

УДК 578.282

Структурно-функциональный анализ 2,1,3-бензоксадиазолов и их N-оксидов в качестве ингибиторов интегразы ВИЧ-1

С. П. Королев^{1,2*}, О. В. Кондрашина^{1,2}, Д. С. Дружиловский³, А. М. Старосотников⁴, М. Д. Дутов⁴, М. А. Бастраков⁴, И. Л. Далингер⁴, Д. А. Филимонов³, С. А. Шевелев⁴, В. В. Поройков³, Ю. Ю. Агапкина^{1,2}, М. Б. Готтих^{1,2}

¹ Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

² Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

³ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8

⁴ Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, 119991, Москва, Ленинский просп., 47

*E-mail: spkorolev@mail.ru

Поступила в редакцию 01.10.2012

РЕФЕРАТ Интегразы вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) считается одной из самых привлекательных мишеней для разработки ингибиторов этого вируса. В настоящей работе изучена способность ряда отобранных с использованием компьютерной программы PASS 2,1,3-бензоксадиазолов (бензофуразанов) и их N-оксидов (бензофуруксанов) подавлять каталитическую активность интегразы ВИЧ-1. Установлено, что ингибирующая способность этих соединений сильно зависит от наличия нитрогруппы. Показано, что нитробензофуразаны и нитробензофуруксаны препятствуют связыванию ДНК-субстрата в активном центре фермента. Эти ингибиторы оказались активными и в отношении мутантов интегразы, устойчивых к действию ралтегравира – единственного разрешенного к клиническому применению ингибитора интегразы. Сравнение полученных с использованием компьютерных программ фармакодинамических и фармакокинетических характеристик исследованных в данной работе соединений и ралтегравира свидетельствует о перспективности дальнейшего их изучения в качестве ингибиторов интегразы ВИЧ-1.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА интегразы ВИЧ-1, ингибирование, нитробензофуруксан, нитробензофуразан, PASS, QikProp.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БФЗ – бензофуразан; БФКС – бензофуруксан; ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека типа 1; ИН – интегразы; СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита; ADME – адсорбция, распределение, метаболизм, экскреция; IC₅₀ – концентрация ингибитора, подавляющая активность фермента на 50%; IC₉₅ – концентрация ингибитора, подавляющая активность фермента на 95%; PASS – компьютерная программа для предсказания спектра активностей веществ; QikProp – компьютерная программа для предсказания фармакокинетических параметров веществ.

ВВЕДЕНИЕ

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) вызывает одно из наиболее опасных заболеваний – синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД). Очень высокие темпы роста числа ВИЧ-инфицированных в России делают разработку эффективных лекарственных средств для борьбы с этим вирусом особенно актуальной для нашей страны. Одной из перспективных мишеней для ингибиторов ВИЧ-1 считается фермент интегразы (ИН), которая катализирует ключевую стадию в репликативном цикле ВИЧ – интеграцию вирусной ДНК в клеточную [1].

При ВИЧ-инфекции применяют высокоактивную антиретровирусную терапию, включающую в настоящий момент 25 препаратов [2], основными из которых являются ингибиторы двух вирусных ферментов: обратной транскриптазы и протеазы. В конце 2007 года разрешен к применению в качестве нового средства против СПИДа первый ингибитор ИН – препарат Isentress™, или ралтегравир [3]. Однако даже комплексная терапия не способна полностью подавить репликацию вируса, и с течением времени вирус становится устойчивым к ней. Так показано, что устойчивость к ралтегравиру развивается у некоторых па-

циентов в течение 12 нед. [4]. На стадии клинических испытаний находятся в основном только ингибиторы ИН, близкие к ралтегравиру по механизму действия [5]. Уже показано, что к ним возникает устойчивость, перекрестная с ралтегравиром [6]. В связи с этим разработка новых ингибиторов интеграции, отличных по механизму действия от ралтегравира, представляет актуальную задачу.

В последние годы для поиска новых физиологически активных веществ и их оптимизации широко применяются методы компьютерного конструирования [7]. В частности, компьютерные методы используются при создании ингибиторов ИН ВИЧ-1 [8–10]. При помощи разработанной нами компьютерной программы PASS [11, 12] проведены виртуальный скрининг и отбор возможных ингибиторов ИН среди коммерчески доступных и потенциально синтезируемых соединений [13, 14], а с использованием специализированной версии программы PASS [14] отобраны производные 2,1,3-бензоксадиазолов (бензофуразанов) и их N-оксидов (бензофуроксанов). Эти соединения были синтезированы, и в настоящей работе экспериментально изучена их способность подавлять каталитическую активность ИН ВИЧ-1.

В ходе репликации вируса ИН катализирует две реакции: реакцию 3'-концевого процессинга вирусной ДНК, в результате которого с обоих 3'-концов удаляется динуклеотид GT; и реакцию переноса цепи, в ходе которой вирусная ДНК встраивается в клеточную. Ралтегравир и его аналоги называются ингибиторами переноса цепи, поскольку более эффективно подавляют именно эту реакцию [15]. Мы обнаружили, что бензофуразаны (БФЗ) и бензофуроксаны (БФКС) в основном одинаково влияют на обе катализируемые ИН реакции. Показано, что ингибирующая способность этих соединений сильно зависит от присутствия нитрогруппы. В серии замещенных 4-нитро-БФЗ/БФКС найдены соединения, в концентрации 0.5–1 мкМ блокирующие ИН. Эти ингибиторы оказались активными и в отношении мутантных ИН, устойчивых к действию ралтегравира.

