

УДК 577.151.45:615.038

Проблемы и перспективы клинического применения ингибиторов интеграции ВИЧ-1

С. П. Королев^{1*}, Ю. Ю. Агапкина¹, М. Б. Готтих^{1,2}¹Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

*E-mail: spkorolev@mail.ru

Поступила в редакцию 04.04.2011 г.

РЕФЕРАТ Одну из важнейших стадий репликации ВИЧ-1 – интеграцию ДНК-копии вируса в клеточную ДНК – катализирует вирусный фермент интегразы. Разработка ингибиторов интеграции ВИЧ-1 ведется более 10 лет, но к настоящему времени только один ингибитор интеграции – ралтегравир – допущен к применению в качестве лекарственного средства. Этот ингибитор хелатирует ионы металла, находящиеся в активном центре фермента, и блокирует одну из реакций, катализируемых интегразой, – перенос цепи. К сожалению, у некоторых больных вирус достаточно быстро приобретает устойчивость к ралтегравиру. На стадии клинических испытаний находятся еще несколько ингибиторов интеграции ВИЧ-1. Однако все они являются аналогами ралтегравира как по структуре, так и по механизму действия. Возникновение устойчивости вируса к некоторым из них вызвано мутациями в интегразе, сходными с мутациями, обуславливающими устойчивость к ралтегравиру. В представленном обзоре рассмотрены история создания ралтегравира и его аналогов, прохождение ими клинических испытаний, проблемы возникновения устойчивости ВИЧ-1 к ингибиторам интеграции, а также перспективы их дальнейшего применения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА интегразы ВИЧ-1, ингибирование, механизм действия, ралтегравир.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВААРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия; ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека типа 1; ИН – интегразы; ПЦ – перенос цепи; СПИД – синдром приобретенного иммунодефицита; АУС – площадь под фармакокинетической кривой (кривая «концентрация–время») – изменение концентрации активного вещества в плазме или сыворотке крови во времени; IC_{50} – концентрация ингибитора, при которой цитопатогенное действие вируса в инфицированных клетках снижается на 50%; IC_{95} – концентрация ингибитора, при которой цитопатогенное действие вируса в инфицированных клетках снижается на 95%; Cl_p – клиренс, или коэффициент очищения – показатель скорости очищения плазмы крови от вещества в процессе его биотрансформации, перераспределения в организме, а также выведения из организма; C_{max} – максимум, или пик концентрации активного вещества в крови; EC_{50} – концентрация ингибитора, при которой репликация вируса *in vivo* подавляется на 50%; EC_{90} – концентрация ингибитора, при которой репликация вируса *in vivo* подавляется на 90%; F – биодоступность – доля введенного вещества, попавшего в неизменном виде в кровь, при пероральном приеме; FBS – фетальная сыворотка крупного рогатого скота; FDA – Управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США; IC_{50} – концентрация ингибитора, при которой активность фермента подавляется на 50%; NHS – нормальная сыворотка человека; PPV – доля введенного вещества, связавшегося с белками плазмы крови; $T_{1/2}$ – время, через которое концентрация вещества в плазме крови уменьшается в 2 раза; WT – дикий тип.

ВВЕДЕНИЕ

Синдром приобретенного иммунодефицита человека (СПИД) – одна из самых масштабных эпидемий конца XX – начала XXI века. СПИД вызывается вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), который

поражает иммунную систему организма. Одни из самых высоких в мире темпов роста ВИЧ-инфекции наблюдаются в Украине и в России. По некоторым оценкам, распространенность ВИЧ среди взрослого населения России составляет более 1.1% [1]. Именно

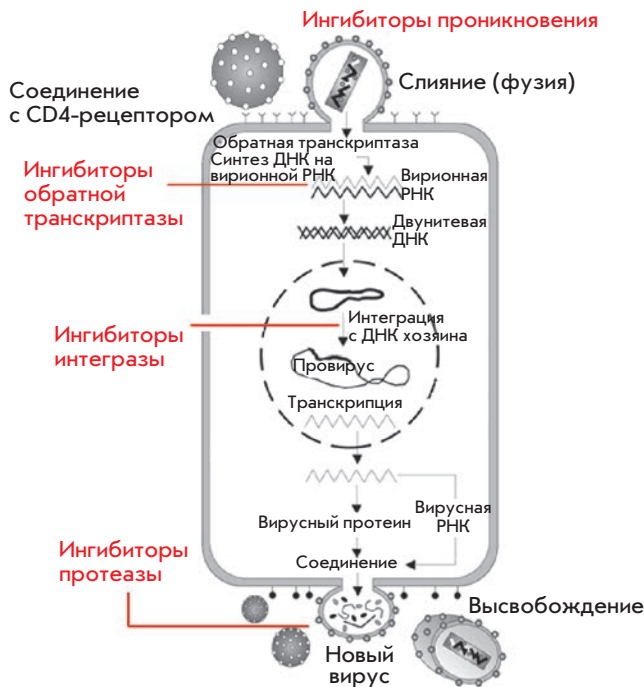


Рис. 1. Репликативный цикл ВИЧ и точки приложения ВААРТ.

поэтому разработка эффективных лекарственных средств для борьбы с этим вирусом особенно актуальна для нашей страны.

ВИЧ заражает прежде всего клетки иммунной системы: $CD4^+$ Т-лимфоциты, макрофаги и дендритные клетки. Постепенно количество $CD4^+$ -клеток сокращается, в результате чего клеточный иммунитет ослабевает, а при достижении критического уровня лимфоцитов организм становится восприимчивым к оппортунистическим инфекциям [2]. В отсутствие антиретровирусной терапии можно выделить следующие стадии течения ВИЧ-инфекции: первичная инфекция – острый ВИЧ-синдром, заканчивающийся исчезновением клинических симптомов и сероконверсией; латентная стадия (бессимптомная хроническая ВИЧ-инфекция); симптоматическая ВИЧ-инфекция (СПИД), часто сопровождающаяся развитием оппортунистических инфекций; терминальная стадия (смерть) [2].

Репликативный цикл ВИЧ-1 можно условно разделить на две фазы: раннюю и позднюю (рис. 1) [2, 3]. На ранней стадии жизненного цикла частицы вируса специфично связываются с поверхностным белком CD4 за счет специфического взаимодействия гликопротеина оболочки вируса gp120 и N-концевого домена иммуноглобулина белка CD4. Присоединение к CD4-рецептору позволяет gp120 также связаться с корецепторами (CCR5 или CXCR4) на поверхности

клетки-мишени. После связывания gp120 с корецепторами гликопротеин gp41 внедряется в мембрану клетки, что приводит к слиянию оболочки вируса и клеточной мембраны с образованием поры, через которую сердцевина вируса проникает в цитоплазму клетки [2]. После слияния вирус избавляется от оболочки и начинается процесс обратной транскрипции. Обратная транскрипция геномной РНК осуществляется вирусным ферментом, обратной транскриптазой, в цитоплазме. Продукт обратной транскрипции – двухцепочечная кДНК – транспортируется в ядро в составе прединтеграционного комплекса, включающего ряд вирусных белков: интегразу (ИН), матриксный белок МА, обратную транскриптазу, нуклеокапсидный белок NC и регуляторный белок Vpr (Viral Protein R) [4, 5], а также клеточные белки: Ku [6], HMG I(Y) [7], BAF [8] и LEDGF/p75 [9]. Ядерная локализация ИН, МА, Vpr [5] и LEDGF/p75 [9] обеспечивается сигналами ядерной локализации. После транспорта в ядро ДНК-копия интегрируется, т.е. ковалентно встраивается, в геном клетки-хозяина благодаря каталитической активности ИН [3]. Поздняя фаза репликативного цикла ВИЧ-1 начинается с регулируемой экспрессии провирусного генома, затем происходит процессинг синтезированных вирусных белков вирусной протеазой с последующей сборкой новых вирионов, которые высвобождаются из клетки и инфицируют новые клетки-мишени, завершая жизненный цикл вируса [2, 3].

