

УДК 578.242.42/.44+578.282;578.11

## Скрининг потенциальных ингибиторов/блокаторов репликации ВИЧ-1 с помощью безопасной лентивирусной системы *in vitro*

М. М. Прокофьева<sup>1\*</sup>, П. В. Спирин<sup>1</sup>, Д. В. Январев<sup>1</sup>, А. В. Иванов<sup>1</sup>, М. С. Новиков<sup>2</sup>,  
О. А. Степанов<sup>1</sup>, М. Б. Готтих<sup>3</sup>, С. Н. Кочетков<sup>1</sup>, В. Fehse<sup>4</sup>, С. Stocking<sup>5</sup>, В. С. Прасолов<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32, Россия

<sup>2</sup>Волгоградский государственный медицинский университет, 400131, Волгоград, ул. Павших Борцов, 1, Россия

<sup>3</sup>Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119899, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40, Россия

<sup>4</sup>Research Department Cell and Gene Therapy, Department for Stem Cell Transplantation University Medical Center Hamburg-Eppendorf, D-20246, Hamburg, Martinistr., 52, Germany

<sup>5</sup>Heinrich-Pette-Institute for Experimental Virology and Immunology, D-20251, Hamburg, Martinistr., 52, Germany

\*E-mail: m.prokofjeva@gmail.com, prassolov45@mail.ru

Поступила в редакцию 08.07.2011 г.

**РЕФЕРАТ** Разработка безопасных клеточных систем, позволяющих тестировать соединения, обладающие анти-ВИЧ-активностью, весьма важна для создания новых противовирусных препаратов. Нами детально охарактеризована разработанная ранее на основе лентивирусных векторов система (Prokofjeva et al., *Antiviral Therapy*, в печати) для быстрого и полностью безопасного скрининга потенциальных ингибиторов репликации ВИЧ-1. Система позволяет проводить испытания ингибиторной активности соединений, действие которых направлено как на обратную транскриптазу и интегразу ВИЧ-1 дикого типа, так и на мутантные ферменты, соответствующие лекарственно-устойчивым формам вируса. Получены результаты тестирования ряда известных препаратов, которые хорошо согласуются с опубликованными данными, а также вновь синтезированных соединений. Применение этой системы существенно расширяет возможности доклинических испытаний анти-ВИЧ-препаратов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ВИЧ, лентивирусные векторы, псевдо-ВИЧ-1-частицы, нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, ингибиторы интегразы.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ОТ – обратная транскриптаза; ВВС – вирус везикулярного стоматита; eGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок; АЗТ – 3'-азидо-3'-дезокситимидин; ИД<sub>50</sub> – концентрация ингибитора, при которой на 50% снижается уровень заражения.

### ВВЕДЕНИЕ

Вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), относящийся к роду лентивирусов семейства ретровирусов, вызывает одно из широко распространенных и опасных для жизни человека заболеваний – синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД). Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), число ВИЧ-1-инфицированных к концу 2008 г. превысило 33 миллиона человек [1]. В Российской Федерации по официальным данным на 2010 г. количество инфицированных ВИЧ-1 достигло 520000

человек [2]. Следует отметить, что реальное число инфицированных может быть в 2–3 раза больше. Из прогнозов ВОЗ и неправительственных организаций следует, что даже при выполнении всех инициатив по контролю за распространением СПИДа и применению анти-ВИЧ-терапии число ВИЧ-1-инфицированных в ближайшие несколько лет может превысить 48 миллионов.

Несмотря на огромные усилия, до сих пор не создано ни одной действенной профилактической или терапевтической анти-ВИЧ-1-вакцины. Единственным

терапевтическим подходом при ВИЧ-инфекции остается использование низкомолекулярных ингибиторов разных стадий репликативного цикла вируса. К настоящему моменту создано около 30 соединений различной структуры, утвержденных в качестве лекарственных средств. Большинство из них – ингибиторы трех ферментов ВИЧ-1: обратной транскриптазы (ОТ), интегразы и протеазы, а в последние годы добавились и так называемые ингибиторы слияния – блокаторы проникновения вируса в клетку [3]. Одновременное применение нескольких соединений разного типа в рамках высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ) позволяет достигать относительно длительного и заметного снижения титра вируса в крови и, как следствие, существенно продлевать жизнь больного [4, 5]. Тем не менее использование всех этих соединений имеет несколько ограничений. Во-первых, пожизненное носительство вирусной инфекции делает необходимым многолетний прием лекарственных средств, при котором возникают новые мутантные формы вируса, устойчивые к используемым препаратам и способные распространяться в популяции. Это уже привело к тому, что в США и Европе примерно у 10% больных, никогда не принимавших антиретровирусные средства, выявляют формы вируса, невосприимчивые к одному или даже ко всем перечисленным выше классам анти-ВИЧ-1-препаратов [6]. Во-вторых, необходимость длительной терапии часто ставит на первый план возможное побочное действие противовирусных средств [7, 8]. Таким образом, поиск новых соединений, обладающих анти-ВИЧ-1-активностью, представляет крайне важную задачу современной вирусологии и медицинской химии. При этом необходимо создавать новые, относительно безопасные для больного соединения, активные в отношении как вируса дикого типа, так и его лекарственно-устойчивых форм.

Важный этап разработки новых антиретровирусных средств – проверка их эффективности. Большинство лабораторий, занятых поиском новых анти-ВИЧ-соединений, не имеют возможности работать непосредственно с инфекционным репликативно-компетентным вирусом. Такого рода исследования, включающие контакт персонала с природным вирусом, могут проводиться только в сертифицированных лабораториях в условиях, гарантирующих безопасность работы персонала и имеющих разрешение на работу с инфекционными материалами третьего класса опасности. В связи с этим разработка и использование безопасных клеточных систем для тестирования противовирусной активности весьма важны для создания новых лекарственных средств. Особый интерес для быстрого и полностью безопасного скрининга потенциальных ингибиторов

репликации ВИЧ-1 представляют лентивирусные векторы, функциональная эффективность которых проявляется в результате активности всех ферментов ВИЧ-1.

Векторы на основе простых и сложных ретровирусов уже начиная с первой половины 80-х годов прошлого столетия интенсивно использовались как мощные универсальные инструменты, в том числе для создания эффективных систем переноса, экспрессии различных генов и интерферирующих РНК в клетках человека и животных как *in vitro*, так и *in vivo* [9–13].

Лентивирусные векторы использовались в нашей и других лабораториях для создания безопасных систем скрининга ингибиторов репликации ВИЧ-1 дикого типа [14–18]. Такие системы представляют собой рекомбинантный лентивирус, несущий фрагмент генома ВИЧ-1 без областей, кодирующих белки вируса, и содержащий ген репортерного (маркерного) белка (например, зеленого флуоресцентного белка). Кроме того, в состав псевдовирусных частиц входят ферменты репликации ВИЧ-1 (обратная транскриптаза, интегразы и протеазы), что обеспечивает возможность синтеза ДНК-копии такого генома и его встраивание в геном клетки-хозяина по тому же механизму, что и у инфекционного ВИЧ-1. Существенно, что такие псевдо-ВИЧ-1-частицы могут нести, по желанию исследователей, на своей поверхности белки оболочки ВИЧ-1 или других оболочечных вирусов, например G-белок вируса везикулярного стоматита. Это дает возможность использовать определенные линии эукариотических клеток (клетки-мишени) и обеспечивать достаточно высокую эффективность их заражения. Сборка ВИЧ-1-подобных частиц в этой системе происходит согласно модифицированной процедуре, разработанной для конструирования вирусоподобных частиц на основе вируса лейкоза мышей, родственного ВИЧ-1 [19] (рис. 1). Эта процедура заключается во внесении в культивируемые клетки почки эмбриона человека (так называемые упаковывающие клетки) по отдельности плазмид, содержащих а) ген *gag-pol* ВИЧ-1, кодирующий структурные белки для формирования капсида вирусной частицы и ферменты ВИЧ-1; б) ген *env*, кодирующий гликопротеины оболочки ВИЧ-1, или ген белка оболочки иного вируса и в) провирусную ДНК, кодирующую рекомбинантный РНК-геном, в состав которого входит маркерный ген флуоресцентного белка. После внесения всех перечисленных компонентов в упаковывающие клетки в них происходит синтез вирусных белков и рекомбинантной РНК, обеспечивающих формирование ВИЧ-1-подобных частиц, выходящих в культуральную среду. Добавление таких частиц к клеткам-мишеням приводит к тому, что в этих