Проведена оценка фармакодинамических и фармакокинетических характеристик БФЗ и БФКС, полученных с использованием компьютерных программ PASS и QikProp [16], показаны потенциальные преимущества этих соединений перед ралтегравиром.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Компьютерные программы и базы данных

Специализированную версию компьютерной программы PASS, обученную на основе выборки из 218 соединений с изученной способностью подавлять ИН, использовали для виртуального скрининга и от-

бора в базах данных коммерчески доступных образцов и потенциально синтезируемых соединений, веществ, с высокой вероятностью ингибирующих ИН ВИЧ-1 [14]. Из них 35 действуют на 3'-процессинг ($IC_{50} < 100$ мкМ), 28 ингибируют реакцию переноса цепи ($IC_{50} < 100$ мкМ), остальные не обладают рассматриваемой активностью. Общий фармакологический профиль новых ингибиторов ИН оценивали с использованием современной стандартной версии программы PASS (12.06.22) [11, 12], позволяющей предсказать 513 возможных побочных и токсических эффектов. Результат выдается пользователю в виде упорядоченного списка возможных видов биологической активности с оценками P_a и P_i , характеризующими вероятность присутствия/отсутствия каждой активности соответственно.

Для оценки фармакокинетических параметров ADME анализируемых молекул использовали программу QikProp [16], которая обеспечивает расчет физико-химических характеристик лекарственного подобия. Эта программа широко применяется для отсеивания соединений с заведомо неперспективными фармакокинетическими характеристиками [17–19]. Рекомендуемый для перспективных соединений диапазон значений параметров, оцениваемых программой QikProp, приведен в работе [14].

1,2,5-Бензоксадиазолы (бензофуразаны) и их N-оксиды (бензофуроксаны)

1,2,5-Бензоксадиазолы и их N-оксиды синтезировали по известным [20–22] или аналогичным методикам.

Олигодезоксирибонуклеотиды

Олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали амидофосфитным методом на автоматическом ДНК-синтезаторе ABI 3400 («Applied Biosystems», США) по стандартному регламенту с использованием коммерческих реагентов («Glen Research», США). Олигонуклеотиды U5B (5'-GTGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3') и U5A (5'-ACTGCTAGAGATTTTCACAC-3') формировали дуплекс, имитирующий концевой участок U5-фрагмента длинного концевого повтора вирусной ДНК, который служит субстратом ИН в реакции 3'-процессинга. Дуплекс олигонуклеотидов U5B-2 (5'-GTGTGGAAAATCTCTAGCA-3') и U5A использовали в реакции переноса цепи. Влияние ингибиторов на правильную укладку ДНК в активном центре ИН изучали с использованием дуплекса U5B/U5A^m (5'-ACT^mGCTAGAGATTTTCACAC-3'), где T^m – 2'-O-(2,3-дигидроксипропил)-уридин, синтезированный по методике [23]. Олигонуклеотиды N155H (5'-CTGTCCTATAATTTTCTTTAATTCTTTATGCATAGATTCTATTACCCCTGA-3'), G140S

(5'-GGGGATCAAGCAGGAATTTAGCATTCCTAC-AATC-3'), Q148K (5'-GCATTCCTACAAATCCSSAA-AGTAAGGGGGTAATAG-3') и комплементарные им N155H_a, G140S_a и Q148K_a использовали в качестве праймеров для сайт-направленного мутагенеза гена интегразы ВИЧ-1 с целью получения генов мутантных форм интегразы (N155H, G140S/Q148K).

Ферменты

Рекомбинантную ИН ВИЧ-1 выделяли из клеток штамма-продуцента Rosetta *Escherichia coli* и очищали без добавления детергента как описано в [24]. Плазмиды, содержащие гены мутантных форм ИН (замены N155H и G140S/Q148H), получены при помощи сайт-направленного мутагенеза плазмиды, кодирующей ИН дикого типа, с использованием набора QuikChange II Site-Directed Mutagenesis kit («Agilent Technologies», США). Все процедуры осуществляли в соответствии с инструкциями производителя. Мутантные белки выделяли и очищали аналогично ИН ВИЧ-1 дикого типа [24].

Получение ³²P-меченного субстрата интегразы

Радиоактивную метку ³²P вводили на 5'-конец олигонуклеотида U5B или U5B-2. С этой целью 10 пмоль олигонуклеотида инкубировали с T4-полинуклеотидкиназой («Fermentas», Литва) и 50 мкКи [γ-³²P]АТР (3000 Ки/ммоль) в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреитол (ДТТ), 0.1 мМ спермидин, 0.1 мМ EDTA, в течение 1 ч при 37°C. После этого киназу инактивировали, добавляя EDTA (25 мМ) и нагревая до 65°C в течение 10 мин. Добавляли эквимольное количество комплементарного олигонуклеотида U5A и формировали дуплекс нагреванием смеси олигонуклеотидов до 95°C с последующим медленным охлаждением до комнатной температуры. Дуплекс U5B/U5A окончательно очищали от избытка [γ-³²P]АТР и солей на колонке MicroSpin G-25 Columns («Amersham Biosciences», США).

Ингибирование реакции 3'-концевого процессинга

³²P-меченный дуплекс U5B/U5A (3 нМ) инкубировали с ИН (100 нМ) в 20 мкл буфера (20 мМ HEPES, рН 7.2, 7.5 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ) в присутствии ингибитора в возрастающих концентрациях при 37°C в течение 2 ч. Реакцию останавливали 80 мкл стоп-раствора (7 мМ EDTA, 0.3 М NaOAc, 10 мМ Трис-НСl, рН 8, 0.125 мг/мл гликоген). Интегразу экстрагировали смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт = 25 : 24 : 1, ДНК-дуплекс осаждали этиловым спиртом (250 мкл) и анализировали электрофоретически в 20% полиакриламидном геле (ПААГ) с 7 М мочевиной. Гель анализировали при помощи прибора STORM 840™

Phosphorimager («Molecular Dynamics», США). О протекании реакции судили по появлению на геле полосы, соответствующей по подвижности олигонуклеотиду U5B, укороченному на два звена. Эффективность реакции оценивали при помощи программы Image QuANT™ 4.1. По результатам трех независимых опытов строили кривую зависимости эффективности протекания 3'-процессинга от концентрации ингибитора. По кривой определяли значение IC₅₀ как концентрацию ингибитора, при которой реакция подавляется на 50%.