При ВИЧ-инфекции применяют высокоактивную антиретровирусную терапию (ВААРТ), насчитывающую в настоящее время 25 препаратов [10]. В основном это нуклеозидные и нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1 и ингибиторы протеазы. Кроме того, недавно разработаны ингибиторы проникновения: маравирик, блокирующий взаимодействие gp120 с CCR5, и энфувиртид, взаимодействующий с гликопротеином gp41 (рис. 1). В конце 2007 г. Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (Food and Drug Administration, FDA) был одобрен к применению в качестве средства против СПИДа первый ингибитор интеграции, препарат Isentress™, или ралтегравир (МК-0518) [11].

Стадия интеграции вирусной ДНК в клеточную – одна из ключевых в репликативном цикле ВИЧ-1, поэтому катализирующая ее ИН считается одной из самых привлекательных мишеней для ингибиторов ВИЧ-1. Показано, что вирус, содержащий дефектную ИН, не способную катализировать интеграцию вирусной ДНК, не размножается в культуре клеток [12]. Кроме того, ИН не имеет клеточного эквивалента, и, следовательно, ингибиторы, специфически подавляющие ее каталитическую активность, не долж-

ны влиять на клеточные процессы и, как следствие, должны быть менее токсичными для клетки и всего организма в целом, чем ингибиторы других стадий репликативного цикла ВИЧ. Разработка ингибиторов интеграции активно велась в течение многих лет. В многочисленных обзорах [13–19] подробно описаны соединения различного типа, способные блокировать ИН. Настоящий обзор посвящен современному состоянию исследований в области применения ралтегравира и его аналогов в качестве компонентов ВААРТ.

СТРОЕНИЕ ИНТЕГРАЗЫ И МЕХАНИЗМ ИНТЕГРАЦИИ

Процесс интеграции начинается в цитоплазме и протекает в несколько стадий [20–22]. ДНК-копия вирусной РНК содержит на обоих концах длинные концевые повторы, состоящие из трех участков: U3, R и U5. На расстоянии двух нуклеотидов от 3'-конца каждой цепи ДНК находится консервативный динуклеотид CA, который встречается в длинных концевых повторах всех ретровирусов. ИН в составе прединтеграционного комплекса узнает нуклеотидные последовательности, расположенные на концах участков U3 и U5 вирусной кДНК, связывается с ними и затем катализирует реакцию 3'-концевого процессинга. Эта реакция представляет собой эндонуклеазное расщепление вирусной кДНК, в результате которого с 3'-конца каждой цепи удаляется динуклеотид GT. Расщепление субстрата происходит в результате нуклеофильной атаки молекулой воды фосфатной группы между 2-м и 3-м нуклеотидами [20–22].

Затем прединтеграционный комплекс транспортируется в ядро, где ИН катализирует стадию переноса цепи (ПЦ). Она представляет собой реакцию переэтерификации, которая включает нуклеофильную атаку 3'-гидроксильных групп процессированных цепей вирусной (субстратной) ДНК на межнуклеотидные фосфаты обеих цепей клеточной ДНК (ДНК-мишени) с образованием ковалентного продукта. Переэтерификации подвергаются межнуклеотидные связи, расположенные в различных цепях ДНК-мишени на расстоянии 5 п.н. одна от другой. Для завершения процесса интеграции требуются: процессинг 5'-концов вирусной ДНК, полимеразная достройка пяти недостающих нуклеотидов и лигирование, которые осуществляются при участии клеточных белков [20].

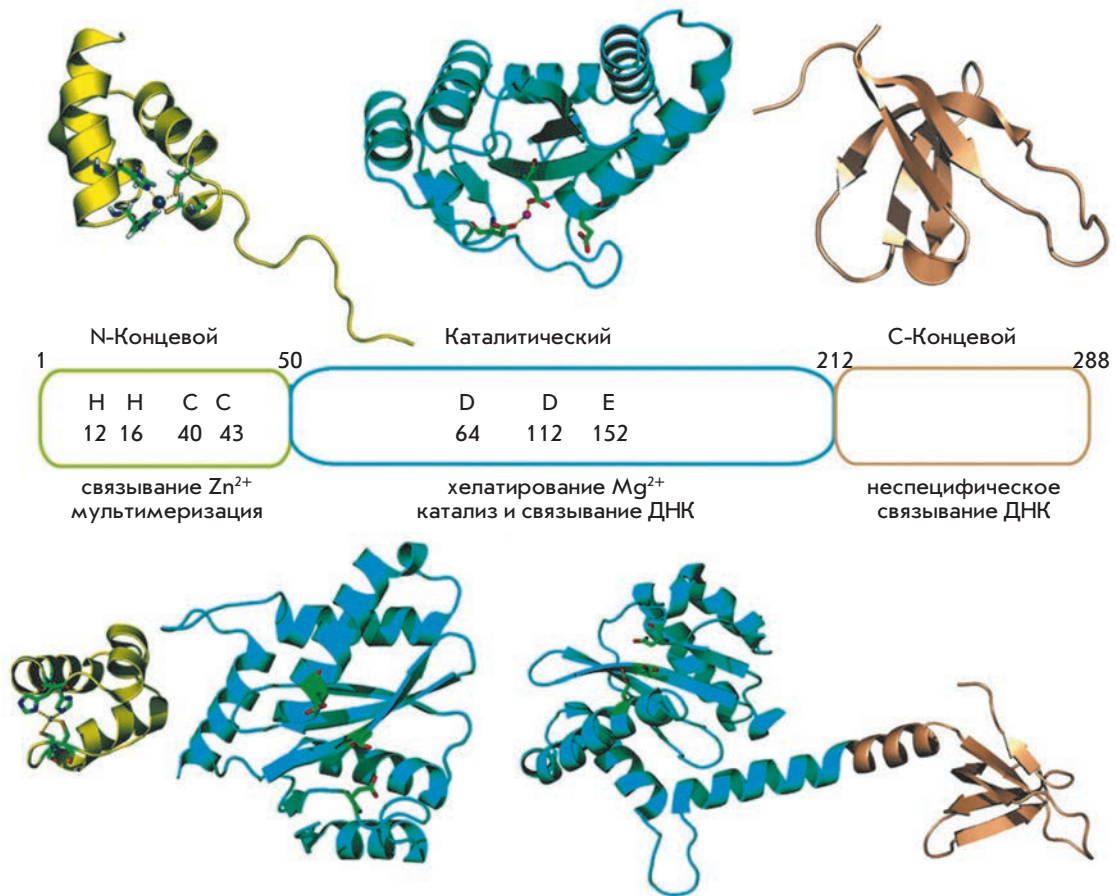
В процессе интеграции ИН должна связать два конца вирусной ДНК и клеточную ДНК. Однако до сих пор данные о взаимодействии ИН с ДНК достаточно ограничены. Интеграза ВИЧ-1 представляет собой белок, состоящий из 288 аминокислотных остатков (32 кДа), кодируемых вирусным геном *pol*. ИН транслируется в составе полипептида Gag-Pol, который затем расщепляется на отдельные белки вирусной протеазы [21]. Частичным протеолизом и на-

правленным мутагенезом показано, что в структуре фермента можно выделить три домена: N-концевой, в состав которого входят аминокислотные остатки с 1 по 50; каталитический, который образуют остатки 51–212; С-концевой, состоящий из аминокислотных остатков 213–288 (рис. 2) [20].