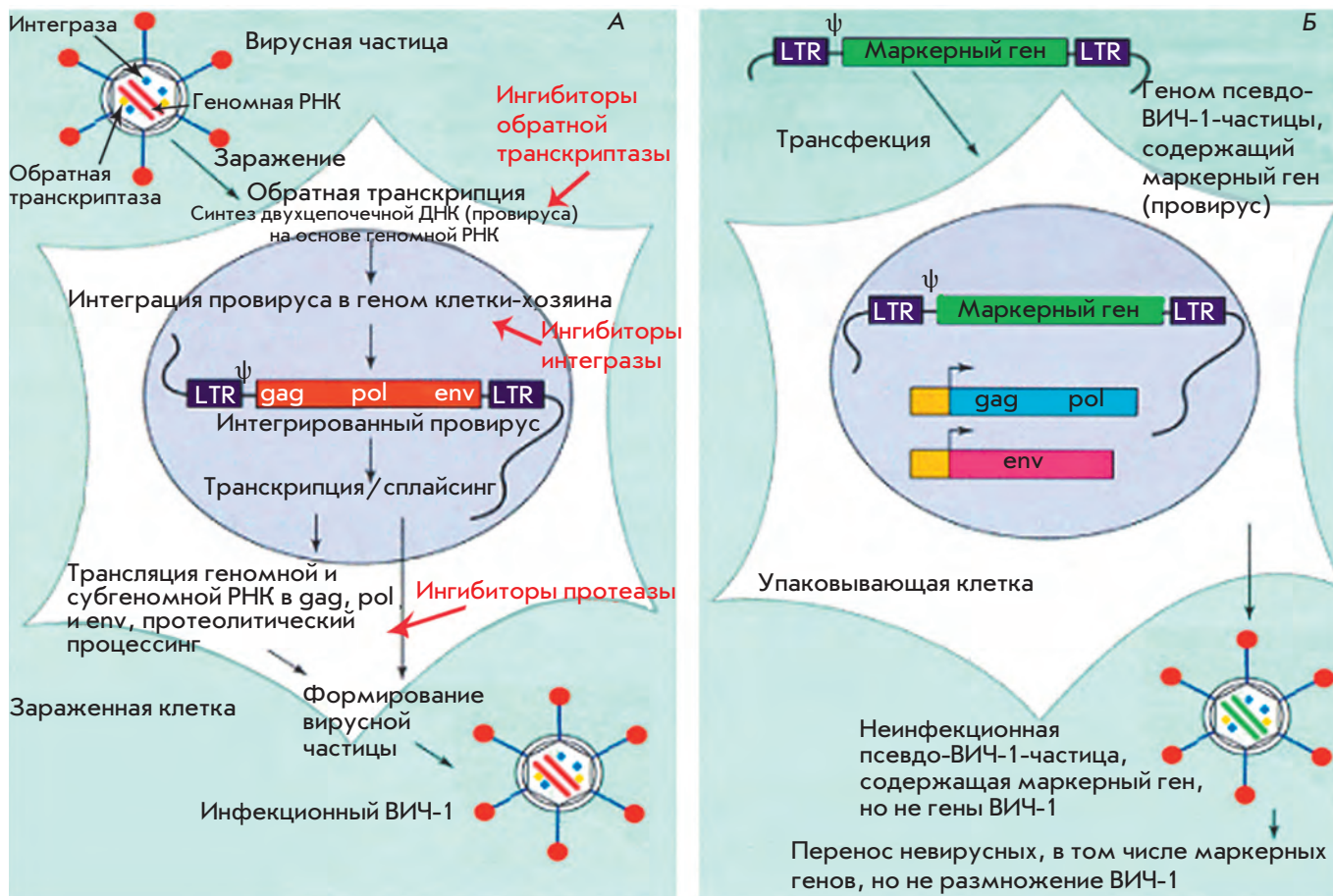


Рис. 1. Жизненный цикл инфекционного ВИЧ-1 (А) и получение рекомбинантных псевдо-ВИЧ-1-частиц в упаковывающих клетках (Б).

клетках на рекомбинантном РНК-геноме синтезируется ДНК провируса, содержащего маркерный ген, встраивание которого в геном клетки-мишени придает ей способность флуоресцировать. Следует особо отметить, что использование плазмидных ДНК, экспрессирующих по отдельности вирус-специфические белки, позволяет конструировать любые варианты псевдо-ВИЧ-1-частиц с одной или несколькими мутациями в любом из ферментов репликации вируса, которые соответствуют лекарственно-устойчивым штаммам ВИЧ-1.

К сожалению, в опубликованных к настоящему времени работах содержится лишь ограниченное число примеров успешного использования подобных систем для изучения антиретровирусной активности веществ различной природы, при этом универсальность описанных систем неочевидна. В связи с этим, основная цель нашей работы состояла в доказательстве адекватности предложенной клеточной системы для скрининга потенциальных анти-ВИЧ-1-препаратов. Мы проверили активность ряда

ингибиторов обратной транскриптазы и интегразы ВИЧ-1 как применяющихся в медицинской практике, так и находящихся на разных стадиях лабораторных исследований.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### Культивирование клеток

В работе использовали клетки линий HEK293 (клетки эмбриональной почки человека), SC-1 (эмбриональные фибробласты мыши), Jurkat (Т-лимфобластный лейкоз человека), CEM-SS (Т-лимфобластный лейкоз человека) и Kasumi-1 (острый миелоидный лейкоз человека). Клетки линий HEK293 и SC-1 культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Fetal Calf Serum, FCS), 4 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки линий Jurkat, CEM-SS и Kasumi-1 культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 20% FCS, 4 мМ L-глутамин, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл



стрептомицина. Клетки растили при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>.

### Получение псевдо-ВИЧ-1-частиц

В качестве упаковывающих клеток, в которых происходит сборка рекомбинантных лентивирусных частиц (псевдо-ВИЧ-1-частицы), использовали клетки НЕК293, которые за 12–14 ч до начала трансфекции высевали на чашки Петри диаметром 100 мм в количестве 3.0–3.5 × 10<sup>6</sup> клеток на чашку.

ДНК лентивирусного вектора, содержащего маркерный ген зеленого флуоресцентного белка (GFP), вместе с плазмидами, направляющими синтез белков, необходимых для формирования псевдо-ВИЧ-1-частиц, вводили в клетки НЕК293 методом Са-фосфатной трансфекции. Инфекционные псевдо-ВИЧ-1-частицы начинали собирать через 24 ч после трансфекции с интервалом 12 ч [13].