Ингибирование реакции переноса цепи

Реакцию проводили как в случае ингибирования 3'-процессинга, используя ³²P-меченный дуплекс U5B-2/U5A (10 нМ) и ИН (100 нМ). О протекании реакции судили по появлению в геле полос с меньшей подвижностью, чем у исходного олигонуклеотида U5B-2.

Метод «торможения» в геле

³²P-меченный дуплекс U5B/U5A (0.05 пмоль) инкубировали с интегразой (2 пмоль) в буфере, содержащем 20 мМ HEPES, рН 7.2, 7.5 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 5% глицерин, при 20°C в течение 30 мин. К пресформированному фермент-субстратному комплексу добавляли возрастающие количества олигонуклеотидного ингибитора (0.01–10.0 мкМ), смесь инкубировали при 37°C в течение 5 мин, а затем наносили на 8% ПААГ (соотношение акриламид-бисакриламид = 40 : 1), не содержащий мочевины. Буфер для электрофореза содержал 20 мМ Трис-ацетат, рН 7.2, 7.5 мМ MgCl₂. Гель анализировали с помощью прибора STORM 840™ Phosphorimager.

Влияние ингибитора на правильную укладку ДНК в активном центре ИН

Непосредственно перед опытом 2,3-дигидроксипропильную группировку в составе олигонуклеотидного дуплекса окисляли до альдегидной группы: к 10 пмоль дуплекса U5B/U5A^m, содержащего ³²P-меченный модифицированный олигонуклеотид U5A^m в 15 мкл 30 мМ ацетата натрия (рН 4.5), добавляли 15 мкл свежеприготовленного 230 мМ водного раствора периодата натрия. Смесь перемешивали и инкубировали в течение 1 ч при 25°C в темноте. Затем добавляли 170 мкл 2 М водного раствора перхлората лития, олигонуклеотидный материал осаждали 1 мл ацетона. Полученный дуплекс U5B/U5A^m, содержащий олигонуклеотид с 2'-альдегидной группой (U5A^m), растворяли в буфере, содержащем 20 мМ HEPES, рН 7.2, 7.5 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ. Ковалентное присоединение окисленного дуплекса U5B/U5A^m (10 нМ) к ИН (100 нМ) проводили в 20 мкл буфера,

содержащего 20 мМ HEPES, pH 7.2, 7.5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT, в присутствии возрастающих концентраций ингибитора в течение 1 ч при 37°C. Затем продукт реакции восстанавливали, добавляя 2 мкл 300 мМ свежеприготовленного раствора NaBH₃CN и инкубируя в течение 30 мин при 37°C. Реакционную смесь анализировали в ПААГ по Лэммли. Меченые продукты визуализировали с помощью прибора STORM 840™ Phosphorimager. Эффективность протекания реакции оценивали по интенсивности полосы, соответствующей ковалентно связанному комплексу ИН с ДНК, с помощью программы Image QuaNT™ 4.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Виртуальный скрининг новых ингибиторов интегразы

Для виртуального скрининга и отбора веществ, с высокой вероятностью являющихся ингибиторами ИН ВИЧ-1, использовали специализированную версию программы PASS [14]. Точность прогноза антиинтегразной активности, посчитанная для обучающей выборки из 218 веществ по методу скользящего контроля с исключением по одному, составила 81%. При помощи данной версии PASS получен прогноз биологической активности ралтегравира, который эффективно ингибирует реакцию переноса цепи (табл. 1). Рассчитанная вероятность наличия данной активности у ралтегравира (Pa) составила 0.948. Все это говорит о значительной способности программы PASS предсказывать антиинтегразную активность соединений.

Было проанализировано более 2 млн структурных формул веществ, принадлежащих к различным химическим классам. Среди отобранных на основе компьютерного прогноза структур оказались производные бензофуразанов и бензофуроксанов. Для проведения структурно-функциональных исследований синтезированы 27 различных соединений (табл. 1), входящих в эти структурные классы, у которых рассчитанная вероятность наличия способности ингибировать реакции 3'-процессинга и переноса цепи была больше 0.5.

Влияние структуры 1,2,5-бензоксадиазолов на их способность подавлять активность ИН

Способность БФЗ и БФКС подавлять каталитическую активность ИН изучена в реакциях 3'-концевого процессинга и переноса цепи с использованием рекомбинантного белка и ДНК-дуплексов U5B/U5A и U5B-2/U5A, соответствующих концевому участку вирусной ДНК до и после отщепления динуклеотида GT. Дуплекс U5B/U5A представлял собой субстрат ИН в реакции 3'-концевого процессинга, а дуплекс

U5B-2/U5A – в реакции переноса цепи. Необходимо отметить, что рекомбинантная ИН может использовать любую ДНК в качестве мишени для встраивания процессированного субстрата в реакции переноса цепи, поэтому дуплекс U5B-2/U5A служил одновременно и субстратом, и мишенью в этой реакции.

Незамещенный БФКС не проявлял ингибирующего действия ни в одной из реакций (табл. 1, соединение 1). Введение электронодонорного (метил) или электроноакцепторного (хлор) заместителей в 5-е положение лишь незначительно улучшало ингибирующую активность БФКС в реакции переноса цепи (табл. 1, 2 и 3). Однако 4-нитро-БФКС оказался значительно более эффективным ингибитором обеих реакций (табл. 1, 4).

