых ингибиторов потребовал дополнительных исследований. Было важно понять, влияют ли ингибиторы непосредственно на каталитический акт или они подавляют связывание интегразы с ДНК. Используя флуоресцентные свойства соединения FZ55 (см. табл. 5), удалось показать, что оно взаимодействует с интегразой с образованием комплекса, стабильность которого зависит от присутствия ионов Mg^{2+} (см.³¹). Кроме того, было показано, что стирилхинолин FZ55 подавляет связывание интегразы с ДНК и уменьшает активность интегразы в реакции 3'-процессинга в одном диапазоне концентраций ($IC_{50} = 1.5$ и 1.2 мкмоль·л⁻¹ соответственно). Однако оба эти эффекта проявляются только в том случае, когда ингибитор добавляют одновременно с ферментом или пренкубируют с ним. В противном случае стирилхинолин FZ55 не блокирует интегразу: он не разрушает пресформированный комплекс интегразы с ДНК-субстратом и не ингибирует реакцию 3'-про-

цессинга с его участием. Основываясь на полученных данных, авторы работы³¹ сделали вывод о конкурентном механизме действия стирилхинолиновых ингибиторов. Способность этих соединений подавлять реакцию дезинтеграции, катализируемую каталитическим доменом фермента,⁵⁷ а также зависимость их связывания с интегразой от присутствия ионов магния позволили предположить, что эти ингибиторы связываются с каталитическим доменом интегразы вблизи активного центра.

Было найдено,³¹ что ингибитор KHD161 (см. табл. 5) в составе пресформированного фермент-субстратного комплекса не активен в реакции 3'-процессинга, однако он подавляет катализируемую этим комплексом реакцию переноса цепи ($IC_{50} = 6$ мкмоль·л⁻¹). Для объяснения этих фактов было выдвинуто предположение о наличии двух центров связывания стирилхинолиновых ингибиторов одной молекулой интегразы. Согласно этому предположению, связывание стирилхинолинов с участием первого центра блокирует связывание вирусной ДНК и ингибирует 3'-процессинг, а их связывание с участием второго центра блокирует взаимодействие вирусной ДНК с клеточной ДНК и подавляет перенос цепи. Компьютерное моделирование показало, что в качестве потенциальных центров связывания стирилхинолинов могут выступать три участка каталитического домена интегразы (рис. 4).³¹

По мнению авторов работы³¹, первый из участков может моделировать первый центр связывания стирилхинолинов, поскольку он включает ион Mg^{2+} и ряд аминокислотных остатков, важных для связывания вирусной ДНК, таких как Lys156 и Lys159 (см.⁵⁹). Второй и третий участки могут моделировать второй центр связывания стирилхинолинов. Какой из них более предпочтителен, пока не ясно, однако только третий участок включает аминокислотные остатки, которые, согласно биохимическим исследованиям, могут участвовать в связывании ДНК.

Помимо ингибирования рекомбинантной интегразы стирилхинолины также способны подавлять репликацию вируса в культуре клеток. Наибольшую противовирусную активность проявили два соединения: KHD161 и SQ1 (см.⁵⁸). Значения IC_{50} для этих ингибиторов составляли 1–2 мкмоль·л⁻¹. К сожалению, ингибитор SQ1 наряду с