Вирус титровали на клетках НЕК29, высеянных на 24-луночные планшеты за сутки до заражения. Уровень флуоресценции клеток измеряли на проточном цитофлуориметре Epics 4XL Beckman Coulter (США) через 48 ч после заражения. Титр вируса рассчитывали по формуле  $T = NP/V$ , где  $N$  – количество высеянных клеток;  $P$  – доля инфицированных клеток в популяции;  $V$  – количество добавленного супернатанта, содержащего псевдо-ВИЧ-1-частицы;  $T$  – титр вируса. В работе использовали сборы с титрами вируса 5 × 10<sup>5</sup>–5 × 10<sup>6</sup>.

### Исследование антивирусной активности соединений

Для оценки анти-ВИЧ-1-активности к клеткам прибавляли раствор анализируемых соединений в воде или диметилсульфоксиде (ДМСО, конечная концентрация в среде не превышала 0.1%), через 2–8 ч (в зависимости от ингибитора) заражали псевдо-ВИЧ-1-частицами. Относительный уровень заражения определяли методом проточной цитофлуориметрии на приборе Epics 4XL Beckman Coulter (США) через 48 ч после заражения.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Конструирование псевдо-ВИЧ-1-частиц и инфицирование ими различных линий эукариотических клеток

Важнейшими параметрами лентивирусной системы являются эффективность трансдукции клеток-мишеней псевдо-ВИЧ-1-частицами и, как следствие, уровень флуоресценции полученных трансгенных клеток. Эти параметры зависят от строения псевдовирусных частиц (вида белков оболочки) и линии инфицируемых клеток-мишеней. В качестве клеток-

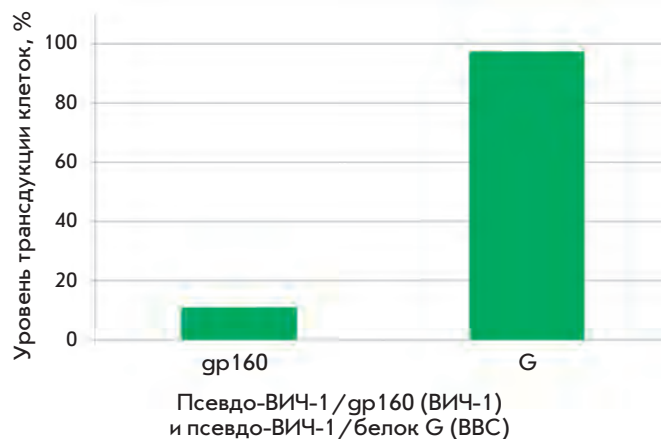


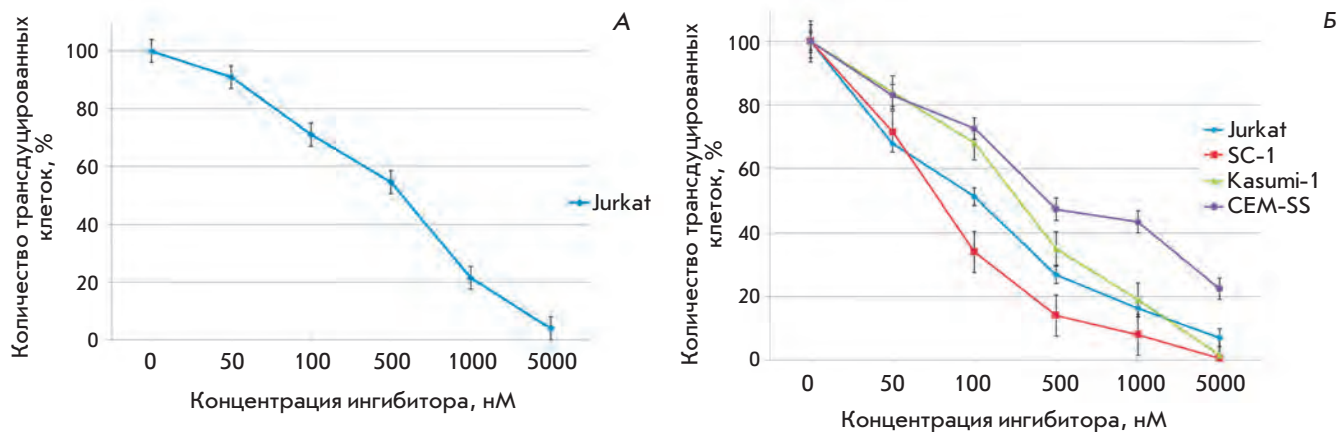
Рис. 2. Уровень трансдукции клеток линии Jurkat псевдо-ВИЧ-1-частицами, содержащими в качестве белка оболочки белок gp160 ВИЧ-1 или белок G вируса везикулярного стоматита (ВВС).

мишеней мы использовали перевиваемые лимфобластные клетки крови человека Jurkat и СЕМ-SS (Т-лимфобластный лейкоз, содержат специфические рецепторы ВИЧ-1), Kasumi-1 (острый миелоидный лейкоз), а также фибробласты эмбриона мыши SC-1.

Нами получены и изучены два типа псевдо-ВИЧ-1-частиц, отличающихся друг от друга белками оболочки. Частицы первого типа содержат белок оболочки gp160 (SUgp120 + TMgp41) ВИЧ-1; второго – белок оболочки G вируса везикулярного стоматита (ВВС). Использование частиц первого типа приводило к сравнительно невысокой эффективности трансдукции и более слабому сигналу флуоресценции (данные не приведены) от инфицированных клеток (рис. 2). В случае псевдо-ВИЧ-1-частиц, несущих белок G ВВС, доля инфицированных клеток и уровень экспрессии маркерного зеленого флуоресцентного белка (eGFP) были существенно выше (рис. 2). Кроме того, с помощью частиц, псевдотипированных белком G ВВС, при необходимости можно переносить маркерные гены в клетки широкой видовой и тканевой специфичности. Такой прием может позволить проводить поиск ингибиторов ретровирусов, поражающих и иные, чем кровь, ткани. Поэтому в большинстве опытов по изучению свойств ингибиторов обратной транскриптазы и интегразы ВИЧ-1 использовали именно псевдо-ВИЧ-1-частицы с белком G ВВС.

### Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1

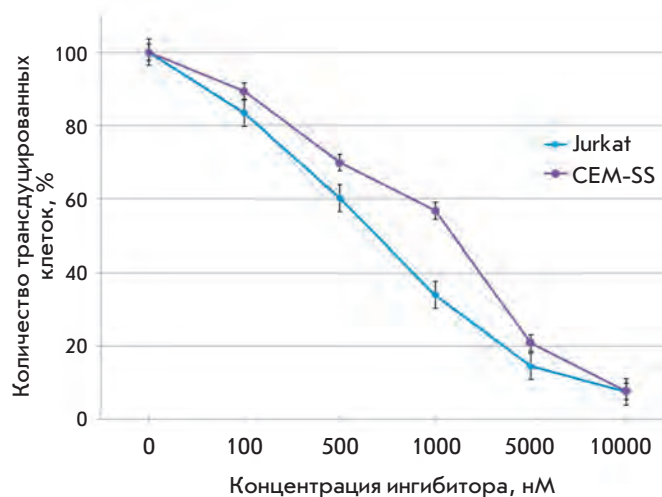
Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды широко используются в терапии различных вирусных заболеваний, в том числе ВИЧ-1-инфекции [3]. Механизм их действия включает превращение этих



**Рис. 3.** Действие АЗТ на эффективность трансдукции клеток разных линий псевдо-ВИЧ-1-частицами, содержащими белок оболочки gp160 (А) или белок оболочки G ВВС (Б). Показан уровень трансдукции относительно положительного контроля.