Учитывая такое сильное влияние нитрогруппы, мы изучили влияние заместителей в положениях 5 и 7 на активность 4-нитро-БФКС. Оказалось, что наличие метильного остатка в любом из этих положений значительно повышало ингибирующую активность 4-нитро-БФКС (табл. 1, 5 и 6). При этом присутствие метильной группы в обоих положениях не давало дополнительного положительного эффекта, а наоборот несколько снижало эффективность ингибирования (табл. 1, 7). Усиление ингибирующей активности 4-нитро-БФКС в результате введения метильной группы в положение 5 или 7 можно было бы объяснить электронодонорным эффектом метильной группы. Для подтверждения или опровержения этого предположения определили эффективность ингибирования процессинга и переноса цепи производными 4-нитро-БФКС, содержащими в положении 7 другие электронодонорные заместители (табл. 1, 8 и 9). Оказалось, что оба эти соединения блокируют ИН с эффективностью, сравнимой с эффективностью незамещенного 4-нитро-БФКС. Таким образом, положительный индуктивный эффект метильной группы не может быть причиной повышенной ингибирующей активности соединений 5 и 6. Маловероятной причиной является и возможность гидрофобных взаимодействий метильной группы с белком, поскольку метоксигруппа теоретически также способна к таким взаимодействиям. Интересно, что производное 4-нитро-БФКС, содержащее электроноакцепторный заместитель – хлор в положении 7, оказалось более активным ингибитором, чем исходный 4-нитро-БФКС (табл. 1, 10), но уступало 7-метил-4-нитро-БФКС.

Далее мы определили, насколько важна роль N-оксида. С этой целью сравнили ингибирующее действие производных 4-нитро-БФКС и соответствующих производных 4-нитро-БФЗ. Незамещенный 4-нитро-БФЗ ингибировал обе исследуемые реакции несколько лучше, чем его N-оксид (табл. 1, 11 и 4), однако его метильные производные (соеди-

Таблица 1. Способность производных БФЗ и БФКС подавлять каталитическую активность ИН в реакциях 3'-процессинга и переноса цепи

Структура	№	R ₁	R ₂	Ингибирующая активность, IC ₅₀ , мкМ*	
				3'-процессинг	перенос цепи
Ралтегравир				0.50 ± 0.09	0.010 ± 0.003
	1	H	-	> 1000	> 1000
	2	CH ₃	-	> 1000	800 ± 200
	3	Cl	-	> 1000	500 ± 200
	4	H	H	80 ± 20	80 ± 30
	5	CH ₃	H	0.4 ± 0.1	1.0 ± 0.3
	6	H	CH ₃	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.2
	7	CH ₃	CH ₃	1.0 ± 0.3	7 ± 2
	8	H	OCH ₃	70 ± 20	80 ± 20
	9	H		50 ± 10	80 ± 30
	10	H	Cl	20 ± 5	50 ± 10
	11	H	H	30 ± 5	40 ± 10
	12	CH ₃	H	2.0 ± 0.4	3.0 ± 0.6
	13	H	CH ₃	3.0 ± 0.6	3.0 ± 0.5
	14	OCH ₃	H	75 ± 12	150 ± 40
	15	H	OCH ₃	80 ± 30	120 ± 20
	16	H		65 ± 11	70 ± 20
	17	H	Cl	10 ± 2	45 ± 12
	18	H	-SO ₂ -Ph	20 ± 5	15 ± 5
	19	H		10 ± 2	12 ± 3
	20	H		18 ± 6	20 ± 5
		21	H	H	400 ± 100
22		H	CH ₃	2.0 ± 0.4	0.3 ± 0.1
23		H	CH ₂ Br	6 ± 2	2.0 ± 0.5
24		H		75 ± 15	80 ± 20
	25	H	-	0.5 ± 0.1	5 ± 2
	26	H	-	6 ± 1	5 ± 1
	27	OCH ₃	-	100 ± 20	100 ± 30

*Усредненные значения, вычисленные по результатам не менее трех экспериментов.

Таблица 2. Ингибирование каталитической активности мутантных форм ИН, устойчивых к ралтегравиру, производными нитро-БФКС/БФЗ

Соединение, №	Ингибирующая активность в реакции переноса цепи, IC, мкМ*					
	дикий тип		мутант Q148K/G140S		мутант N155H	
	IC ₅₀	IC ₉₅	IC ₅₀	IC ₉₅	IC ₅₀	IC ₉₅
Ралтегравир	0.010 ± 0.003	0.40 ± 0.05	0.15 ± 0.03	3.0 ± 1.0	0.018 ± 0.005	5.2 ± 0.8
6	0.4 ± 0.2	3.5 ± 0.9	0.8 ± 0.3	4.3 ± 0.8	0.9 ± 0.3	8.2 ± 1.7
22	0.3 ± 0.1	6.8 ± 1.1	0.5 ± 0.2	1.0 ± 0.4	0.6 ± 0.1	7.6 ± 1.3
25	5.0 ± 2.0	18.0 ± 2.0	4.0 ± 1.5	15.3 ± 2.8	6.0 ± 1.8	18.8 ± 2.5

*Усредненные значения, вычисленные по результатам не менее трех экспериментов.

нения **12** и **13**) оказались в 3–6 раз менее активны, чем соединения **5** и **6** (табл. 1). Тем не менее в серии производных 4-нитро-БФЗ в целом сохранялись закономерности, обнаруженные нами для производных 4-нитро-БФКС (табл. 1).

Таким образом, можно сделать вывод, что производные 4-нитро-БФЗ и соответствующие N-оксиды способны блокировать ИН ВИЧ-1 со сравнимой эффективностью, величина которой зависит от характера заместителей в положении 5 или 7; наиболее эффективными ингибиторами оказались метилзамещенные 4-нитро-БФЗ и 4-нитро-БФКС.