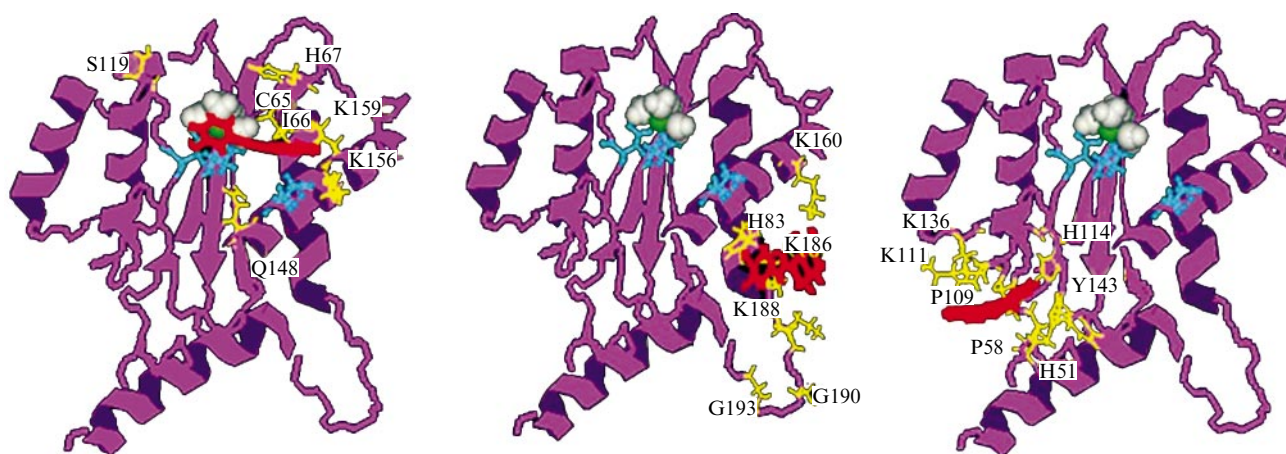


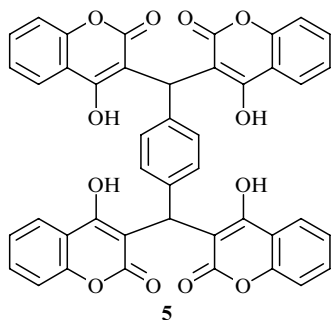
Рис. 4. Компьютерная модель взаимодействия ингибитора KHD161 с каталитическим доменом интегразы в трех различных участках.³¹ Розовым цветом показан белок, зеленым — ион магния, белым — молекулы воды, голубым — каталитическая триада, красным — ингибитор, желтым — взаимодействующие с ним аминокислотные остатки.

высокой активностью обладал также значительной цитотоксичностью, что исключало его использование в медицинских исследованиях. Ингибитор KHD161 был значительно менее токсичен. В настоящее время соединение KHD161 считают наиболее перспективным ингибитором этого класса.

Существуют многочисленные доказательства того, что в клетке стирилхинолины действуют именно на интегразу. Результаты экспериментов *time-of-addition* показали, что эти соединения не влияют на проникновение вируса в клетку и не действуют на стадиях, следующих за интеграцией.⁶⁰ Эксперименты *in vitro* показали, что стирилхинолины не оказывают влияния на связывание вирусного гликопротеина gp120 с вирусным рецептором CD4 и на процесс слияния мембран. Селекция вирусов, устойчивых к стирилхинолинам, с последующей локализацией мутаций также подтвердила, что мишенью стирилхинолинов в клетке является именно интеграна.⁶⁰ Интеграза одного из устойчивых штаммов несла единичную аминокислотную замену Cys280Tyr, а другого — двойную Val165Ile/Val249Ile. Следует отметить, что вирусы, устойчивые к стирилхинолинам, были чувствительны к противовирусным препаратам, избирательно подавляющим реакцию переноса цепи, например, к производным 2,4-диоксобутановой кислоты.⁶⁰

4. Ингибиторы мультимеризации интегразы

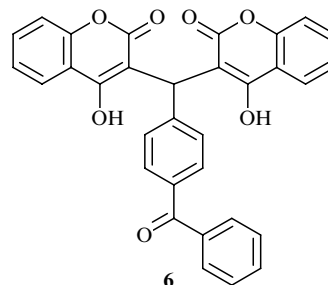
В настоящее время активно проводится поиск соединений, которые, не блокируя каталитическую активность интегразы, влияют на ее взаимодействие с другими компонентами ПИКА или на ее собственную способность к образованию активного мультимера. Соединениями, подавляющими мультимеризацию интегразы, являются, например, производные гидроксикумарина. Было показано, что тетрамер гидроксикумарина **5** подавляет репликацию ВИЧ-1 в культуре клеток ($IC_{50} = 11.5 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$).⁶¹



Изначально соединение **5** рассматривали в качестве ингибитора протеазы ВИЧ-1, поскольку в экспериментах *in vitro* оно подавляло каталитическую активность этого фермента. Однако дальнейшие исследования показали, что наряду с ингибированием протеазы оно способно подавлять *in vitro* и активность интегразы ВИЧ-1. Тетрамер гидроксикумарина ингибировал 3'-процессинг и перенос цепи ($IC_{50} = 1.5 - 2.0 \text{ мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$).

Способность соединения **5** ингибировать реакцию дезинтеграции, катализируемую изолированным каталитическим доменом фермента, говорит о том, что участок связывания этого ингибитора с интегразой расположен в структуре каталитического домена интегразы.⁶¹ Изначально предполагалось, что гидроксикумарин по аналогии с другими гидроксированными ароматическими соединениями — ингибиторами интегразы — действует в активном центре

фермента, влияя на координацию металла-кофактора. Однако исследования, проведенные в авторами работы⁶², позволили предложить иной механизм действия этого ингибитора. Они осуществили ковалентное присоединение бензофенонового производного гидроксикумарина **6** к интегразе и определили участок связывания ингибитора с ферментом.



С помощью MALDI-спектрометрии продуктов триптического гидролиза ковалентного комплекса ингибитора **6** с интегразой авторы идентифицировали пептид ¹²⁸AACWWAGIK¹³⁶, к которому присоединялось соединение **6**. Данный пептид принадлежит каталитическому домену интегразы, что согласуется с выводами, сделанными на основании активности гидроксикумарина в реакции дезинтеграции.