N-Концевой домен содержит два остатка гистидина и два остатка цистеина, консервативных у ретровирусных интеграз и ретротранспозаз [20]. Эти остатки координируют ион цинка и участвуют в образовании каталитически активного мультимера ИН, так как показано, что координация ионов Zn^{2+} стимулирует мультимеризацию ИН и ее активность [23]. В состав каталитического домена ИН входит триада инвариантных аминокислотных остатков (D64, D116 и E152 у ВИЧ-1), которые формируют активный центр ретровирусных интеграз. Каталитический домен участвует в связывании концов вирусной ДНК, благодаря взаимодействию с ними консервативных аминокислотных остатков домена, в первую очередь Q148, K156 и K159. Для интеграции ИН нуждается в присутствии ионов металла-кофактора (Mg^{2+} или Mn^{2+}), которые координируются двумя остатками, входящими в каталитическую триаду (D64 и D116) [21]. Наименее консервативный С-концевой домен формирует «SH3-подобную укладку» (Src Homology 3-like fold), этот структурный мотив вовлечен в мультимеризацию ИН, но наибольший вклад он вносит в образование и стабилизацию специфических к последовательности и неспецифических комплексов с ДНК. Нетипичный двойной сигнал ядерной локализации, расположенный в каталитическом ($^{186}KRK^{188}$) и С-концевом ($^{211}KELQKQITK^{219}$) доменах ИН, узнается участниками импортин/кариоферинового клеточного пути. Этого взаимодействия достаточно, чтобы вовлечь ПИК в систему клеточного ядерного транспорта [24].

Структура полноразмерной ИН ВИЧ-1 до сих пор не известна, удалось определить только структуру отдельных доменов и двухдоменных фрагментов ИН (см. [20]). Эти данные, а также результаты, полученные с использованием сайт-направленного мутагенеза и поперечных сшивок, используются для создания компьютерных моделей ИН [25–27]. Несмотря на то что эти модели зачастую противоречат друг другу, большинство исследователей сходятся во мнении, что в клетке ИН функционирует в форме тетрамера. Эта точка зрения подтверждается в работе [28], авторам которой впервые удалось закристиллизовать и расшифровать структуру ретровирусной ИН в комплексе с ДНК. Используемая с этой целью ИН пенящего вируса человека, относящегося к ретровирусам подгруппы *Sputnaviridae*, действует в форме тетрамера, со-

Рис. 2. Структурные домены интегразы ВИЧ-1 [14].



стоящего из асимметричных димеров, каждый из которых взаимодействует с одним концом вирусной ДНК и осуществляет его интеграцию в клеточную ДНК [28]. Сравнительное изучение каталитических характеристик ИН пенящего вируса человека и ВИЧ-1 выявило значительное сходство в «работе» этих двух ферментов [29, 30].

На каталитическую активность ИН могут влиять и клеточные, и вирусные белки, входящие в состав прединтеграционного комплекса. Для встраивания обоих концов вирусной ДНК в суперскрученную клеточную ДНК ИН ВИЧ-1 не нуждается ни в вирусных, ни в клеточных кофакторах [31]. Однако показано, что такие белки, как вирусный белок NC и клеточные HMG I(Y) и LEDGF/p75, могут увеличивать эффективность интеграции [21, 32]. Известно, что клеточный белок LEDGF/p75 непосредственно взаимодействует с ИН и стимулирует согласованную интеграцию и перенос цепи ИН [33]. Предполагается, что LEDGF/p75 может выполнять роль шаперона по отношению к ИН, стабилизировать ее мультимерную организацию и увеличивать сродство ИН к ДНК [21].

СОЗДАНИЕ ИНГИБИТОРОВ ИНТЕГРАЦИИ ВИЧ-1, ПОДАВЛЯЮЩИХ РЕАКЦИЮ ПЕРЕНОСА ЦЕПИ

В отсутствие знаний о структуре ИН ВИЧ-1 основным методом поиска ее ингибиторов долгое время был скрининг библиотек химических соединений различных классов [4]. Завершенное к 2000 г. тестирование библиотеки, состоящей из 250000 соединений, позволило специалистам компании «Merck Pharmaceuticals» (США) выявить среди них ряд с наибольшей ИН-ингибирующей активностью [34]. Все они оказались дикетосоединениями (ДКС), а именно, производными 2,4-диоксобутановой кислоты. Ингибиторы содержали так называемый мотив β-дикетокислоты, способный координировать ионы металла-кофактора в активном центре ИН [34]. Эти ингибиторы проявляли большую активность при ингибировании реакции переноса цепи, чем при ингибировании 3'-процессинга *in vitro*. Наиболее активное соединение L-731.988 (рис. 3) было в 70 раз более активным по отношению к реакции переноса цепи, чем к реакции 3'-процессинга. Кроме того, этот ингибитор подавлял развитие ВИЧ-1 в культуре клеток (табл. 1).

Проведен отбор устойчивых к действию ДКС штаммов вируса с последующим определением места мутации. В ИН устойчивого к действию L-731.988 штамма обнаружена замена остатка M154 (M154I), расположенного в непосредственной близости от остатка E152, входящего в каталитическую триаду фермента [34].

В дальнейшем [38] было детально изучено взаимодействие L-731.988 с ИН. Показано, что ингибитор в концентрациях вплоть до микромолярных не взаимодействует с изолированным ферментом. Для его связывания с ферментом необходим ДНК-субстрат – U5- или U3-концевые участки вирусной ДНК. При этом константа диссоциации (K_d) комплекса интегразы с L-731.988, определенная в присутствии 100 нМ U5-субстрата, составляла 75 нМ, что коррелировало со значением IC_{50} в реакции переноса цепи. Аффинность L-731.988 при взаимодействии с ИН, связанной с процессированной вирусной ДНК, была в 100 раз выше, чем с ИН в отсутствие вирусной ДНК ($K_d = 10-20$ мкМ). ДНК произвольной последовательности не стимулировала взаимодействие ингибитора с ферментом. Кроме того, увеличение концентрации ДНК-субстрата, избыток которого мог служить ДНК-мишенью, приводило к уменьшению связывания ингибитора с ИН. На основании этих данных предположили [38], что ингибитор L-731.988 подавляет реакцию переноса цепи, конкурируя с ДНК-мишенью за место ее связывания, причем для взаимодействия ингибитора с ИН необходима конформация активного фермент-субстратного комплекса.