Помимо БФКС, содержащих одну нитрогруппу, в качестве блокаторов ИН были испытаны также производные 4,6-динитро-БФКС (табл. 1, **21–24**). Оказалось, что введение второй нитрогруппы существенно снижает ингибирующую активность (ср. **21** и **4**). Однако присутствие метильного заместителя в положении 7 и в случае 4,6-динитро-БФКС значительно повысило эффективность ингибирования интеграции, причем перенос цепи подавлялся в 6–7 раз лучше, чем 3'-процессинг (табл. 1, **22**). Интересно, что соединение **23**, содержащее электроноакцепторный бромметильный заместитель, также эффективно ингибировало обе реакции, хотя и несколько уступало 7-метил-4,6-динитро-БФКС (**22**). В то же время соединение **24**, содержащее в положении 7 очень сильный акцептор электронов, проявляло невысокую ингибирующую активность (табл. 1).

Далее было изучено ингибирование интеграции 6-нитро-БФКС и 6-нитро-БФЗ (табл. 1, **25** и **26**). Оказалось, что оба эти соединения значительно более эффективно ингибируют интеграцию, чем 4-нитро-БФКС/БФЗ и 4,6-динитро-БФКС (табл. 1, **4**, **11**, **21**). Интересно, что действие 6-нитро-БФКС и 6-нитро-

БФЗ в реакции переноса цепи было одинаковым, а 3'-процессинг более эффективно ингибировался 6-нитро-БФЗ (**25**). Введение метоксигруппы в положение 4 значительно снижало эффективность ингибирования (табл. 1, **27**).

Способность БФКС и БФЗ, содержащих нитрогруппу в положении 4 и/или 6, ингибировать обе реакции, катализируемые ИН ВИЧ-1, с практически одинаковой эффективностью, дала основание предполагать, что механизм ингибирования интеграции этими соединениями отличается от механизма действия ралтегравира, который ингибирует главным образом перенос цепи [15]. Для проверки этого предположения изучена способность нитро-БФКС/БФЗ ингибировать мутантные формы ИН, обладающие повышенной устойчивостью к ралтегравиру.

Ингибирование мутантных форм ИН, обладающих повышенной устойчивостью к действию ралтегравира

Возникновение устойчивости к ингибиторам переноса цепи связано с появлением мутаций в активном центре ИН [25]. У больных с устойчивостью к ралтегравиру чаще всего обнаруживаются первичные мутации: Y143R/C, Q148K/R/H и N155H. Аминокислотные замены Q148R/H/K и N155H часто встречаются также у пациентов, принимавших ингибитор ИН элвитегравир, который находится на последней стадии клинических испытаний [26]. По этой причине в нашей работе использованы препараты ИН, содержащие замены Q148K и N155H. Учитывая, что замена Q148 резко снижает активность ИН, которая восстанавливается в результате вторичной мутации остатка G140 [27], мы получили препарат ИН, содержащей двойную мутацию G140S/Q148K. Была прове-

Таблица 3. Влияние нитро-БФКС и нитро-БФЗ на каталитическую активность ИН в реакциях 3'-процессинга и переноса цепи, на ДНК-связывающую активность ИН и связывание ДНК-субстрата в активном центре ИН

Соединение, №	Ингибирующая активность, IC ₅₀ , мкМ*					
	3'-процессинг		перенос цепи		связывание ИН с ДНК	связывание ДНК в активном центре ИН
	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺		
	1	2	3	4	5	6
Ралтегравир	0.50 ± 0.09	0.15 ± 0.02	0.010 ± 0.003	0.005 ± 0.002	> 500	> 500
6	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.2	10 ± 2	0.6 ± 0.2
9	50 ± 10	35 ± 10	80 ± 30	70 ± 20	500 ± 100	90 ± 20
18	20 ± 5	20 ± 5	15 ± 5	25 ± 5	50 ± 10	20 ± 5
23	6 ± 2	5 ± 2	2.0 ± 0.5	5 ± 2	25 ± 8	6 ± 2
25	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.2	5 ± 2	4 ± 1	45 ± 10	1.0 ± 0.5

*Усредненные значения, вычисленные по результатам не менее трех экспериментов.

рена способность наиболее активных соединений **6**, **22** и **25**, представляющих все три исследованные группы нитро-БФКС/БФЗ, ингибировать каталитическую активность мутантных белков и ИН дикого типа в реакции переноса цепи. Оказалось, что анализируемые ингибиторы подавляли активность всех препаратов ИН со сравнимой эффективностью (табл. 2). В то же время обе мутантные формы ИН ингибировались ралтегравиром хуже, чем ИН дикого типа, при этом снижение эффективности ингибирования было особенно заметно для значений IC₉₅ (табл. 2).

Изучение механизма ингибирующего действия производных нитро-БФКС/БФЗ

Способность производных нитро-БФКС/БФЗ ингибировать мутантные формы ИН так же эффективно, как и фермент дикого типа, подтвердила правильность предположения о том, что механизм ингибирования интеграции этими соединениями отличается от механизма действия ралтегравира. Соединения для выяснения механизма ингибирующего действия производных нитро-БФКС/БФЗ отбирали с учетом двух критериев: 1) выбирали соединения из всех трех групп производных, различающихся положением и количеством нитрогрупп; 2) выбирали соединения с разными заместителями, поскольку формирование заместителем дополнительных контактов с белком потенциально могло повлиять на механизм ингибирования. Соответственно из группы 4-нитро-БФКС/БФЗ отобрали соединения **6**, **9** и **18**; из группы 4,6-динитро-БФКС – соединение **23**, из группы 5-нитро-БФКС/БФЗ – соединение **25** (табл. 1).