Согласно данным рентгеноструктурного анализа каталитического домена, аминокислотные остатки пептида ¹²⁸AACWWAGIK¹³⁶ входят в состав α 3-спирали и одного из тяжёлых β -листа.^{6, 16} Известно, что аминокислоты, входящие в состав α 3-спирали, участвуют в образовании димерного комплекса каталитического домена. Таким образом, гидроксикумариновый ингибитор, связываясь с интегразой вблизи от контакта двух мономеров, препятствует их димеризации. Для того чтобы понять, с каким участком пептида ¹²⁸AACWWAGIK¹³⁶ взаимодействует ингибитор, три аминокислотных остатка интегразы, входящие в состав этого пептида, — Cys130, Trp131 и Trp132 — были подвергнуты сайт-направленному мутагенезу. Мутации Trp131 не сказывались на ингибирующей активности производных гидроксикумарина, а замены Cys130 на Ser и Trp132 на Gly, Ala или Arg приводили к ее снижению.⁶² Эти данные свидетельствуют об участии Cys130 и Trp132 во взаимодействии с гидроксикумариновым ингибитором. Интересно, что ни один из указанных выше мутантов по аминокислотному остатку Trp132 не был способен осуществлять реакцию переноса цепи, но при этом сохранял активность в реакции 3'-процессинга. Вместе с тем фермент, в котором остаток Trp132 был заменен на Tyr, осуществлял перенос цепи и ингибировался гидроксикумарином на уровне интегразы дикого типа.

Основываясь на результатах мутагенеза и на данных РСА димера каталитического домена интегразы, авторы высказали предположение о важной роли π - π -стэкинг-взаимодействия между остатком Trp132 одной мономерной интегразы и аминокислотным остатком Phe181 другой в образовании и стабилизации мультимерной формы фермента. Связывание производных гидроксикумарина с интегразой в районе пептида ¹²⁸AACWWAGIK¹³⁶ может нарушать подобного рода взаимодействия и влиять на формирование и стабильность каталитически активного тетрамера интегразы. Компьютерная модель комплекса производного гидроксикумарина с димером каталитического домена приведена на рис. 5.

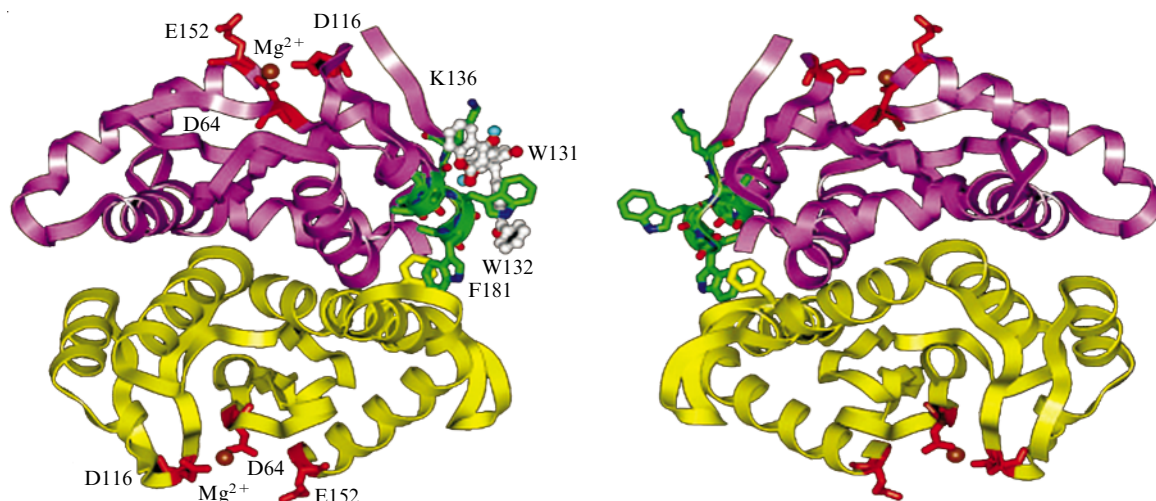


Рис. 5. Гипотетическая тетрамерная организация интегразы из двух симметричных димеров и структура комплекса гидроксикумарина с димером каталитического домена интегразы.⁶² Белым цветом показана структура производного гидроксикумарина, зеленым — аминокислотные остатки пептида ¹²⁸AACWWAGIK¹³⁶, красным — ион магния и каталитическая триада D,D(35)E-мотива, желтым и розовым цветом показаны мономерные каталитические домены интегразы.

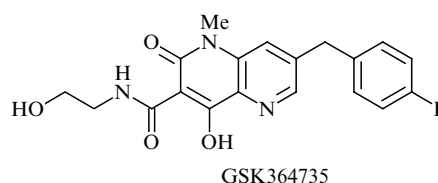
5. Ингибиторы интегразы ВИЧ-1, допущенные до стадии клинических испытаний

В связи с тем что ингибиторы интегразы являются одним из компонентов противовирусной терапии, отдельно остановимся на тех препаратах, которые дошли до стадии клинических испытаний, а следовательно, оказались наиболее эффективными и безопасными при доклиническом тестировании. Все эти соединения являются специфическими ингибиторами переноса цепи.