Аналогичный характер ингибирования активности ИН имеет и ряд других соединений, общей чертой которых было присутствие двух атомов кислорода, способных координировать ионы металла-кофактора в активном центре ИН [39–42].

Таблица 1. Результаты исследований *in vitro* и клеточных испытаний дикетокислоты L-731.988 и производных нафтиридина L-870.810 и L-870.812 в качестве ингибиторов интеграции ВИЧ-1

Ингибитор интегразы	IC_{50} <i>in vitro</i> (перенос цепи), нМ	IC_{95} <i>ex vivo</i>
L-731.988	8–15 [34]	$IC_{50} = 1$ мкМ [34]
L-870.810	8–15 [35]	15 нМ (10% FBS) 100 нМ (50% NHS) [36]
L-870.812	40 [36]	250 нМ (50% NHS) [37]

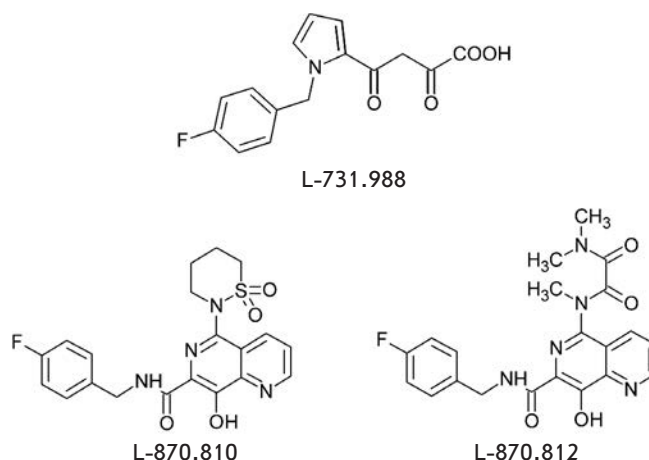


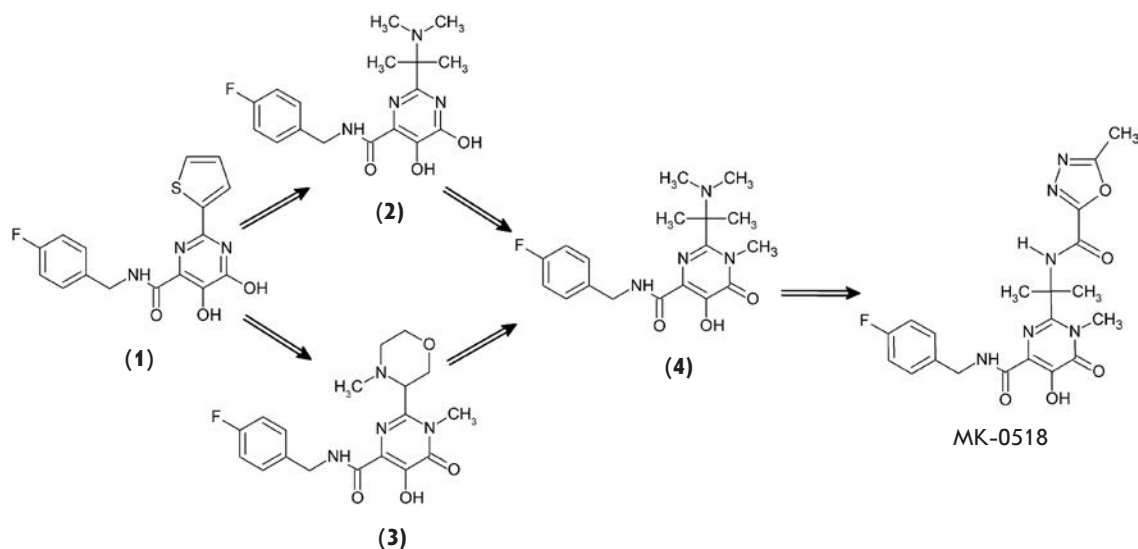
Рис. 3. Структуры ингибиторов интеграции ВИЧ-1 – L-731.988, L-870.810, L-870.812.

Поиски аналогов ДКС, проявляющих противointегразную активность, привели к созданию компанией «Merck Pharmaceuticals» производных нафтиридина. Эти соединения имели схожую с ДКС активность и селективность по отношению к реакции переноса цепи [43]. Среди ингибиторов данного структурного класса наиболее хорошо изучены два: L-870.810 и L-870.812 (рис. 3, табл. 1).

Производное нафтиридина L-870.810 вытесняло дикетокислоту L-731.988 из комплекса ИН/ДНК-субстрат, что позволило предположить возможность связывания этих соединений с ИН в едином или перекрывающихся сайтах [36]. Доказательством действия этого ингибитора на процесс интеграции служило накопление в обрабатываемых L-870.810 клетках кольцевой вирусной ДНК и снижение количества интегрированной вирусной ДНК. Селекция устойчивых к действию L-870.810 штаммов вируса приводила к следующим заменам в первичной структуре ИН: F121Y/T125K, V72I/F121Y/T125K и V72I/F121Y/T125K/V151I [36]. Вирусы, несущие соответствующие мутации, были в 4–100 раз менее чувствительны к действию L-870.810, чем ВИЧ-1 дикого типа [36]. Мутации в гене ИН, приводящие к устойчивости вируса к дикетокислотам и нафтиридинам, близко расположены, но не идентичны. Все это свидетельствует о возможности существования как общего центра связывания, так и общего механизма действия у ингибиторов обоих классов.

Ингибитор L-870.810 успешно прошел первую стадию клинических испытаний, но на второй стадии обнаружилась его токсичность для почек и печени, поэтому испытания были прекращены [44].

Рис. 4. Оптимизация производных дигидроксипиримидина (**1, 2**) и N-метилпиримидинона (**3, 4**) в качестве ингибиторов переноса цепи, осуществляемых ИН ВИЧ-1, приведшая к созданию ингибитора МК-0518 – ралтегравира.



РАЛТЕГРАВИР (МК-0518) – ПЕРВЫЙ РАЗРЕШЕННЫЙ К ПРИМЕНЕНИЮ ИНГИБИТОР ИНТЕГРАЦИИ ВИЧ-1

Создание ралтегравира

Относительный успех, достигнутый при применении в качестве ингибиторов ИН производных нафтиридина, привел к созданию ингибиторов на основе дигидроксипиримидина (соединение **(1)**, рис. 4) [45]. Это соединение специфически подавляло перенос цепи, осуществляемый рекомбинантной ИН (табл. 2), однако было неактивно в культуре инфицированных клеток даже в микромолярных концентрациях. Тем не менее, благодаря своим фармакокинетическим показателям, определенным на крысах (хорошая биодоступность ($F = 39\%$), низкий клиренс плазмы крови ($Cl_p = 11$ мг/мин/кг)), это соединение было отобрано для дальнейших структурно-функциональных исследований [45], которые позволили создать соединение **(2)** (рис. 4) [46]. Данное вещество хорошо ингибировало реакцию переноса цепи (табл. 2), а также подавляло цитопатическое действие ВИЧ-1 в инфицированных клетках [46].