Необходимо отметить, что все ингибиторы переноса цепи действуют по одному механизму: они

связываются в активном центре ИН, находящейся в комплексе с вирусной ДНК, и препятствуют ее взаимодействию с клеточной ДНК [5, 15, 28]. Соединения, одинаково ингибирующие обе стадии интеграции, могут иметь разные механизмы действия. Они могут взаимодействовать с С-концевым доменом, нарушая связывание ДНК, могут связываться с каталитическим доменом ИН, влияя или не влияя на правильную укладку вирусной ДНК, они могут взаимодействовать с другими участками ИН, будучи, например, аллостерическими ингибиторами [5, 29].

На первом этапе изучено влияние ингибиторов на ДНК-связывающую активность ИН. За связывание ДНК в первую очередь ответствен С-концевой домен ИН [30]. Следовательно, ингибитор, который подавляет связывание ДНК в тех же концентрациях, что и 3'-процессинг, действует на С-концевой домен. Действие ингибиторов на связывание ДНК изучали при 25°C, поскольку в таких условиях ИН полностью связывает ДНК-субстрат, образуя фермент-субстратный комплекс, но не осуществляет каталитический акт [31]. Оказалось, что практически все изученные соединения в гораздо меньшей степени влияли на связывание ДНК с ИН, чем на 3'-процессинг (табл. 3, столбцы 5 и 1). Этот факт позволил предположить, что ингибиторы взаимодействуют с каталитическим доменом ИН.

Ингибитор, который связывается в каталитическом домене ИН, может, не влияя на общее связывание ДНК с ИН, препятствовать «правильному» взаимодействию вирусной ДНК с активным центром фермента. Влияние ингибиторов на правильную укладку ДНК-субстрата в активном центре ИН изучали с использованием метода ковалентного присоединения

Таблица 4. Спектры потенциальной токсичности/побочных эффектов нитро-БФЗ и нитро-БФКС в сравнении с ралтегравиром

Соединение, №	Прогнозируемые токсические и побочные эффекты (Pa > 0.5)		
	Pa*	Pi*	Активность
6	0.536	0.068	Гипотензия
	0.503	0.085	Сосудистая токсичность
9	-	-	-
18	0.595	0.015	Канцерогенность (крысы, самцы, почки)
	0.551	0.014	Канцерогенность (крысы, самцы)
	0.519	0.020	Стимулятор слезной секреции
23	0.653	0.005	Мутагенная
	0.556	0.006	Мутагенная
25	0.816	0.014	Сосудистая токсичность
	0.679	0.007	Канцерогенность (крысы, самцы)
	0.661	0.008	Канцерогенность (крысы, самки)
	0.632	0.019	Продление QT-интервала
	0.571	0.013	Канцерогенность (крысы, самки, молочная железа)
	0.603	0.049	Гипотензия
	0.588	0.034	Аллергический дерматит
	0.583	0.047	Цианоз
	0.570	0.045	Ототоксичность
	0.568	0.074	Гемотоксичность
Ралтегравир	0.933	0.003	Гиперкинезия
	0.932	0.004	Атаксия
	0.923	0.004	Чувство тревоги
	0.861	0.013	Головокружение
	0.850	0.010	Тромбоцитопения
	0.830	0.017	Сенсорные нарушения
	0.796	0.023	Рвота
	0.780	0.016	Дискинезия
	0.787	0.025	Дерматит
	0.783	0.022	Головная боль
	0.781	0.024	Аллергическая реакция
	0.744	0.031	Боль
	0.702	0.040	Тошнота
	0.683	0.032	Нефротоксичность
	0.693	0.042	Нарушение сна
	0.603	0.065	Гемотоксичность
	0.589	0.073	Желудочно-кишечная токсичность
0.556	0.065	Гепатотоксичность	

*Pa – вероятность наличия активности; Pi – вероятность отсутствия активности.

к ИН альдегидсодержащего аналога ДНК-субстрата [32]. Альдегидную группу вводили в состав третьего с 5'-конца олигонуклеотида U5A модифицированного аналога тимидина (T^m) (рисунки, А), поскольку он локализован вблизи аминокислотных остатков каталитического домена ИН [33]. Целесообразность применения такого подхода описана ранее [34, 35].

Дуплекс U5B/U5A^m, содержащий радиоактивную метку в цепи U5A^m, ковалентно присоединяли к ИН в присутствии ингибиторов в возрастающих концентрациях и анализировали влияние ингибиторов на эффективность реакции (рисунки, Б). В случае ралтегравира мы не обнаружили ингибирования ковалентного присоединения (табл. 3, столбец 6), что хорошо согласуется с данными о том, что ингибиторы переноса цепи не влияют на взаимодействие ИН с вирусной ДНК [5, 15]. Значения IC_{50} для всех производных нитро-БФКС/БФЗ при подавлении ковалентного связывания ДНК в активном центре фермента были близки значениям IC_{50} , полученным для катализа (табл. 3, столбцы 6 и 1). Это указывает на то, что ингибиторы взаимодействуют с активным центром ИН и препятствуют правильной укладке в нем ДНК-субстрата. При этом связывание ингибиторов не вызывает изменений структуры фермента, способных полностью заблокировать его ДНК-связывающую активность.

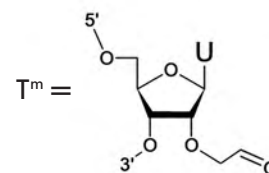
Исходя из предположения, что производные нитро-БФКС/БФЗ связываются в активном центре ИН, мы решили выяснить, взаимодействуют ли они с ионами металла-кофактора, связанными в активном центре ИН и необходимыми для каталитической активности [36]. Природным кофактором ИН является Mg^{2+} , однако *in vitro* ИН эффективно катализирует обе реакции и в присутствии ионов Mn^{2+} . Если ингибитор взаимодействует с ионом металла, то из-за различий в координирующей способности Mg^{2+} и Mn^{2+} влияние ингибитора на активность ИН в присутствии этих ионов металлов будет различаться. Именно этот эффект наблюдается в случае ралтегравира (табл. 3, столбцы 1–4). Результаты ингибирования 3'-процессинга и переноса цепи в присутствии ионов разных металлов показывают, что тип металла не влияет на эффективность действия производных нитро-БФКС/БФЗ. Очевидно, что взаимодействие этих ингибиторов с активным центром ИН осуществляется не за счет связывания с ионом металла.