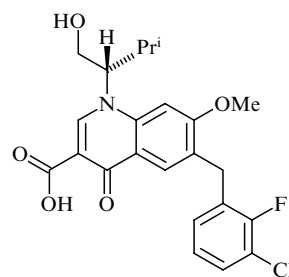
Первым ингибитором переноса цепи, дошедшим до клинических испытаний, было соединение S-1360 (см. табл. 3), синтезированное японской компанией Shionogi.⁶³ Оно эффективно подавляло как каталитическую активность рекомбинантной интегразы, так и репликацию вируса в культуре клеток: значение EC_{50} для него составляло ~ 200 нмоль $\cdot$ л⁻¹, в то время как цитотоксичность[‡] проявлялась только при микромолярных концентрациях ($CC_{50} = 12$ мкмоль $\cdot$ л⁻¹).⁶⁴ Препарат прошел первую фазу клинических испытаний, однако в 2003 г. исследования были прекращены в связи с его метаболической нестабильностью.

Один из наиболее эффективных ингибиторов класса нафтиридинов, L-870,810 (см. табл. 4), разработанных компанией Merck Pharmaceuticals, был снят с испытаний уже на первой стадии из-за обнаружения его токсичности для печени и почек.⁶⁴ Испытания второго препарата из этого же класса, L-870,812 (см. табл. 4), продолжаются.^{64, 65}

Еще одним перспективным ингибитором интегразы, близким по структуре к производным 8-гидрокси[1,6]нафтиридина, является соединение GSK364735, или S364735. Этот ингибитор был разработан совместно компаниями GlaxoSmithKline и Shionogi.⁶⁶



Это соединение способно подавлять активность рекомбинантной интегразы в реакции переноса цепи с $IC_{50} \approx 8$ нмоль $\cdot$ л⁻¹. Его противовирусная активность зависит от типа используемых клеток, но не превышает 5–7 нмоль $\cdot$ л⁻¹, что сравнимо с активностью лучших ингибиторов, таких как Исентресс, находящихся на стадии клинических испытаний. Так, EC_{50} для Исентресса, измеренное в тех же условиях, что и для GSK364735, составило около 2 нмоль $\cdot$ л⁻¹. Препарат GSK364735 продемонстрировал низкую цитотоксичность ($CC_{50} > 10$ мкмоль $\cdot$ л⁻¹). При изучении механизма ингибирования репликации ВИЧ-1 в культуре клеток было показано, что GSK364735 действительно ингибирует только стадию интеграции; он не влияет на суммарное количество вирусной ДНК, в то время как количество интегрированной ДНК снижается, а количество кольцевой ДНК растет. При селекции устойчивых к GSK364735 штаммов вируса обнаружилось, что этот препарат вызывает возникновение нескольких мутаций в гене интегразы, основной из которых является замена Gln148Arg, возникающая также при обработке вируса препаратом Elvitegravir.



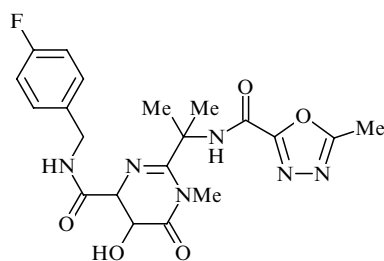
Elvitegravir (JTK-303/GS-9137)

[‡] CC_{50} — цитотоксическая концентрация ингибитора, вызывающая гибель 50% клеток вируса; EC_{50} — эффективная концентрация ингибитора, ответ на которую равен половине максимально возможного эффекта.

Это может указывать на схожесть механизмов действия препаратов Elvitegravir и GSK364735, однако последний не приводит к возникновению таких типичных для ингибитора Elvitegravir мутаций, как Thr66Ile и Glu92Gln. Более того, рекомбинантные белки, несущие эти мутации, ингибируются GSK364735 даже лучше, чем интегразы дикого типа. Вместе с тем на стадии доклинических испытаний была обнаружена устойчивость к GSK364735 штаммов ВИЧ-1, устойчивых к Исентресс. При клинических испытаниях GSK364735 оказалось, что этот препарат вызывает более чем 100-кратное снижение содержания вируса в крови пациентов, однако затем испытания были остановлены из-за обнаружившейся гепатотоксичности препарата.⁶⁶

В настоящее время ингибитор интегразы — Elvitegravir (JTK-303/GS-9137)[§] — находится на третьей стадии клинических испытаний. Этот ингибитор эффективно снижает уровень вируса в крови пациентов и не вызывает серьезных побочных эффектов. Однако поддерживать необходимую концентрацию препарата в плазме крови можно лишь тогда, когда пациенты одновременно принимают GS-9137 и ритонавир, который выступает как ингибитор цитохрома P450 — фермента, играющего главную роль в метаболизме GS-9137. К настоящему времени уже выделены штаммы ВИЧ-1, устойчивые к JTK-303/GS-9137, и определены мутации в гене интегразы, приводящие к возникновению лекарственной устойчивости.⁶⁷ Всего обнаружено восемь аминокислотных замен в каталитическом домене интегразы, основными из которых считаются Thr66Ile и Glu92Gln, расположенные в активном сайте. Необходимо, однако, отметить, что репликативная активность устойчивых к JTK-303/GS-9137 штаммов ВИЧ-1 значительно ниже, чем активность вируса дикого типа, а также мутантных форм, устойчивых к L-870,810.