Параллельные исследования привели к созданию нового класса ингибиторов ИН – производных N-алкилпиримидинона, которые в опытах *in vitro* ингибировали ИН в наномолярных концентрациях [36]. Результаты изучения ингибирующего действия соединения **(3)** (рис. 4), принадлежащего к данному классу, приведены в табл. 2 [47]. Кроме того, соединения **(2)** и **(3)** имели хороший фармакокинетический профиль и хорошую биодоступность в доклинических испытаниях, проведенных на крысах, собаках и макаках-резус [46, 47].

В дальнейшем [48] предприняли попытку объединить в одной молекуле оптимальные свой-

ства ингибиторов каждой из двух серий. Такой подход привел к созданию другого производного N-метилпиримидинона (соединение **(4)**, рис. 4). Однако соединение **(4)** оказалось менее активным (табл. 2).

Структурно-функциональное изучение производных N-метилпиримидинона в качестве ингибиторов ИН было продолжено [48]. Наиболее активным оказалось соединение МК-0518 (табл. 2), получившее название ралтегравир (рис. 4). Оказалось, что ралтегравир имеет высокую селективность по отношению к ИН и практически не ингибирует ($IC_{50} > 50$ мкМ) такие Mg^{2+} -зависимые ферменты, как обратная транскриптаза ВИЧ-1, РНК-аза Н ВИЧ-1, РНК-полимераза вируса гепатита С, а также полимеразы α , β и γ человека [48]. Не обнаружено также влияния

Таблица 2. Результаты исследований *in vitro* и клеточных испытаний производных дигидроксипиримидина, N-метилпиримидинона и ралтегравира (МК-0518) в качестве ингибиторов интеграции ВИЧ-1

Соединение	IC_{50} <i>in vitro</i> (перенос цепи), нМ	IC_{95} <i>ex vivo</i>	Ссылка
(1)	10	неактивен	[45]
(2)	50	60 нМ (10% FBS) 78 нМ (50% NHS)	[46]
(3)	60	60 нМ (10% FBS) 100 нМ (50% NHS)	[47]
(4)	250	1 мкМ (10% FBS) > 1 мкМ (50% NHS)	[48]
МК-0518	15	19 нМ (10% FBS) 31 нМ (50% NHS)	[48]

Таблица 3. Фармакокинетические параметры ралтегавира, определенные на крысах/собаках/макаках-резус [48]

Форма	AUC, мкМ·ч	C _{max} , мкМ	T _{1/2} , ч	F, %	Cl _p , мл/мин/кг	PPB, %
ОН	1.0/21/1.8	1.2/8/0.3	нд*/нд/7	37/45/8	39/6/18	74/71/85
Na ⁺	1.4/нд/нд	1.0/нд/нд	нд/нд/нд	нд/нд/нд	нд	нд
K ⁺	1.3/45/нд	1.6/24/нд	7.5/13/нд	45/69/нд	нд	нд

*нд – нет данных.

ралтегавира (в концентрации вплоть до 10 мкМ) еще на 150 различных ферментов, рецепторов и каналов. В частности, ралтегавир не действовал на различные изоформы цитохрома P450 (IC₅₀ > 50 мкМ) и не связывался с ионным каналом hERG [48].

Фармакокинетика и взаимодействие с компонентами ВААРТ

Фармакокинетический профиль ралтегавира изучен на крысах, собаках и макаках-резус [48]. Крысы получали ралтегавир в дозе 3 мг/кг в трех различных формах (ОН-форма, а также Na⁺- и K⁺-соли). Лучшие результаты были достигнуты при применении солей ралтегавира. При этом количество вещества, поступившего в кровь при однократном приеме (AUC), было максимальным у Na⁺-соли, а наибольший пик концентрации вещества в крови (C_{max}) достигался у K⁺-соли (табл. 3). Собаки получали ралтегавир в дозе 10 мг/кг в виде ОН-формы и K⁺-соли. В этом случае значения AUC и C_{max} также лучше у солевой формы препарата (табл. 3). Кристаллическую ОН-форму в дозе 10 мг/кг получали и макаки-резус, но показатели AUC и C_{max} (табл. 3) были при этом довольно низкими. Биодоступность препарата при пероральном приеме (F) также оказалась лучше у K⁺-соли, чем у ОН-формы (табл. 3). Таким образом, фармакокинетический профиль ралтегавира в виде Na⁺- и K⁺-солей оказался лучше, чем у ОН-формы, при этом солевые формы имели лучшую растворимость [48].

Клиренс плазмы крови был достаточно низким у собак и имел средние значения у крыс и макаков-резус (табл. 3). Кроме того, изучено связывание ралтегавира с белками плазмы крови (PPB) крыс, собак и макаков-резус (табл. 3) [48] и его метаболизм в микросомах печени этих животных и человека. Оказалось, что препарат метаболизируется глюкуронозилтрансферазой [48]. К такому же выводу пришли при изучении метаболизма в гепатоцитах [48] и подтвердили его результатами независимого исследования [49]. С помощью ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии полностью охарактеризовали образование конъюгата глюкуронида с гидроксильной группой в положении 5 пиримидинового кольца ралтегавира [48].

Сравнение данных *in vivo* и *in vitro* позволило предположить [48], что фармакокинетический профиль ралтегавира у человека будет сходен с профилем препарата у собаки. Для достижения терапевтического эффекта необходимо, чтобы концентрация вещества через 12 ч после приема (C₁₂) оставалась выше CIC₉₅ = 31 нМ. Учитывая данные по связыванию ралтегавира с белками плазмы крови, метаболической стабильности, периоду его полувыведения и клиренсу, предложили при проведении клинических испытаний перорально принимать K⁺-соль ралтегавира в дозе не менее 100 мг 2 раза в день.

Фармакокинетический профиль ралтегавира определяли как на здоровых добровольцах, так и на ВИЧ-инфицированных. Два рандомизированных, плацебо-контролируемых испытания проведены на здоровых добровольцах: 32 человека получали ралтегавир однократно (10–1600 мг), 40 человек – каждые 12 ч в течение 10 дней (100–800 мг) [50]. Установлено, что ралтегавир хорошо усваивается, и его содержание в плазме крови достигает максимума (C_{max}) уже через 1 ч. Время полувыведения препарата (T_{1/2}) составило 7–12 ч. Постоянная концентрация препарата в крови достигается уже через 2 сут его приема, а после прекращения приема отмечается лишь слабое его накопление в организме [50]. Кроме того, необходимо отметить, что не обнаружено каких-либо значительных отличий при приеме препарата мужчинами и женщинами.

Фармакокинетика ралтегавира изучали также и у ВИЧ-инфицированных, не получавших ранее антиретровирусную терапию [51]. Установлено, что значения AUC и C_{max} растут в геометрической прогрессии вплоть до приема ралтегавира в дозе 400 мг дважды в день, а при дозе 600 мг увеличения этих параметров не происходит [51]. Кроме того, отмечено снижение вирусной нагрузки у ВИЧ-инфицированных примерно в 3 раза вне зависимости от количества принимаемого препарата [51]. Тем не менее, последние результаты следует учитывать с осторожностью из-за сравнительно небольшой выборки и малой продолжительности исследования.