Прогноз фармакодинамических и фармакокинетических характеристик производных нитро-БФКС/БФЗ

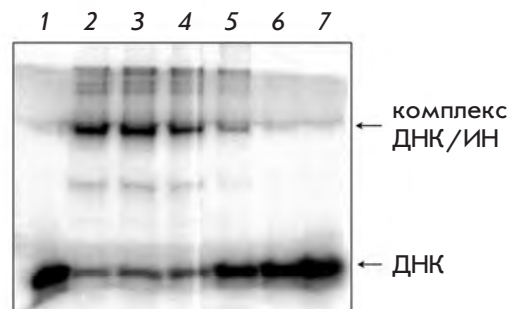
С использованием стандартной версии программы PASS (версия 12.06.22) предсказаны возможные побочные и токсические эффекты соединений **6**, **9**, **18**,

А

U5B 5'-GTGTGGAAAATCTCTAGCAGT-3'
U5A^m 3'-CACACCTTTAGAGATCGT^mCA-5'



Б



Влияние соединения **6** на эффективность ковалентного присоединения аналога ДНК-субстрата, содержащего альдегидную группу, к ИН. А – Структура аналога ДНК-субстрата U5B/U5A^m и модифицированного аналога тимидина T^m . Курсивом и подчеркиванием выделен динуклеотид GT, отщепляемый ИН при 3'-процессинге. Б – Анализ влияния ингибитора **6** на ковалентное присоединение дуплекса U5B/U5A^m к ИН методом гель-электрофореза по Лэммли. **6**, мкМ: 1 – контроль; 2 – 0; 3 – 0.1; 4 – 0.5; 5 – 1.0; 6 – 10; 7 – 100

23, **25** и ралтегравира (табл. 4). Необходимо отметить, что 15 из 18 предсказанных ($P > 0.5$) токсических и побочных эффектов ралтегравира соответствуют данным, полученным в экспериментальных и клинических исследованиях [37]. В предсказанных спектрах биологической активности соединения **9** отсутствуют какие-либо побочные/токсические эффекты. Соединения **6**, **18**, **23** и **25** могут вызывать некоторые нежелательные эффекты, однако необходимо учитывать, что прогнозируемые PASS побочные эффекты могут проявляться при их концентрациях, превышающих терапевтические дозы.

Расчет ADME-характеристик программой QikProp показал, что у соединений **6**, **9**, **18**, **23** и **25** значения всех 18 параметров соответствуют рекомендуемому диапазону [13]. Из этого диапазона (меньше чем -5) [14] у ралтегравира выходит расчетная величина IC_{50} для блокады HERG K^+ -каналов. Это соответствует

данным [38], в соответствии с которыми ралтегравир в высоких концентрациях действует как блокатор HERG K⁺-каналов, что может привести к увеличению QT-интервала и, следовательно, к развитию сердечной недостаточности.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в настоящей работе охарактеризован выявленный на основе компьютерного прогноза новый класс ингибиторов ИН – нитро-БФКС и нитро-БФЗ. Показано, что эти соединения ингибируют 3'-процессинг так же или более эффективно, чем перенос цепи. Изучено влияние структуры нитро-БФКС и нитро-БФЗ на их ингибирующую активность. Наиболее активными ингибиторами интеграции оказались 4-нитро-БФЗ/БФКС, содержащие метильную группу в положениях 5 и 7, а также 5-нитро-БФЗ. Описанные ингибиторы проявляли активность и в отношении мутантов ИН, устойчивых к действию ралтегравира. Изучение механизма ингибирования ИН

под действием нитро-БФЗ и нитро-БФКС показало, что эти соединения препятствуют связыванию ДНК-субстрата в активном центре фермента и не взаимодействуют с ионом металла-кофактора. Сравнение фармакодинамических и фармакокинетических характеристик изученных веществ и ралтегравира свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения этих соединений в качестве ингибиторов ИН ВИЧ-1. ●

Авторы выражают искреннюю признательность Marc Nicklaus с сотрудниками (NCI/NIH) за выполненные расчеты ADME-параметров изучаемых соединений с использованием компьютерной программы QikProp.