И наконец, несколько слов о препарате Исентресс (Raltegravir), который успешно прошел клинические испытания. Этот препарат был разработан компанией Merck Pharmaceuticals и изначально назывался МК-0518.⁶³



Raltegravir (MK-0518)

Препарат был впервые испытан в клинике в 2004 г., а в феврале 2006 г. началась Фаза III его клинических испытаний.⁶⁵ Ингибитор значительно снижал уровень вируса в крови пациентов как при монотерапии, так и в сочетании с нуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы. Более того, он был эффективен при исследовании на пациентах, устойчивых к другим противовирусным препаратам. Препарат в целом хорошо переносился. Кроме того, поскольку МК-0518 метаболизируется глюкуронозилтрансфе-

разой,⁶⁸ этот препарат, в отличие от JTK-303/GS-9137, не требует присутствия ингибиторов цитохрома P450 для поддержания необходимой концентрации ингибитора в плазме крови. Решение Администрации по продуктам питания и лекарственным препаратам США одобрить Исентресс в качестве препарата для лечения СПИДа основано на результатах клинических испытаний, в которых участвовали 699 ВИЧ-положительных взрослых пациентов, имеющих опыт приема противоретровирусной терапии.⁶⁵ В группе испытуемых, принимавших Исентресс в сочетании с другими препаратами, доля пациентов с неопределяемой вирусной нагрузкой составила 62%. Этот показатель для тех, кто вместе с ранее применявшимися препаратами получал плацебо, составлял 36%. Необходимо также отметить, что у ряда пациентов, принимавших Исентресс, возникла лекарственная устойчивость.⁶⁵ Анализ генома устойчивых к препарату штаммов ВИЧ-1 показал, что в 32 случаях из 41 устойчивость была связана с мутациями в гене интегразы, вызванными заменами Asn155His и Gln148Lys/Arg/His.

Появление нового класса лекарств — ингибиторов интегразы — особенно важно для тех ВИЧ-инфицированных пациентов, у кого развилась резистентность к другим препаратам. Исентресс назначается в виде таблеток по 400 мг два раза в день, независимо от приема пищи, в составе комплексной терапии.⁶⁵ В настоящее время препарат разрешен к применению в США только для взрослых, имеющих резистентность к препаратам других классов. Очевидно, понадобятся еще некоторое время и дополнительные исследования, чтобы получить разрешение на применение нового лекарства ВИЧ-инфицированными пациентами, ранее не принимавшими других препаратов, а также детьми и беременными женщинами.

IV. Заключение

К настоящему времени достигнут значительный прогресс в разработке ингибиторов интегразы ВИЧ-1. Помимо трех групп низкомолекулярных ингибиторов интегразы (см. разделы III.2–III.4), из которых наиболее эффективными оказались соединения, специфически подавляющие реакцию переноса цепи, в настоящее время интенсивно изучаются пептидные^{69–71} и олигонуклеотидные^{72–78} ингибиторы, а также антитела к С-концевому домену интегразы.^{79,80} Интерес к этим соединениям обусловлен тем, что их механизм действия отличается от механизма классических низкомолекулярных ингибиторов. Предполагается, что использование препаратов с иным механизмом действия, чем классические ингибиторы переноса цепи, позволит лечить пациентов, резистентных к JTK-303/GS-9137 или Исентрессу.

Вместе с тем дальнейшие исследования в области разработки ингибиторов интегразы существенно затрудняются недостатком информации о структуре полноразмерного белка, его мультимерности, взаимодействии с другими компонентами ПИК и ядерном импорте. Для более детального изучения механизма действия ингибиторов желательны провести рентгеноструктурный анализ их комплексов с ферментом, а для повышения эффективности разработки ингибиторов интегразы — большое количество структурно-функциональных исследований этого фермента.

Обзор подготовлен при финансовой поддержке МНТЦ (грант 3197р/ВТЕР 111) и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты №№ 08-04-01252 и 08-04-01293).

§ Некоторое время назад японская компания Japan Tobacco продала права на разработку препарата JTK-303 компании Gilead Sciences, после чего это соединение получило название GS-9137 (см.^{63,65}).