соединений в клетке в соответствующие нуклеозидтрифосфаты, которые служат терминирующими субстратами для вирусных ДНК- и РНК-полимераз. Встраивание нуклеотидов в растущую цепь вирусной ДНК/РНК блокирует репликацию вируса и обеспечивает подавление развития инфекции. Первое и наиболее известное анти-ВИЧ-1-средство данного класса – 3'-азидо-3'-дезокситимидин (АЗТ), в наномолярных концентрациях способный ингибировать репликацию вируса. Мы изучили противовирусную активность АЗТ в отношении псевдо-ВИЧ-1-частиц, несущих белок оболочки gp160 ВИЧ-1 или G ВВС, на своей поверхности. На рис. 3 показано, как АЗТ влияет на эффективность трансдукции клеток ВИЧ-1-подобными частицами, содержащими обратную транскриптазу, интегразу дикого типа и белок оболочки gp160 ВИЧ-1 (А) или белок G вируса везикулярного стоматита (Б). Видно, что АЗТ подавляет инфицирование эукариотических клеток псевдовидными частицами обоих типов, хотя и в более высоких концентрациях, чем инфекционным ВИЧ-1 (таблица) [20–22]. В культуре клеток Jurkat активность препарата была выше в отношении частиц, псевдотипированных белком G ВВС. Противовирусная активность нуклеозида зависела не только от типа частиц, но и от линии клеток-мишеней. Так, максимальный эффект отмечен на фибробластах мыши SC-1, а минимальный – при использовании клеток CEM-SS. Причинами подобных различий могут быть разное внутриклеточное содержание нуклеозид- и нуклеотидкиназ [30] – ферментов, необходимых для превращения нуклеозида в соответствующий трифосфат, а также от различий в уровнях экспрессии специфических транспортеров, отвечающих за транспорт препарата в клетку или его выведение [31].

Другие известные и широко распространенные антиретровирусные средства – 2',3'-дидезокси-3'-тиоцитидин (ЗТС) и 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидротимидин (d4Т), которые, как и АЗТ, представляют собой нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1 [3]. ЗТС был синтезирован в 1989 г. и одобрен для клинического применения в 1995. В настоящее время он применяется в комбинации с другими препаратами. Показана эффективность совместного применения ЗТС и АЗТ. Мы оценили противовирусную активность ЗТС на клетках линий Jurkat и CEM-SS (рис. 4). Активность препарата в нашей системе была несколько ниже, чем из-



**Рис. 4.** Действие ЗТС на эффективность трансдукции клеток линий Jurkat и CEM-SS псевдо-ВИЧ-1-частицами, содержащими белок оболочки G ВВС. Показан уровень трансдукции относительно положительного контроля.

Противовирусная активность исследованных соединений в отношении псевдо-ВИЧ-1-частиц, псевдотипированных белком G вируса везикулярного стоматита

Соединение	Клеточная линия	ИД <sub>50</sub> , мкМ	
		Эксперимент	Лит. данные [20–29]
АЗТ	Jurkat	0.1 ± 0.01	0.004–0.1
	SC-1	0.08 ± 0.005	
	Kasumi-1	0.3 ± 0.02	
	CEM-SS	0.46 ± 0.05	
ЗТС	Jurkat	0.7 ± 0.05	0.02–0.35
	CEM-SS	0.85 ± 0.05	
d4T	Jurkat	7 ± 0.5	0.43–1.67
	SC-1	10 ± 0.5	
ddC	Jurkat	7 ± 0.5	0.067–0.316
	SC-1	5 ± 0.5	
ddI	Jurkat	>20	1.79–12
	SC-1	>20	
Невирапин	Jurkat	0.1 ± 0.005	0.0072–0.22
	SC-1	0.15 ± 0.005	
	Kasumi-1	0.08 ± 0.005	
	CEM-SS	0.2 ± 0.01	
Ненуклеозидный ингибитор ОТ 1	Jurkat	0.95 ± 0.05	0.13
Ненуклеозидный ингибитор ОТ 2	Jurkat	0.08 ± 0.001	0.016
Ненуклеозидный ингибитор ОТ 3	Jurkat	0.085 ± 0.001	0.018
Ралтегравир	Jurkat	0.009 ± 0.0005	0.0022–0.0037
	SC-1	0.006 ± 0.0005	
	CEM-SS	0.009 ± 0.0005	
L-731,988	Jurkat	12 ± 0.1	1
	SC-1	8 ± 0.1	

вестно из опубликованных данных (таблица) [20, 24]. Активность других аналогов нуклеозидов, включая d4T, в нашей системе также была ниже, чем показанная на инфекционном ВИЧ-1 (таблица) [20, 21, 24].

### Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1

Наиболее широко используемым ненуклеозидным блокатором репликации ВИЧ-1 – ингибитором обратной транскриптазы, является невирапин [3]. Утвержденное в качестве лекарственного средства в 1996 г., в концентрации  $10^{-8}$ – $10^{-7}$  М это соединение способно подавлять развитие ВИЧ-1-инфекции в клетках, зараженных природным вирусом. Мы исследовали способность невирапина предотвращать трансдукцию клеток-мишеней описанными выше псевдо-ВИЧ-1-частицами. Как и АЗТ, невирапин проявлял более высокую антивирусную активность в отношении псевдовирусных частиц, несущих на своей поверхности белок G ВВС (рис. 5). Так же как и АЗТ, невирапин был наиболее эффективен в культуре фибробластов SC-1, а наименее – на линии CEM-SS. Особо

следует подчеркнуть, что активность невирапина в нашей системе была сопоставима с его активностью в отношении инфекционного ВИЧ-1 [21, 25].

Кроме коммерческого препарата невирапина, мы протестировали три новых ненуклеозидных ингибитора, обозначенных номерами 1, 2 и 3, синтезированных как описано в работе [27]. Эти соединения представляют собой N<sup>1</sup>-замещенные урацилы, несущие бензофеноноксиэтильный (2 и 3) или бензилфеноксиэтильный фрагменты (1). Ранее мы показали, что эти соединения обладают высокой анти-ВИЧ-1-активностью в культуре клеток, инфицированных вирусом дикого типа [27]. Было продемонстрировано, что все три соединения способны предотвращать трансдукцию клеток SC-1 псевдо-ВИЧ-1-частицами с белком G ВВС, причем активность бензофенонсодержащих соединений (2 и 3) существенно превышала активность бензилфеноксиэтилурацильного производного урацила (1) (рис. 6) и была сравнима с активностью невирапина. Полученные данные хорошо коррелируют с результатами изучения этих веществ в инфекционной клеточной системе (таблица).