Изучено также взаимодействие ралтегавира с различными компонентами противовирусной тера-

пии ВААРТ у здоровых добровольцев (см. [52]). Оказалось, что одновременный прием ралтегравира и ингибиторов протеаз – атазанавира и смеси атазанавир/ритонавир, несколько увеличивает концентрацию ралтегравира в крови, в то время как сам ритонавир практически не влияет на концентрацию ралтегравира. Нуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы тенофовир также практически не влиял на концентрацию ралтегравира. Прием ралтегравира вместе с типонавиром (ингибитор протеазы), маравироком (ингибитор проникновения), эфавиренцем и этравирином (оба ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы) приводил к снижению концентрации ралтегравира у здоровых добровольцев.

Только одно исследование взаимодействия ралтегравира с компонентами ВААРТ проведено на ВИЧ-инфицированных [53]. Четыре человека принимали ралтегравир (400 мг) дважды в день совместно с этравирином (ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы), при этом концентрация ралтегравира в крови снизилась в 4 раза. Несмотря на подобные результаты, авторы не дают никаких рекомендаций по изменению дозы ралтегравира при его применении вместе с этравирином [53]. Таким образом, становится очевидной необходимость дальнейшего изучения взаимодействия ралтегравира с компонентами ВААРТ у ВИЧ-инфицированных.

Клинические испытания

Терапия при устойчивости к ВААРТ. В первую очередь было начато изучение ралтегравира у ВИЧ-инфицированных, получавших ВААРТ и приобретших устойчивость к ее компонентам. Рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое испытание (P005) проводили в течение 24 нед в исследовательских центрах США, Европы, Латинской Америки и Азии [54]. В испытание вошли взрослые (старше 18 лет) больные с вирусной нагрузкой более 5000 копий РНК ВИЧ/мл и уровнем CD4⁺-лимфоцитов более 50 клеток/мкл, регулярно получавшие ВААРТ в течение не менее 3 месяцев и имеющие лабораторно подтвержденную генотипическую или фенотипическую резистентность как минимум к одному ненуклеозидному ингибитору обратной транскриптазы, одному нуклеозидному ингибитору обратной транскриптазы и одному ингибитору протеазы. Перед случайным распределением на группы каждому больному индивидуально оптимизировали базовый режим ВААРТ, количество принимаемых препаратов варьировало от двух до семи. Необходимо отметить, что у этих больных был крайне ограничен выбор антиретровирусных средств по причинам их непереносимости или устойчивости к ним ВИЧ-1. По-

скольку ранее показали, что одновременный прием атазанавира (ингибитор протеазы) и ралтегравира может приводить к повышению концентрации ралтегравира в крови [50], больных разделили на две подгруппы, оптимизированный режим ВААРТ в одной из которых включал атазанавир, а во второй – нет [54].

В исследование вошли 175 человек. Все они были разделены на группы, которым давали разные дозы ралтегравира или плацебо (табл. 4). Клинико-демографические характеристики групп были сходными. Все больные прошли 24-недельный курс терапии. Ралтегравир в качестве добавки к оптимизированному режиму ВААРТ во всех дозах был эффективнее плацебо. Во всех группах, принимавших ралтегравир, отмечалось среднее снижение вирусной нагрузки на 100 копий/мл, которое начиналось уже на 2-й нед и стойко сохранялось вплоть до 24-й (табл. 4). Снижение вирусной нагрузки сопровождалось повышением уровня CD4⁺-клеток (табл. 4). Совместное применение ралтегравира и энфувертида (ингибитор проникновения) или атазанавира в составе ВААРТ особенно улучшало вирусологический и иммунный ответ. Участие в испытании по причине неэффективности прекратил 41 больной – 14 (11%) из 144, получавших ралтегравир, и 27 (60%) из 45, получавших плацебо. Ралтегравир показал себя высокобезопасным препаратом: большинство побочных эффектов были легкими или средней тяжести. Всего двое больных прекратили участие в исследовании по причине побочного действия ВААРТ – один в группе ралтегравира и один в группе плацебо [54].

С результатами испытания P005 [54] в целом хорошо согласуются результаты продолжительного исследования BENCHMRK-1 и -2 [55], посвященного изучению эффективности и безопасности применения ралтегравира у больных, ранее получавших ВААРТ. В результате 96-недельного исследования обнаружили, что у больных, принимавших ралтегравир, более значительно снижается вирусная нагрузка и повышается уровень CD4-клеток, чем у больных, получавших плацебо (табл. 4). Необходимо отметить, что наилучшие результаты достигнуты при использовании ралтегравира в сочетании с дарунавиром (ИП) и энфувертидом, которые эти больные ранее не принимали [55].

Первичная терапия. Показав хорошие результаты у ранее получавших ВААРТ больных, ралтегравир стал привлекательным в качестве первичного препарата для ВИЧ-инфицированных, ранее не получавших ВААРТ. В двух сериях клинических испытаний (P004 [56] и STARTMRK-1 и -2 [57]) сравнивали действие ралтегравира и эфавиренца (ненуклеозидный

Таблица 4. Результаты клинических испытаний ралтегравира

Название и продолжительность испытаний	Терапевтическая стратегия	Доля больных с неопределяемой вирусной нагрузкой (< 50 копий/мл)	Уровень CD4-клеток, клеток/мкл	Ссылка
Терапия при устойчивости к ВААРТ				
P005, 24 нед	200 мг рал.*, 41 ч	65	63	[54]
	400 мг рал., 45 ч	56	113	
	600 мг рал., 44 ч	67	94	
	Плацебо, 45 ч	13	5	
BENCHMRK-1 и -2, 96 нед	400 мг рал., 462 ч	58	123	[55]
	Плацебо, 237 ч	26	49	
Первичная терапия				
P004, 48 нед	100 мг рал., 41 ч	85	221	[56]
	200 мг рал., 40 ч	83	146	
	400 мг рал., 41 ч	88	144	
	600 мг рал., 40 ч	88	187	
	600 мг эфв.**, 39 ч	87	170	
STARTMRK-1 и -2, 48 нед	400 мг рал., 281 ч	86	189	[57]
	600 мг эфв., 282 ч	82	163	
Поддерживающая терапия				
CHEER, 24 нед	400 мг рал., 52 ч	94	32	[58]

*рал. – ралтегравир.

**эфв. – эфавиренц.

ингибитор обратной транскриптазы). Дополнительно к этим препаратам испытуемые получали тенофовир и ламивудин (оба нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы) P004 [56] или только тенофовир STARTMRK-1 и -2 [57]. Оказалось, что ралтегравир не уступает эфавиренцу в способности снижать вирусную нагрузку ниже 50 копий/мл; уровень CD4-клеток также был сравнимым у этих препаратов (табл. 4). Помимо этого, терапевтический эффект у ралтегравира наступал раньше, чем у эфавиренца [57]. Хотя причины подобного эффекта остаются неясными, это свойство ралтегравира может найти применение при необходимости быстро снизить вирусную нагрузку после заражения ВИЧ, а также для снижения риска внутриутробного заражения плода от ВИЧ-инфицированной матери. Необходимо также отметить, что в целом результаты, показанные в исследованиях P004 и STARTMRK-1 и -2, были лучше, чем в исследованиях P005 и BENCHMRK-1 и -2 (табл. 4). Этот результат свидетельствует в пользу раннего начала приема ралтегравира ВИЧ-инфицированными.