Литература

1. Y.Pommier, A.A.Johnson, C.Marchand. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **4**, 236 (2005)
2. E.De Clercq. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6**, 1001 (2007)
3. M.Sharkey, K.Triques, D.R.Kuritzkes, M.Stevenson. *J. Virol.*, **79**, 5203 (2005)
4. T.K.Chui, D.R.Davies. *Curr. Top. Med. Chem.*, **4**, 965 (2004)
5. Ю.Ю.Агапкина, Т.А.Приказчикова, М.А.Смолов, М.Б.Готтих. *Успехи биол. химии*, **45**, 87 (2005)
6. F.Dyda, B.Hickman, T.M.Jenkins, A.Engelman, R.Craigie, D.R.Davies. *Science*, **266**, 1981 (1994)
7. P.A.Rice, T.A.Baker. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 302 (2001)
8. P.O.Brown. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **157**, 19 (1990)
9. F.D.Bushman, R.Craigie. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 1339 (1991)
10. M.D.Miller, C.M.Farnet, F.D.Bushman. *J. Virol.*, **71**, 5382 (1997)
11. C.M.Farnet, F.D.Bushman. *Cell*, **88**, 483 (1997)
12. C.M.Farnet, W.A.Haseltine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4164 (1990)
13. S.Carteau, C.Hoffmann, F.Bushman. *J. Virol.*, **72**, 4005 (1998)
14. A.Engelman, F.D.Bushman, R.Craigie. *EMBO J.*, **12**, 3269 (1993)
15. C.Vink, A.A.M.O.Groeneger, R.H.A.Plasterk. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1419 (1993)
16. Y.Goldgur, F.Dyda, A.B.Hickman, T.M.Jenkins, R.Craigie, D.R.Davies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9150 (1998)
17. M.Cai, R.Zheng, M.Caffrey, R.Craigie, G.M.Clore, A.M.Gronenborn. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 567 (1997)
18. P.J.Lodi, J.A.Ernst, J.Kuszewski, A.B.Hickman, A.Engelman, R.Craigie, G.M.Clore, A.M.Gronenborn. *Biochemistry*, **34**, 9826 (1995)
19. J.C.-H.Chen, J.Krucinski, L.J.W.Miercke, J.S.Finer-Moore, A.H.Tang, A.D.Leavitt, R.M.Stroud. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8233 (2000)
20. J.-Y.Wang, H.Ling, W.Yang, R.Craigie. *EMBO J.*, **20**, 7333 (2001)
21. P.Polard, M.Chandler. *Mol. Microbiol.*, **15**, 13 (1995)
22. A.D.Leavitt, L.Shieue, H.E.Varmus. *J. Biol. Chem.*, **268**, 2113 (1993)
23. L.Haren, B.Ton-Hoang, M.Chandler. *Annu. Rev. Microbiol.*, **53**, 245 (1999)
24. S.A.Chow, K.A.Vincent, V.Ellison, P.O.Brown. *Science*, **255**, 723 (1992)
25. K.A.Vincent, V.Ellison, S.A.Chow, P.O.Brown. *J. Virol.*, **67**, 425 (1993)
26. S.A.Wolfe, L.Nekludova, C.O.Pabo. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **3**, 183 (2000)
27. R.Zheng, T.M.Jenkins, R.Craigie. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13659 (1996)
28. A.M.Woerner, C.J.Marcus-Sekura. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3507 (1993)
29. R.A.P.Lutzke, C.Vink, R.H.A.Plasterk. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4125 (1994)
30. D.Esposito, R.Craigie. *Adv. Virus Res.*, **52**, 319 (1999)
31. E.Deprez, S.Barbe, M.Kolaski, H.Leh, F.Zouhiri, C.Auclair, J.-C.Brochon, M.Le Bret, J.-F.Mouscadet. *Mol. Pharmacol.*, **65**, 85 (2004)
32. P.O.Brown. *Integration in Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview; New York, 1997
33. C.Marchand, A.A.Johnson, R.G.Karki, G.C.G.Pais, X.C.Zhang, K.Cowansage, T.A.Patel, M.C.Nicklaus, T.R.Burke Jr., Y.Pommier. *Mol. Pharmacol.*, **64**, 600 (2003)
34. Y.Pommier, N.Neamati. *Adv. Virus Res.*, **52**, 427 (1999)
35. Y.Pommier, C.Marchand, N.Neamati. *Antiviral. Res.*, **47**, 139 (2000)
36. R.Dayam, N.Neamati. *Curr. Pharm. Design*, **9**, 1789 (2003)
37. A.A.Johnson, C.Marchand, Y.Pommier. *Curr. Top. Med. Chem.*, **4**, 1059 (2004)