Работа поддержана ФЦП Минобрнауки РФ (государственный контракт № 16.512.11.2193) и РФФИ (гранты № 11-04-01004_a и № 11-04-01586_a).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cara A., Guarnaccia F., Reitz M.S. Jr., Gallo R.C., Lori F. // *Virology*. 1995. V. 208. P. 242–248.
2. Marcelin A.G., Ceccherini-Silberstein F., Perno C.F., Calvez V. // *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2009. V. 4. P. 531–537.
3. FDA approves raltegravir tablets // *AIDS Patient Care STDS*. 2007. V. 21. № 11. P. 889.
4. Cooper D.A., Steigbigel R.T., Gatell J.M., Rockstroh J.K., Katlama C., Yeni P., Lazzarin A., Clotet B., Kumar P.N., Eron J.E., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 359. № 4. P. 355–365.
5. Королев С.П., Агапкина Ю.Ю., Готтих М.Б. // *Acta Naturae*. 2011. Т. 3. № 3. С. 13–30.
6. Kobayashi M., Nakahara K., Seki T., Miki S., Kawachi S., Suyama A., Wakasa-Morimoto C., Kodama M., Endoh T., Oosugi E., et al. // *Antiviral Res.* 2008. V. 80. № 2. P. 213–222.
7. Keseru G.M., Makara G.M. // *Nat. Rev. Drug Discovery*. 2009. V. 8. P. 203–212.
8. Johnson B.C., Metifiot M., Pommier Y., Highes S.H. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. V. 56. P. 411–419.
9. Ma K., Wang P., Fu W., Wan X., Zhou L., Chu Y., Ye D. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011. V. 21. № 22. P. 6724–6727.
10. Ko G.M., Reddy A.S., Garg R., Kumar S., Hadaegh A.R. // *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 2012. V. 8. № 4. P. 255–270.
11. Filimonov D.A., Poroikov V.V. / Probabilistic approach in activity prediction. In: *Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening* // Eds Varnek A., Tropsha A. Cambridge (UK): RSC Publ., 2008. P. 182–216.
12. Филимонов Д.А., Пороиков В.В. // *Рос. хим. журн.* 2006. Т. 50. № 2. С. 66–75.
13. Акимов Д.В., Филимонов Д.А., Приказчикова Т.А., Готтих М.Б., Пороиков В.В. // *Биомед. химия*. 2005. Т. 51. № 3. С. 335–340.
14. Дружиловский Д.С., Филимонов Д.А., Лиао Ч., Пич М., Никлаус М., Пороиков В.В. // *Биомед. химия*. 2009. Т. 55. № 5. С. 544–557.
15. Summa V., Petrocchi A., Bonelli F., Crescenzi B., Donghi M., Ferrara M., Fiore F., Gardelli C., Gonzalez Paz O., Hazuda D.J., et al. // *J. Med. Chem.* 2008. V. 51. № 18. P. 5843–5855.
16. <http://www.schrodinger.com/products/14/17/>
17. Handzlik J., Bajda M., Zygmunt M., Maciąg D., Dybała M., Bednarski M., Filipek B., Malawska B., Kieć-Kononowicz K. // *Bioorg. Med. Chem.* 2012. V. 20. № 7. P. 2290–2303.
18. Shukla S., Kumar P., Das N., Moorthy N.S., Shrivastava S.K., Trivedi P., Srivastava R.S. // *Med. Chem.* 2012. V. 8. № 5. P. 834–845.
19. Ghose A.K., Herbertz T., Hudkins R.L., Dorsey B.D., Mallamo J.P. // *ACS Chem. Neurosci.* 2012. V. 3. № 1. P. 50–68.
20. Ghosh P.B., Whitehouse M.W. // *J. Med. Chem.* 1968. V. 11. P. 305–311.
21. Ghosh P.B. // *J. Chem. Soc. B*. 1968. P. 334–338.
22. Terrier F., Croisat D., Chatrousse A.-P., Pouet M.-J., Halle J.-C., Jacob G. // *J. Org. Chem.* 1992. V. 57. P. 3684–3689.
23. Зацепин Т.С., Качалова А.В., Романова Е.А., Стеценко Д.А., Гейт М.Дж., Орецкая Т.С. // *Биоорг. химия*. 2001. Т. 27. С. 45–51.
24. Leh H., Brodin P., Bischerour J., Deprez E., Tauc P., Brochon J.C., LeCam E., Coulaud D., Auclair C., Mouscadet J.-F. // *Biochemistry*. 2000. V. 39. P. 9285–9294.
25. Malet I., Delelis O., Valantin M.A., Montes B., Soulie C., Wirlden M., Tchertanov L., Peytavin G., Reynes J., Mouscadet J.-F., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. V. 52. № 4. P. 1351–1358.
26. Ceccherini-Silberstein F., Malet I., D'Arrigo R., Antinori A., Marcelin A.G., Perno C.F. // *AIDS Rev.* 2009. V. 11. № 1. P. 17–29.
27. Delelis O., Malet I., Na L., Tchertanov L., Calvez V., Marcelin A.G., Subra F., Deprez E., Mouscadet J.-F. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. 1193–1201.
28. Hare S., Vos A.M., Clayton R.F., Thuring J.W., Cummings M.D., Cherepanov P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 20057–20062.
29. Quashie P.K., Sloan R.D., Wainberg M.A. // *BMC Med.* 2012. V. 10. P. 34.
30. Puras Lutzke R.A., Vink C., Plasterk R.H. // *Nucl. Acids Res.*

1994. V. 22. № 20. P. 4125–4131.
31. Smolov M., Gottikh M., Tashlitskii V., Korolev S., Demidyuk I., Brochon J.-C., Mouscadet J.-F., Deprez E. // FEBS J. 2006. V. 273. P. 1137–1151.
32. Michel F., Crucifix C., Granger F., Eiler S., Mouscadet J.-F., Korolev S., Agapkina J., Ziganshin R., Gottikh M., Nazabal A., et al. // EMBO J. 2009. V. 28. P. 980–991.
33. Krishnan L., Li X., Naraharisetty H.L., Hare S., Cherepanov P., Engelman A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 36. P. 15910–15915.
34. Johnson A.A., Marchand C., Patil S.S., Costi R., Di Santo R., Burke T.R. Jr., Pommier Y. // Mol. Pharmacol. 2007. V. 71. № 3. P. 893–901.
35. Королев С.П., Ташлицкий В.Н., Смолов М.А., Громыко А.В., Жузе А.Л., Агапкина Ю.Ю., Готтих М.Б. // Молекуляр. биология. 2010. Т. 44. № 4. С. 718–727.
36. Neamati N., Lin Z., Karki R.G., Orr A., Cowansage K., Strumberg D., Pais G.C., Voigt J.H., Nicklaus M.C., Winslow H.E., et al. // J. Med. Chem. 2002. V. 45. № 26. P. 5661–5670.
37. http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/i/isentress/isentress_pi.pdf
38. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000860/WC500037408.pdf