Поддерживающая терапия. Помимо использования ралтегравира в качестве лекарственного средства

лицами, ранее не получавшими ВААРТ, а также устойчивыми к компонентам ВААРТ, предложено с целью снижения побочных эффектов заменять ралтегравиром антиретровирусные средства у больных с неопределяемой вирусной нагрузкой. В исследование CHEER [58] вошли 52 человека с вирусной нагрузкой менее 50 копий/мл, ранее получавших энфувертид (ингибитор проникновения). Спустя 24 нед после перевода на ралтегравир у 49 больных сохранилась неопределяемая вирусная нагрузка (табл. 4). На основании этих результатов можно сделать вывод, что замена энфувертида ралтегравиром представляется вполне безопасной.

Безопасность

Безопасность ралтегравира изучали как у ВИЧ-инфицированных, ранее не получавших ВААРТ, так и у больных, у которых развилась устойчивость к компонентам ВААРТ. Все испытания показали хорошую переносимость препарата [51, 56, 57]. Ралтегравир также оказался безопаснее эфавиренца при первичной терапии ВИЧ-инфицированных [57]. Безопасность ралтегравира испытывали на больных, ранее получавших ВААРТ. Примерно у 3.5% принимавших ралтегравир больных обнаружили рецидив-

ные или прогрессирующие формы рака, в то время как у лиц, принимавших плацебо, этот показатель составлял 1.7%. Наиболее распространенными были саркома Капоши, лимфома, рак печени и др. [54]. Тщательный анализ всех случаев развития рака у лиц, принимавших ралтегравир, не выявил корреляции между приемом препарата и появлением злокачественных новообразований [52].

Рекомендации к применению

Ралтегравир успешно прошел все стадии клинических испытаний и в октябре 2007 г. был одобрен FDA в качестве лекарственного средства для больных, приобретших устойчивость к компонентам ВААРТ [11], а в июле 2009 г. FDA разрешило использовать ралтегравир и при первичной терапии ВИЧ-инфицированных [59]. Ралтегравир получил торговое название Isentress™, он выпускается в виде таблеток по 400 мг для перорального приема дважды в день.

Возникновение устойчивости к ралтегравиру

Ралтегравир достаточно успешно применяется в качестве одного из компонентов ВААРТ, однако ряд больных оказался невосприимчивым к этому препарату [60]. Во время испытаний BENCHMRK-1 и -2 было установлено, что примерно у 25% больных спустя 48 нед после начала приема ралтегравира развивается устойчивость к нему. От 94 таких больных выделили изоляты вируса. В 30 из них не обнаружили мутаций в гене ИН, тогда как в оставшихся 64 возникновение устойчивости было связано именно с такими мутациями [60]. Устойчивость к ингибиторам переноса цепи связана, как правило, с мутациями в активном центре ИН [61]. Изоляты вируса, устойчивые к ралтегравиру, содержали первичные мутации именно в активном центре: Y143R/C, Q148K/R/H и N155H [60]. У большей части больных (48 из 64) вирус имел две и более мутаций. Как правило, это были одна из первичных мутаций и одна или несколько вторичных мутаций. Первичная мутация Y143R/C была связана со вторичными мутациями L74A/I, E92Q, T97A, I203M и S230R, а мутация Q148K/R/H ассоциировалась с мутациями G140S/A и E138K. Первичная мутация N155H была связана с рядом вторичных мутаций: L74M, E92Q, T97A, V151I и G163R [60]. Помимо этого, установлено, что мутации, как правило, со временем накапливаются. Это, в первую очередь, относится к замене Q148R, которая делает вирус практически невосприимчивым к ралтегравиру. Доля носителей вируса с такой мутацией среди больных, резистентных к ралтегравиру после 48 нед лечения, равнялась 27%, а через 96 нед их доля возросла до 53%. В то же время доля носителей

вируса с мутацией N155H уменьшилась с 45 до 18% [60]. Вероятность возникновения нечувствительности к ралтегравиру снижалась у лиц со сниженной вирусной нагрузкой (< 100000 копий/мл), а также у принимавших другие активные антиретровирусные препараты.

Аналогичная картина обнаружена во время испытания P005 [54]. У 20 человек из 35, оказавшихся невосприимчивыми к ралтегравиру, вирус содержал преимущественно мутацию Q148K/R/H, а у 14 – N155H. Мутация N155H снижала чувствительность ВИЧ к воздействию ралтегравира в 10 раз, в то время как мутация Q148K/R/H – в 25 раз. Мутация Q148K/R/H, как и в испытании BENCHMRK-1 и -2, оказалась сопряжена со вторичными заменами E138K и G140S/A. В случае N155H обнаружены вторичные мутации L74M, E92Q и G163R и не найдены замены T97A и V151I. Вероятность возникновения устойчивости также снижалась при пониженной вирусной нагрузке и при дополнительном использовании активных компонентов ВААРТ [54].

Интересны также полученные недавно данные работы [62], в которой изучали действие ралтегравира на реакцию переноса цепи, осуществляемую ИН дикого типа или ИН, содержащей мутацию G140S, Q148H, либо двойную мутацию G140S/Q148H. Оказалось, что в то время как мутация G140S приводит к появлению лишь небольшой устойчивости ($IC_{50}(WT) = 10 \text{ нМ}$, $IC_{50}(G140S) = 30 \text{ нМ}$), ИН с мутациями Q148H или G140S/Q148H имеет очень высокую устойчивость к ралтегравиру ($IC_{50}(Q148H) > 700 \text{ нМ}$, $IC_{50}(G140S/Q148H) > 1000 \text{ нМ}$). Помимо этого, было установлено, что мутация G140S в гене ИН восстанавливает слабую инфекционность вируса с мутацией Q148H до уровня вируса дикого типа [62].

АНАЛОГИ РАЛТЕГРАВИРА – ИНГИБИТОРЫ ИНТЕГРАЦИИ ВИЧ-1

Появление нового лекарственного средства, как и любой другой инновации, вызывает бурный рост числа его аналогов. Учитывая примерную стоимость разработки, испытаний и внедрения одного препарата, равную примерно 2 млрд долларов США, а также тот факт, что только одному из трех новых лекарственных средств удается оправдать эти расходы [18], можно только представить, как велик соблазн фармацевтических компаний избежать трудностей разработки абсолютно нового препарата и ограничиться модификацией наилучшего на данный момент. Поэтому ралтегравир – единственный на данный момент разрешенный к применению ингибитор интегразы ВИЧ – представляет огромный интерес в качестве отправной точки при разработке ингибиторов интеграции. Аналоги ралтегравира, как правило, пред-