38. M.Witvrouw, B.Van Maele, J.Vercammen, A.Hantson, Y.Engelborghs, E.De Clercq, C.Pannecouque, Z.Debysen. *Curr. Drug Metab.*, **5**, 291 (2004)
39. E.A.Semenova, C.Marchand, Y.Pommier. *Adv. Pharmacol.*, **56**, 199 (2008)
40. R.Dayam, J.Deng, N.Neamati. *Med. Res. Rev.*, **26**, 271 (2006)
41. Д.В.Акимов, Д.А.Филимонов, В.В.Поройков. *Хим.-фарм. журн.*, **36**, 3 (2002)
42. D.J.Hazuda, P.Felock, M.Witmer, A.Wolfe, K.Stillmock, J.A.Grobler, A.Espeseth, L.Gabryelski, W.Schleif, C.Blau, M.D.Miller. *Science*, **287**, 646 (2000)
43. C.Maurin, F.Bailly, E.Buisine, H.Vezin, G.Mbamba, J.-F.Mouscadet, P.Cotelle. *J. Med. Chem.*, **47**, 5583 (2004)
44. M.Melek, J.M.Jones, M.H.O'Dea, G.Pais, T.R.Burke Jr., Y.Pommier, N.Neamati, M.Gellert. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 134 (2002)
45. A.S.Espeseth, P.Felock, A.Wolfe, M.Witmer, J.Grobler, N.Anthony, M.Egbertson, J.Y.Melamed, S.Young, T.Hamill, J.L.Cole, D.J.Hazuda. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11244 (2000)
46. J.A.Grobler, K.Stillmock, B.Hu, M.Witmer, P.Felock, A.S.Espeseth, A.Wolfe, M.Egbertson, M.Bourgeois, J.Melamed, J.S.Wai, S.Young, J.Vacca, D.J.Hazuda. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6661 (2002)
47. C.Marchand, X.C.Zhang, G.C.G.Pais, K.Cowansage, N.Neamati, T.R.Burke, Y.Pommier. *J. Biol. Chem.*, **277**, 12596 (2002)
48. J.S.Wai, M.S.Egbertson, L.S.Payne, T.E.Fisher, M.W.Embrey, L.O.Tran, J.Y.Melamed, H.M.Langford, J.P.Guare Jr., L.Zhuang, V.E.Grey, J.P.Vacca, M.K.Holloway, A.M.Naylor-Olsen, D.J.Hazuda, P.J.Felock, A.L.Wolfe, K.A.Stillmock, W.A.Schleif, L.J.Gabryelski, S.D.Young. *J. Med. Chem.*, **43**, 4923 (2000)
49. A.Billich. *Curr. Opin. Invest. Drugs*, **4**, 206 (2003)
50. C.Stanwell, B.Ye, S.H.Yuspa, T.R.Burke Jr. *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 475 (1996)
51. L.Zhuang, J.S.Wai, M.W.Embrey, T.E.Fisher, M.S.Egbertson, L.S.Payne, J.P.Guare Jr., J.P.Vacca, D.J.Hazuda, P.J.Felock, A.L.Wolfe, K.A.Stillmock, M.V.Witmer, G.Moyer, W.A.Schleif, L.J.Gabryelski, Y.M.Leonard, J.J.Lynch Jr., S.R.Michelson, S.D.Young. *J. Med. Chem.*, **46**, 453 (2003)
52. D.J.Hazuda, N.J.Anthony, R.P.Gomez, S.M.Jolly, J.S.Wai, L.Zhuang, T.E.Fisher, M.Embrey, J.P.Guare Jr., M.S.Egbertson, J.P.Vacca, J.R.Huff, P.J.Felock, M.V.Witmer, K.A.Stillmock, R.Danovich, J.Grobler, M.D.Miller, A.S.Espeseth, L.Jin, I.-W.Chen, J.H.Lin, K.Kassahun, J.D.Ellis, B.K.Wong, W.Xu, P.G.Pearson, W.A.Schleif, R.Cortese, E.Emini, V.Summa, M.K.Holloway, S.D.Young. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 11233 (2004)
53. M.W.Embrey, J.S.Wai, T.W.Funk, C.F.Homnick, D.S.Perlow, S.D.Young, J.P.Vacca, D.J.Hazuda, P.J.Felock, K.A.Stillmock, M.V.Witmer, G.Moyer, W.A.Schleif, L.J.Gabryelski, L.Jin, I.-W.Chen, J.D.Ellis, B.K.Wong, J.H.Lin, Y.M.Leonard, N.N.Tsoue, L.Zhuang. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 4550 (2005)
54. J.P.Guare, J.S.Wai, R.P.Gomez, N.J.Anthony, S.M.Jolly, A.R.Cortes, J.P.Vacca, P.J.Felock, K.A.Stillmock, W.A.Schleif, G.Moyer, L.J.Gabryelski, L.Jin, I.-W.Chen, D.J.Hazuda, S.D.Young. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 2900 (2006)
55. C.Pannecouque, W.Pluyms, B.Van Maele, V.Tetz, P.Cherepanov, E.De Clercq, M.Witvrouw, Z.Debysen. *Curr. Biol.*, **12**, 1169 (2002)
56. A.Hombrouck, A.Hantson, B.Van Remoortel, M.Michiels, J.Vercammen, D.Rhodes, V.Tetz, Y.Engelborghs, F.Christ, Z.Debysen, M.Witvrouw. *J. Antimicrob. Chemother.*, **59**, 1084 (2007)