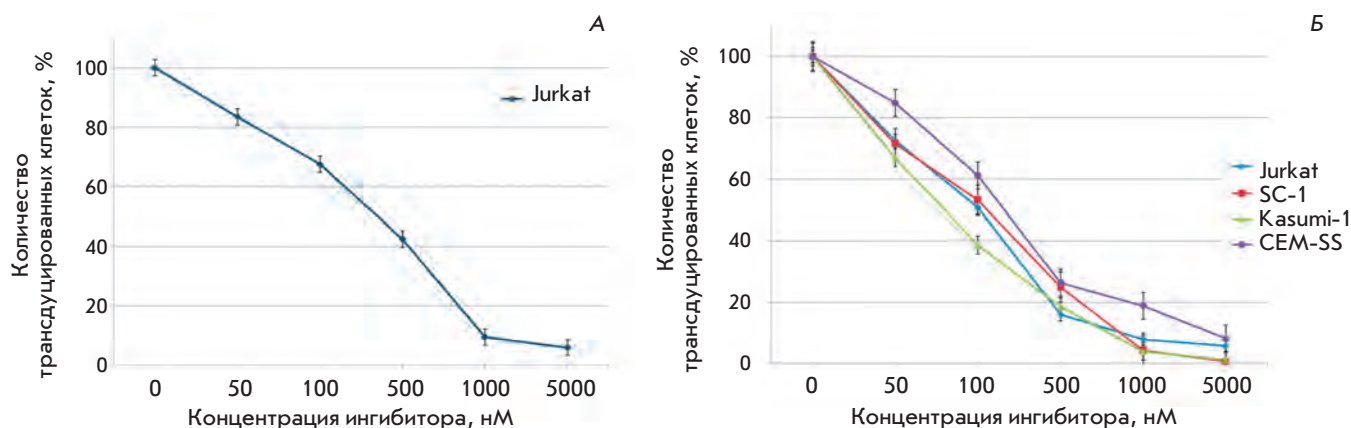


Рис. 5. Действие невирапина на эффективность трансдукции клеток разных линий псевдо-ВИЧ-1-частицами, содержащими белок оболочки gp160 (А) или белок оболочки G BVC (Б). Показан уровень трансдукции относительно положительного контроля.

### Ингибиторы интегразы ВИЧ-1

С целью оценки возможностей разработанной системы для скрининга ингибиторов интегразы использовали коммерческий препарат ралтегравир, разрешенный к применению в клинической практике с октября 2007 г., и известный ингибитор фермента L-731,988 [28]. Ралтегравир и L-731,988 блокируют вторую стадию интеграции – перенос цепи, препятствуя связыванию интегразы с клеточной ДНК. На рис. 7 приведена зависимость эффективности трансдукции клеток псевдо-ВИЧ-1-частицами с интегразой дикого типа от концентрации ингибиторов. Видно, что активность ралтегравира примерно на три порядка выше, чем у L-731,988, что согласуется с данными, полученными в инфекционной системе [28, 32]. Снижение числа флуоресцирующих клеток в присутствии ингибиторов интегразы свидетельствует о том, что в предложенной нами псевдовиральной системе происходит полноценная интеграция синтезированной ДНК в геном клетки-мишени, а псевдо-ВИЧ-1-частицы действительно могут служить удобным инструментом для изучения противовирусной активности ингибиторов интегразы вируса.

### Псевдо-ВИЧ-1-частицы, устойчивые к действию АЗТ

Поиск потенциальных ингибиторов репликации лекарственно-устойчивых штаммов ВИЧ-1 представляет собой важнейшую задачу. Однако такие работы часто ограничены не только необходимостью использования инфекционного вируса, опасного для персонала лаборатории, но и сложностью получения штаммов, нечувствительных к препаратам заданной группы. Предложенная нами система позволяет легко конструировать варианты псевдо-ВИЧ-1-частиц, несущих ферменты репликации с мутациями, определяющими устойчивость к лекарственным средствам.

Это подтверждено получением трех типов псевдо-ВИЧ-1-частиц с точечными заменами D67N, K70R, T215F и K219Q в обратной транскриптазе, наиболее характерными для штаммов ВИЧ-1, резистентных к АЗТ [33, 34]. Сравнение противовирусной активности АЗТ в отношении этих вариантов псевдовиральных частиц показало, что препарат гораздо слабее влиял на эффективность трансдукции мутантными частицами (рис. 8), причем падение ингибирующего эффекта коррелировало с увеличением числа мутаций (этот эффект наиболее ярко выражен в клетках SC-1). В то же время невирапин, ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы ВИЧ-1, сохранял свою активность в отношении всех АЗТ-устойчивых типов

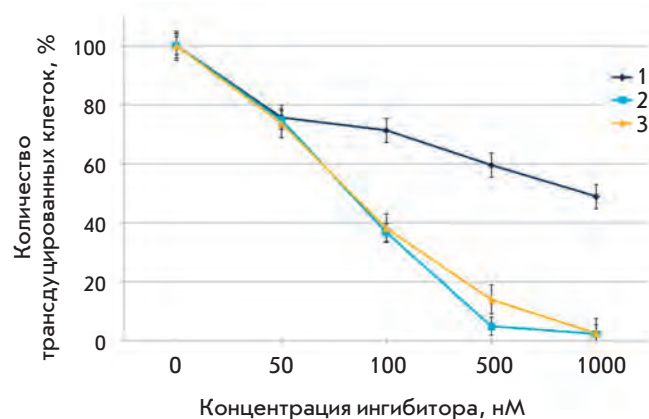
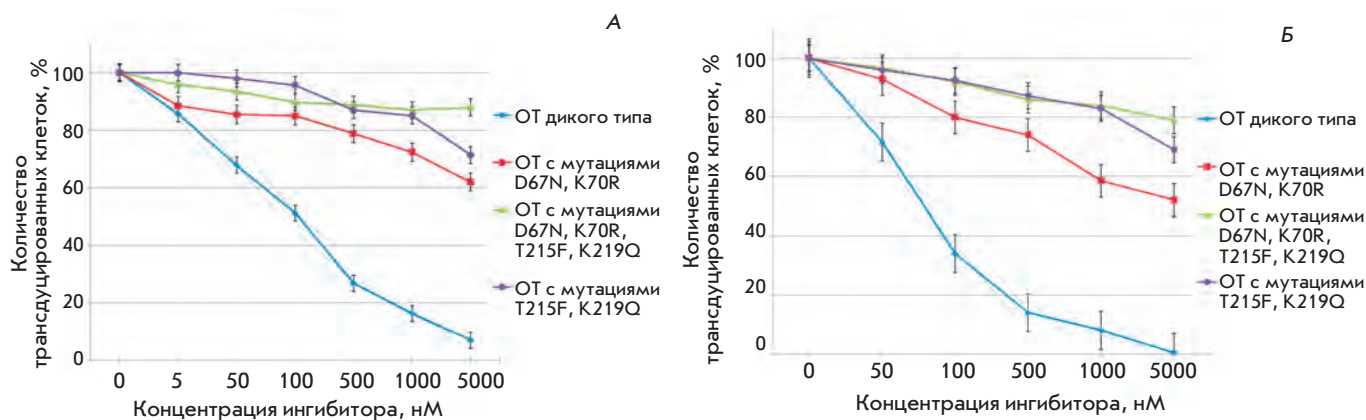
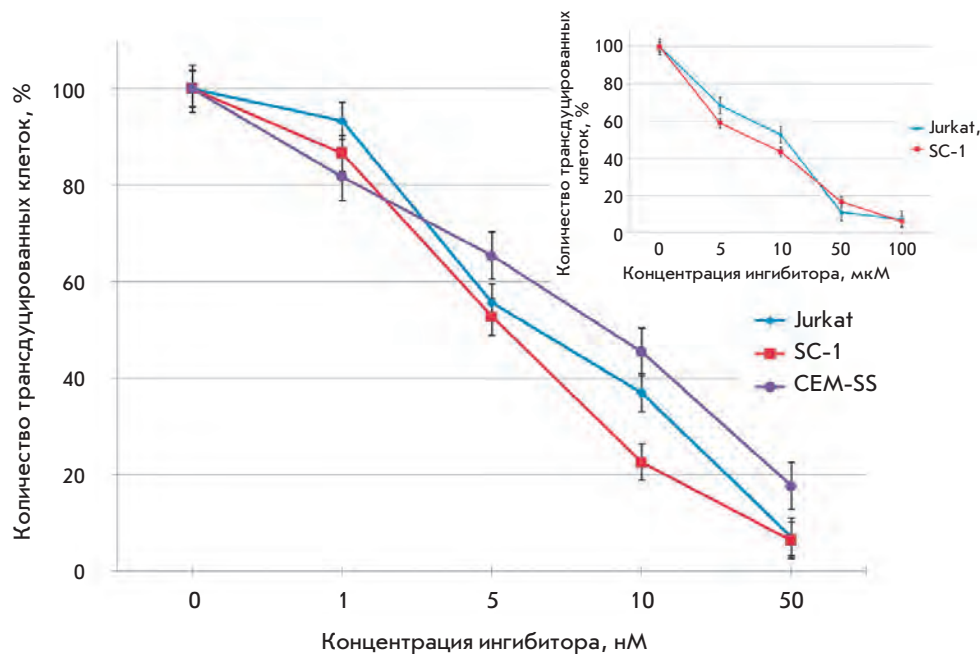


Рис. 6. Действие ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ-1 1, 2 и 3 на эффективность трансдукции клеток линии Jurkat псевдо-ВИЧ-1-частицами, содержащими белок оболочки G BVC. Показан уровень трансдукции относительно положительного контроля.



**Рис. 7.** Действие ингибиторов интегразы ВИЧ-1 ралтегравира (основной рисунок) и L-731,988 (вставка) на эффективность трансдукции клеток разных линий псевдо-ВИЧ-1-частицами, содержащими белок оболочки G VBC. Показан уровень трансдукции относительно положительного контроля.



**Рис. 8.** Действие АЗТ на эффективность трансдукции клеток псевдо-ВИЧ-1-частицами, содержащими белок оболочки G VBC и обратную транскриптазу дикого типа или ее мутантные формы, на клетках линий Jurkat (А) и SC-1 (Б). Показан уровень трансдукции относительно положительного контроля.

псевдовиральных частиц (рис. 9). Это объясняется тем, что сайт связывания АЗТ удален от активного центра фермента, с которым взаимодействует трифосфат АЗТ и в котором находятся все обозначенные мутации. Таким образом, псевдо-ВИЧ-1-частицы действительно позволяют изучать способность веществ ингибировать лекарственно-устойчивые формы вируса.

**Аналоги неорганического пирофосфата**

Отдельное направление подходов к терапии лекарственно-устойчивых форм ВИЧ-1 представляет поиск соединений, совместное использование которых с уже применяемыми антиретровирусными средствами приводит к восстановлению чувстви-

тельности вируса к антиретровирусным средствам. Согласно современным представлениям, устойчивость ВИЧ-1 к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы может формироваться с использованием двух альтернативных механизмов, включающих возникновение в обратной транскриптазе мутаций:

- а) препятствующих взаимодействию фермента с соответствующими нуклеозидтрифосфатами (описано для ЗТС) или
- б) способствующих выщеплению уже включенного терминирующего нуклеотида из ДНК в процессе реакции пирофосфоролиза, после которой синтез растущей цепи ДНК может быть продолжен (этот механизм считается основным для АЗТ) (рис. 10).



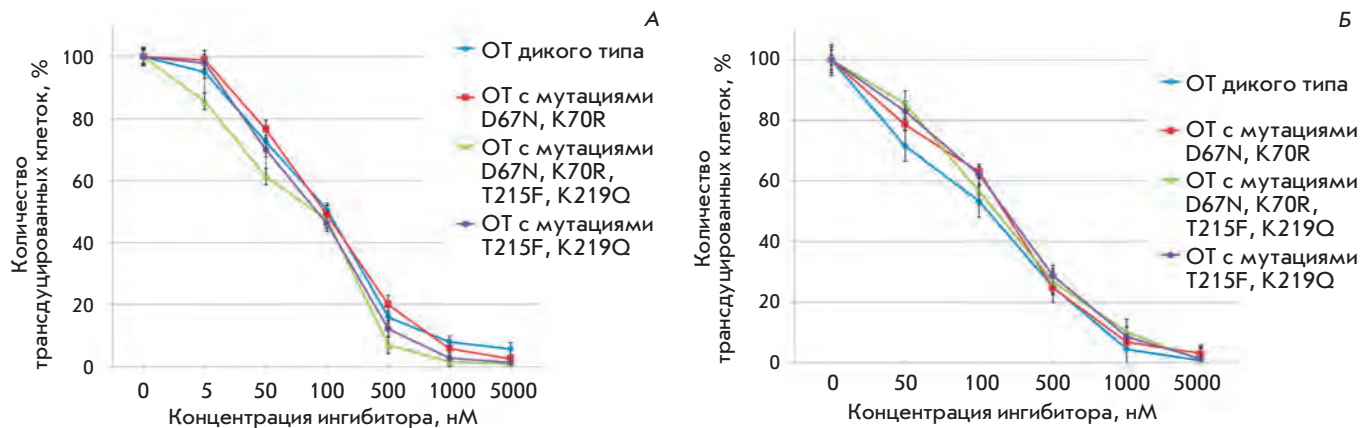
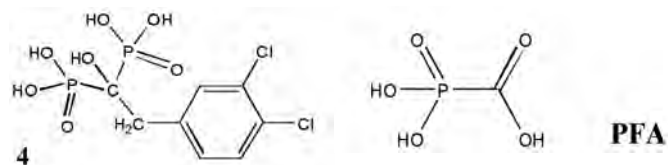


Рис. 9. Действие невриапина на эффективность трансдукции клеток псевдо-ВИЧ-1-частицами, содержащими белок оболочки G BSC и обратную транскриптазу дикого типа или мутантные формы, на клетках линий Jurkat (А) и SC-1 (Б). Показан уровень трансдукции относительно положительного контроля.

В настоящее время описан ряд соединений-миметиков неорганического пирофосфата, способных подавлять выщепление нуклеотидов при пирофосфоролизе [35, 36]. Один из них, фоскарнет (PFA), успешно применяется в комбинации с АЗТ [37], что подтверждает перспективность использования негидролизующихся аналогов неорганического пирофосфата в сочетании с нуклеозидными ингибиторами при терапии СПИДа [37].



Наиболее перспективным типом аналогов неорганического пирофосфата считаются производные гидроксиметилдифосфоновой кислоты, которые применяются в терапии костных патологий. В отличие от фоскарнета, соединения этого ряда не являются субстратами в реакции пирофосфоролиза. Тем не менее они эффективно ингибируют пирофосфоролитическое выщепление АЗТ из ДНК, катализируемое обратной транскриптазой ВИЧ-1 [36]. При этом следует отметить отсутствие публикаций об их активности в клеточных системах. В представленной работе для оценки адекватности предлагаемой клеточной системы и изучения веществ данного типа были испытаны фоскарнет (PFA) и аналог неорганического пирофосфата – бисфосфонат 4. Дихлорбензильное производное метилдифосфоновой кислоты 4 является наиболее активным из подобных соединений, оно способно подавлять выщепление монофосфата АЗТ, катализируемое обратной транскриптазой, в субмикромольном диапазоне концентраций [35]. Данные

о совместном действии азидотимидина и указанных ингибиторов пирофосфоролиза приведены на рис. 11. В этом опыте определена степень ингибирования трансдукции клеток АЗТ-устойчивыми псевдо-ВИЧ-1-частицами (несущими точечные замены D67N, K70R, T215F и K219Q в обратной транскриптазе) при добавлении АЗТ в комбинации с выбранным ингибитором пирофосфоролиза. В контрольном эксперименте определяли количество флуоресцирующих клеток в присутствии каждого из этих веществ по отдельности.