57. K.Mekouar, J.-F.Mouscadet, D.Desmaële, F.Subra, H.Leh, D.Savouré, C.Auclair, J.d'Angelo. *J. Med. Chem.*, **41**, 2846 (1998)
58. F.Zouhiri, J.-F.Mouscadet, K.Mekouar, D.Desmaële, D.Savouré, H.Leh, F.Subra, M.Le Bret, C.Auclair, J.d'Angelo. *J. Med. Chem.*, **43**, 1533 (2000)
59. T.M.Jenkins, D.Esposito, A.Engelman, R.Craigie. *EMBO J.*, **16**, 6849 (1997)
60. S.Bonnenfant, C.M.Thomas, C.Vita, F.Subra, E.Deprez, F.Zouhiri, D.Desmaële, J.d'Angelo, J.-F.Mouscadet, H.Leh. *J. Virol.*, **78**, 5728 (2004)
61. A.Mazumder, S.Wang, N.Neamati, M.Nicklaus, S.Sunder, J.Chen, G.W.A.Milne, W.G.Rice, T.R.Burke Jr., Y.Pommier. *J. Med. Chem.*, **39**, 2472 (1996)
62. L.Q.Al-Mawsawi, V.Fikkert, R.Dayam, M.Witvrouw, T.R.Burke Jr., C.H.Borchers, N.Neamati. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 10080 (2006)
63. A.Savarino. *Expert Opin. Invest. Drugs*, **15**, 1507 (2006)
64. P.Cotelle. *Recent Pat. Anti-Infective Drug Discov.*, **1**, 1 (2006)
65. J.Jones, B.Taylor, T.J.Wilkin, S.M.Hammer. *Top. HIV Med.*, **15**, 48 (2007)
66. E.P.Garvey, B.A.Johns, M.J.Gartland, S.A.Foster, W.H.Miller, R.G.Ferris, R.J.Hazen, M.R.Underwood, E.E.Boros, J.B.Thompson, J.G.Weatherhead, C.S.Koble, S.H.Allen, L.T.Schaller, R.G.Sherrill, T.Yoshinaga, M.Kobayashi, C.Wakasa-Morimoto, S.Miki, K.Nakahara, T.Noshi, A.Sato, T.Fujiwara. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 901 (2008)
67. K.Shimura, E.Kodama, Y.Sakagami, Y.Matsuzaki, W.Watanabe, K.Yamataka, Y.Watanabe, Y.Ohata, S.Doi, M.Sato, M.Kano, S.Ikeda, M.Matsuoka. *J. Virol.*, **82**, 764 (2008)
68. K.Kassahun, I.McIntosh, D.Cui, D.Hreniuk, S.Merschman, K.Lasseter, N.Azrolan, M.Iwamoto, J.A.Wagner, L.A.Wenning. *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 1657 (2007)
69. R.A.P.Lutzke, N.A.Eppens, P.A.Weber, R.A.Houghten, R.H.A.Plasterk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11456 (1995)
70. C.Desjobert, V.R.de Soultrait, A.Faure, V.Parissi, S.Litvak, L.Tarrago-Litvak, M.Fournier. *Biochemistry*, **43**, 13097 (2004)
71. R.G.Maroun, S.Gayet, M.S.Benleulmi, H.Porumb, L.Zargarian, H.Merad, H.Leh, J.-F.Mouscadet, F.Troalen, S.Fermandjian. *Biochemistry*, **40**, 13840 (2001)
72. J.-F.Mouscadet, S.Carteau, H.Goulaouic, F.Subra, C.Auclair. *J. Biol. Chem.*, **269**, 21635 (1994)
73. R.F.Rando, J.O.Ojwang, A.Elbaggari, G.R.Reyes, R.Tinder, M.S.McGrath, M.E.Hogan. *J. Biol. Chem.*, **270**, 1754 (1995)
74. P.Cherepanov, J.A.Este, R.F.Rando, J.O.Ojwang, G.Reekmans, R.Steinfeld, G.David, E.De Clercq, Z.Debysier. *Mol. Pharmacol.*, **52**, 771 (1997)
75. J.Snasek, D.Rejman, R.Liboska, Z.Tocik, T.Ruml, I.Rosenberg, I.Pichova. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 980 (2001)
76. P.Brodin, M.Pinskaya, M.Buckle, U.Parsch, E.Romanova, J.Engels, M.Gottikh, J.-F.Mouscadet. *Biochemistry*, **41**, 1529 (2002)
77. M.Pinskaya, E.Romanova, E.Volkov, E.Deprez, H.Leh, J.-C.Brochon, J.-F.Mouscadet, M.Gottikh. *Biochemistry*, **43**, 8735 (2004)
78. Т.А.Приказчикова, Е.М.Волков, Е.М.Зубин, Е.А.Романова, М.Б.Готтих. *Мол. биол.*, **41**, 130 (2007)
79. P.Levy-Mintz, L.Duan, H.Zhang, B.Hu, G.Dornadula, M.Zhu, J.Kulkosky, D.Bizub-Bender, A.M.Skalka, R.J.Pomerantz. *J. Virol.*, **70**, 8821 (1996)
80. J.Ramcharan, D.M.Colleluori, G.Merkel, M.D.Andrake, A.M.Skalka. *Retrovirology*, **3**, 34 (2006)

HIV-1 INTEGRASE INHIBITORS AS NEW COMPONENTS OF ANTIVIRAL THERAPY

T.A.Prikazchikova, A.M.Sycheva, Yu.Yu.Agapkina, D.A.Aleksandrov, M.B.Gottikh

A.N.Belozersky Research Institute of Physical and Chemical Biology

Department of Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University

Vorobievy Gory, 119991 Moscow, Russian Federation, Fax +7(495)939-3181

Structural and functional features of the HIV-1 integrase are examined and the current state in the search for effective inhibitors of this enzyme is reviewed. Main classes of integrase inhibitors with known mechanisms of action and *in vitro* and *in vivo* inhibiting activity are presented.

Bibliography — 80 references.

Received 24th January 2008