Вывод об аддитивности действия АЗТ и аналогов пирофосфата делали, сравнивая степень ингибирования в присутствии двух веществ и произведение степеней ингибирования каждым из соединений (что отражает независимость их действия). Из рис. 11 видно, что фоскарнет и бисфосфонат 4 подавляли инфицирование клеток псевдовиральными частицами, а также заметно и статистически значимо усиливали действие АЗТ. Таким образом, полученные данные впервые показывают возможность восстановления чувствительности резистентных форм ВИЧ-1 к нуклеозидным ингибиторам обратной транскриптазы в культуре клеток и свидетельствуют о перспективности аналогов неорганического пирофосфата в качестве потенциальных компонентов антиретровирусной терапии.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием ряда линий клеток человека и мыши показано, что описанная нами система безопасного скрининга потенциальных ингибиторов репликации ВИЧ-1 позволяет проводить испытания ингибиторной активности соединений, действие которых направлено как на обратную транскриптазу и ин-

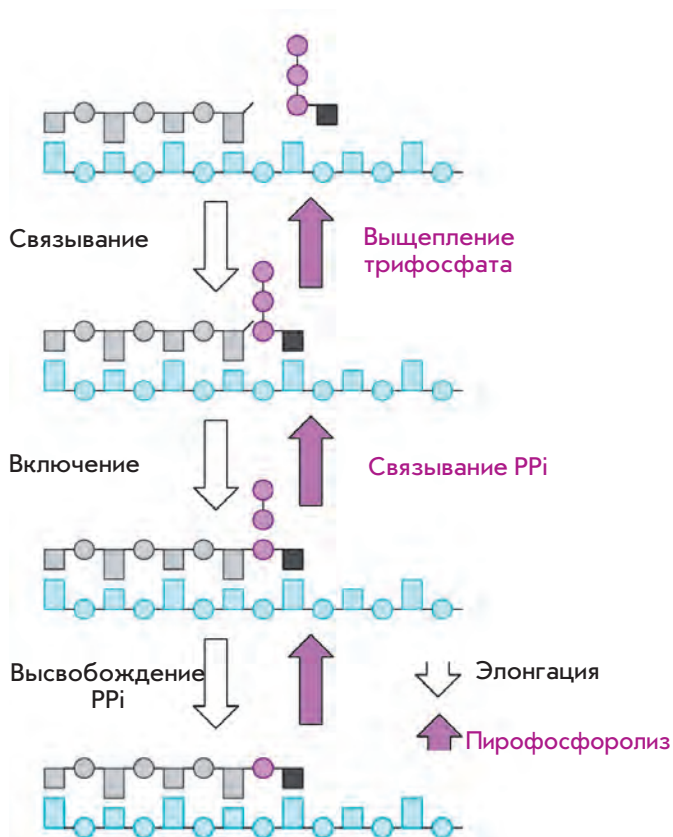


Рис. 10. Механизм реакции пирофосфоролиза, катализируемой обратной транскриптазой.

тегразу ВИЧ-1 дикого типа, так и на их мутантные формы, соответствующие лекарственно-устойчивым формам вируса. Важно, что используемые в этой системе псевдо-ВИЧ-1-частицы неинфекционны и по сути представляют собой вирусы однократного действия (рекомбинантные лентивирусные векторы), содержащие полный набор вирусных ферментов, обеспечивающих синтез рекомбинантного двухцепочечного ДНК-провируса и его интеграцию в геном клеток-мишеней. После этого клеточными системами осуществляется экспрессия маркерных генов, внесенных в геном клетки, в составе рекомбинантного генома псевдо-ВИЧ-1-частиц.

Отсутствие в таком рекомбинантном геноме полного набора ВИЧ-1 гарантирует безопасность испытаний эффективности новых анти-ВИЧ-1-соединений, с одной стороны, и возможность адекватной оценки действия этих соединений на обратную транскриптазу и интегразу ВИЧ-1 в клетках, «зараженных» (трансдуцированных) псевдо-ВИЧ-1-частицами.

Возможность формирования псевдо-ВИЧ-1-частиц, содержащих мутантную «лекарственно-устойчивую» обратную транскриптазу и/или интегразу, позволяет

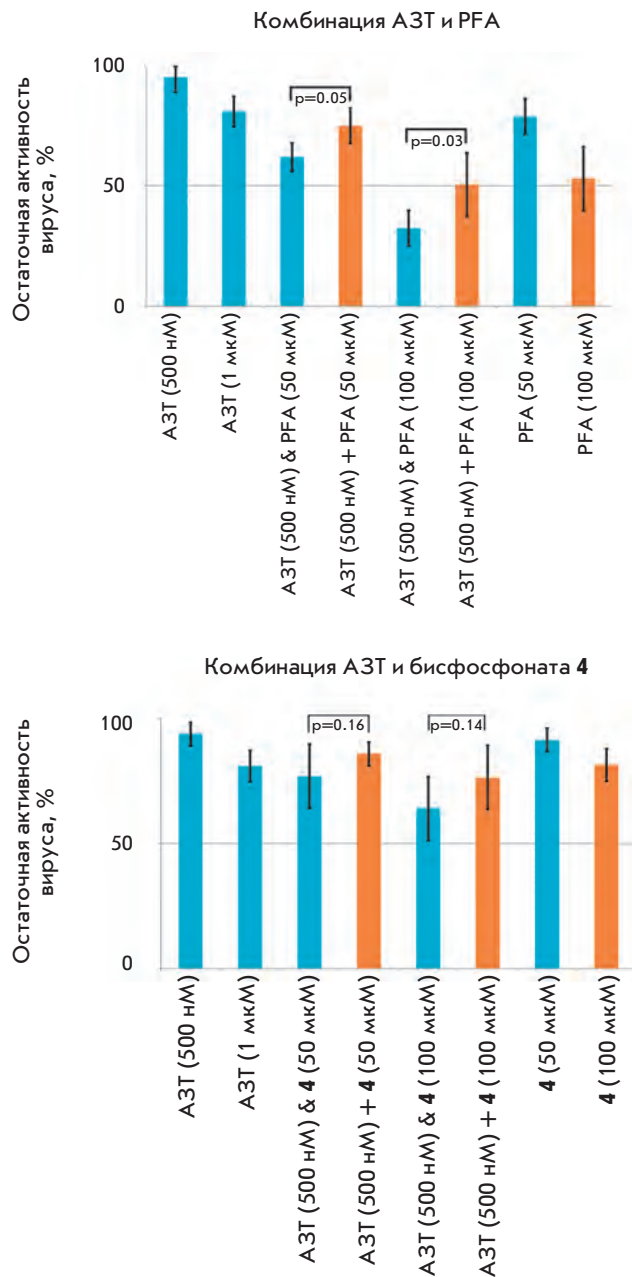


Рис. 11. Подавление вирусной трансдукции комбинацией АЗТ и ингибиторов пирофосфоролиза. Данные представлены как среднее значение серии из пяти экспериментов ± доверительный интервал ( $P \leq 0.1$ ). Значения серий «АЗТ&» получены при одновременном внесении ингибиторов в указанных в скобках концентрациях. Значения серий «АЗТ+» являются расчетной величиной, полученной произведением остаточных активностей индивидуальных ингибиторов в указанных в скобках концентрациях.  $p$  – Значение парного двухвыборочного  $t$ -теста Стьюдента для указанных значений.

также проводить скрининг потенциальных ингибиторов лекарственно-устойчивых форм ВИЧ-1.

Псевдотипирование псевдо-ВИЧ-1-частицы белками оболочки ретровирусов различной природы, в том числе и белком оболочки gp160 ВИЧ-1, а также других оболочечных вирусов, существенно расширяет возможности системы скрининга, позволяя заражать клетки различных типов, и делает возможным тестирование ингибиторов проникновения вирусов в клетку. Наконец, хотя это и не рассмотрено в настоящей работе, представленная система позволяет исследовать и ингибиторы протеазы ВИЧ-1. ●

*Работа поддержана Программами фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов», госконтрактами с Минобрнауки РФ № 16.512.11.2192, 16.512.11.2193, 16.512.12.2006 и 02.740.11.0706 и грантами Российского фонда фундаментальных исследований № 09-04-01221-а, 11-04-12035-офи-м и 11-04-01365-а.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 2008 Report on the global AIDS epidemic, World Health Organization.
- <http://www.hivrussia.org/stat/2009/10.shtml>
- De Clercq E. // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2009. V. 33. № 4. P. 307–320.
- Kuritzkes D.R., Walker B.D. // *Fields Virology* / Eds Knipe D.M., Howley P.M. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007.
- Hengge U.R., Ruzicka T., Tying S.K., Stuschke M., Roggen-dorf M., Schwartz R.A., Seeber S. // *Lancet Infect. Dis*. 2002. V. 2. № 5. P. 281–292.
- Wittkop L., Günthard H.F., de Wolf F., Dunn D., Cozzi-Lepri A., de Luca A., Kücherer C., Obel N., von Wyl V., Masquelier B., et al. // *Lancet Infect. Dis*. 2011. V. 11. № 5. P. 363–371.
- Núñez M. // *Hepatology*. 2010. V. 52. № 3. P. 1143–1155.
- Izzedine H., Harris M., Perazella M.A. // *Nat. Rev. Nephrol*. 2009. V. 5. № 10. P. 563–573.
- Panyutich A.V., Prassolov V.S., Shydlovskaya E.A., Reznikov M.V., Chumakov P.M., Voitenuk N.N. // *Hybridoma*. 1990. V. 9. № 4. P. 401–406.
- Prassolov V.S., Meyer J., Brandenburg G., Hannemann J., Bergemann J., Ostertag W., Stocking C. // *Exp. Hematol*. 2001. V. 29. № 6. P. 756–765.
- Спирин П.В., Вильгельм А.Э., Прасолов В.С. // *Молекуляр. биология*. 2008. Т. 42. № 5. С. 913–926.
- Спирин П.В., Баскаран Д., Рубцов П.М., Зенкова М.А., Власов В.В., Черноловская Е.Л., Прасолов В.С. // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. № 2(2). P. 98–103.
- Спирин П.В., Баскаран Д., Орлова Н.Н., Рулина А.В., Никитенко Н.А., Черноловская Е.Л., Зенкова М.А., Власов В.В., Рубцов П.М., Чумаков П.М., и др // *Молекуляр. биология*. 2010. Т. 44. № 5. С. 876–888.
- Kellam P., Larder B. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 1994. V. 38. № 1. P. 23–30.
- Walter H., Schmidt B., Korn K., Vandamme A.M., Harrer T., Uberla K. // *J. Clin. Virol*. 1999. V. 13. № 1–2. P. 71–80.
- Jármay G., Heinkelein M., Weissbrich B., Jassoy C., Rethwilm A. // *J. Med. Virol*. 2001. V. 64. № 3. P. 223–231.
- Garcia-Perez J., Sanchez-Palomino S., Perez-Olmeda M., Fernandez B., Alcamí J. // *J. Med. Virol*. 2007. V. 79. № 2. P. 127–137.
- Чересиз С.В., Григорьев И.В., Семенова Е.А., Пустыльняк В.О., Власов В.В., Покровский А.Г. // *ДАН*. 2010. Т. 435. № 1. С. 126–130.
- Прасолов В.С., Чумаков П.М. Вектор pPS-1-нео для введения и экспрессии генов в культивируемых соматических клетках млекопитающих. Авт. свид. 1440036 от 26.06.1987 г. Заявка 4268094.
- Rosenblum L.L., Patton G., Grigg A.R., Frater A.J., Cain D., Erlwein O., Hill C.L., Clarke J.R., McClure M.O. // *Antivir. Chem. Chemother*. 2001. V. 12. № 2. P. 91–97.
- Smith R.A., Gottlieb G.S., Miller A.D. // *Retrovirology*. 2010. V. 7. P. 70–81.
- Bjerke M., Franco M., Johansson M., Balzarini J., Karlsson A. // *Biochem. Pharmacol*. 2008. V. 75. № 6. P. 1313–1321.
- Perez-Bercoff D., Wurtzer S., Compain S., Benech H., Clavel F. // *J. Virol*. 2007. V. 81. № 9. P. 4540–4550.
- Patick A.K., Boritzki T.J., Bloom L.A. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 1997. V. 41. № 10. P. 2159–2164.
- Grob P.M., Wu J.C., Cohen K.A., Ingraham R.H., Shih C.K., Hargrave K.D., McTague T.L., Merluzzi V.J. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1992. V. 8. № 2. P. 145–152.
- Witvrouw M., Arranz M.E., Pannecouque C., Declercq R., Jonckheere H., Schmit J.C., Vandamme A.M., Diaz J.A., Ingate S.T., Desmyter J., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 1998. V. 42. № 3. P. 618–623.
- Novikov M.S., Ivanova O.N., Ivanov A.V., Ozerov A.A., Valuev-Elliston V.T., Gurskaya G.V., Kochetkov S.N., Pannecouque C., Balzarini J., Seley-Radtke K.L. // *Bioorg. Med. Chem*. 2011. V. 19. № 19. P. 5794–5802.
- Hazuda D.J., Felock P., Witmer M., Wolfe A., Stillmock K., Grobler J.A., Espeseth A., Gabryelski L., Schleif W., Blau C., et al. // *Science*. 2000. V. 287. № 5453. P. 646–650.
- Paprotka T., Venkatachari N.J., Chaipan C., Burdick R., Delviks-Frankenberry K.A., Hu W.S., Pathak V.K. // *J. Virol*. 2010. V. 84. № 11. P. 5719–5729.
- Gröschel B., Höver G., Doerr H.W., Cinatl J., Jr. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2001. V. 20. № 4–7. P. 487–492.
- Paintsil E., Dutschman G.E., Hu R., Grill S.P., Wang C.J., Lam W., Li F.Y., Ghebremichael M., Northrup V., Cheng Y.C. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2011. V. 55. № 2. P. 895–903.
- 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.
- Arion D., Parniak M.A. // *Drug Resist. Updat*. 1999. V. 2. № 2. P. 91–95.
- Isagulians M.G., Belikov S.V., Starodubova E.S., Gizatullin R.Z., Rollman E., Zuber B., Zuber A.K., Grishchenko O.I., Rytting A.S., Källander C.F., et al. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2004. V. 20. № 2. P. 191–201.
- Cruchaga C., Ansó E., Rouzaut A., Martínez-Irujo J.J. // *J. Biol. Chem*. 2006. V. 281. № 38. P. 27744–27752.
- Song Y., Chan J.M.W., Tovian Z., Secrest A., Nagy E., Krysiak K., Bergan K., Parniak M.A., Oldfield E. // *Bioorg. Med. Chem*. 2008. V. 16. P. 8959–8967.
- Jacobson M.A., van der Horst C., Causey D.M., Dehlinger M., Hafner R., Mills J. // *J. Infect Dis*. 1991. V. 163. № 6. P. 1219–1222.