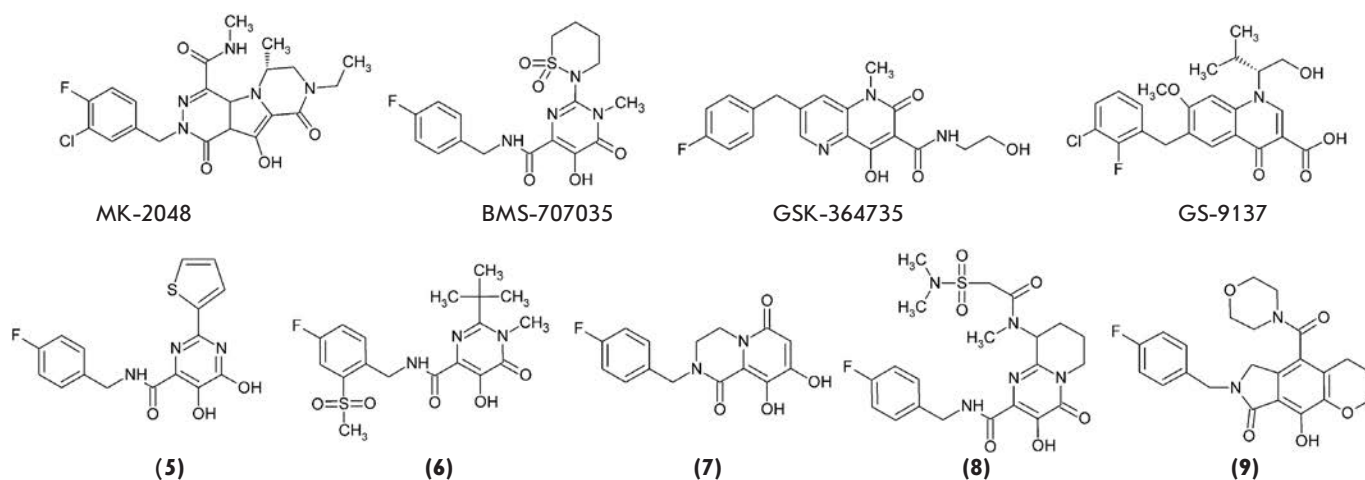


Рис. 5. Структуры ингибиторов интеграции ВИЧ-1 – аналогов ралтегравира: MK-2048, BMS-707035, GSK-364735, GS-9137, а также новых ингибиторов, представителей различных структурных классов: дигидроксипириимидина (5), N-метилпириимидинона (6), дигидроксипиридопипразин-1,6-диона (7), бициклического пириимидинона (8), пирролхинолона (9).

ставляют собой соединения, созданные на основе дикетокислот, специфически подавляющие реакцию переноса цепи ИН за счет хелатирования ионов Mg^{2+} в активном центре фермента [18]. В данном разделе мы хотели бы особо остановиться на ингибиторах переноса цепи, допущенных до стадии клинических испытаний.

MK-2048

Вскоре после получения разрешения на применение ралтегравира в качестве лекарственного средства компанией «Merck Pharmaceuticals» была предпринята попытка воссоздать фармакофор, характерный для дикетокислот и способный взаимодействовать с ионом металла, на основе производных трициклического гидроксипиррола [63]. Это привело к созданию ингибитора MK-2048 (рис. 5), который проявлял высокую ингибирующую активность во всех экспериментах (табл. 5). Ингибитор имеет неплохой фармакокинетический профиль и, что наиболее важно, потенциально активен по отношению к четырем мутантным формам ИН, устойчивым к ралтегравиру. В настоящее время проходит клинические испытания [18].

BMS-707035

В структуре этого ингибитора объединены структурно-функциональные мотивы ингибиторов L-780.810 и ралтегравира [16]. BMS-707035 отличается от ралтегравира только заменой оксадиазольной группировки на циклическую сульфонамидную группу (рис. 5) и имеет сходную с ралтегравиrom ингибирующую активность *in vitro* (табл. 5). BMS-707035

дошел до второй стадии клинических испытаний, однако в ответ на терапию практически сразу возникли многочисленные мутации в гене ИН, приводящие к появлению устойчивых штаммов ВИЧ [16]. В начале 2008 года клинические испытания BMS-707035 были приостановлены.

GSK-364735

На основе одного из первых ингибиторов переноса цепи S-1360 [42] объединенной компанией «Shionogi-GlaxoSmithKline Pharmaceuticals» разработан ингибитор GSK-364735 (рис. 5), представляющий собой производное нафтиридинона [68]. Он эффективно подавлял репликацию ВИЧ в МТ-4-клетках (табл. 5) и при этом обладал низкой цитотоксичностью ($CC_{50} > 10 \mu M$). Изучение действия GSK-364735 на штаммы ВИЧ, содержащие мутации в гене ИН, показало, что ингибитор несколько более активен по отношению к вирусам с мутациями T66I (в 1.2 раза), E92Q (в 3.7 раза), P145S (в 1.4 раза), Q146R (в 1.7 раза), Q153Y (в 1.4 раза), чем к вирусу дикого типа. Однако обнаружено значительное снижение активности ингибитора GSK-364735 в случае четырех основных мутаций в гене интегразы ВИЧ-1, которые приводят к возникновению устойчивости: в 17 раз в случае мутации T66K, в 210 раз – Q148K, в 73 раза – Q148R и в 23 раза – N155H [68]. На стадии доклинических испытаний было установлено, что GSK-364735 имеет приемлемый фармакокинетический профиль: показатели биодоступности F (42, 12 и 32%), период полувыведения из плазмы крови $T_{1/2}$ (1.5, 1.6 и 3.9 ч) и клиренс плазмы Cl_p (3.2, 8.6 и 2 мл/мин/кг) были соответственно получены на кры-

Таблица 5. Результаты исследований *in vitro* и клеточных испытаний аналогов ралтегравира в качестве ингибиторов интеграции ВИЧ-1

Соединение	IC ₅₀ <i>in vitro</i> (перенос цепи), нМ	IC ₉₅ <i>ex vivo</i>	Ссылка
МК-2048	10	35 нМ (50% NHS)	[63]
BMS-707035	20	-	[16]
GSK-364735	8	EC ₅₀ = 1.2 нМ EC ₉₀ = 42 нМ (20% NHS)	[68]
S/GSK1349572	2.7	EC ₅₀ = 0.5 нМ EC ₉₀ = 2 нМ	[13]
GS-9137 (элвитегравир)	7	EC ₅₀ = 0.7 нМ EC ₉₀ = 1.7 нМ (20% NHS)	[72]
(5) (дигидроксипиримидин)	10	> 10 мкМ (10% FBS)	[48]
(6) (N-метилпиримидинон)	20	10 нМ (10% FBS) 20 нМ (50% NHS)	[64]
(7) (дигидроксипиридопиразин-1,6-дион)	100	310 нМ (10% FBS) 310 нМ (50% NHS)	[65]
(8) (бициклический пиримидинон)	7	16 нМ (10% FBS) 31 нМ (50% NHS)	[66]
(9) (пирролхинолон)	13	7 нМ (10% FBS) 16 нМ (50% NHS)	[67]

сах, собаках и макаках-резус [68]. Препарат имел неплохие показатели на первой стадии клинических испытаний: установлено, что GSK-364735 способен более чем в 100 раз снижать вирусную нагрузку, однако на второй стадии клинические испытания были прекращены из-за выявленной гепатотоксичности [68, 69].

S/GSK1349572

Компания «Shionogi-GlaxoSmithKline Pharmaceuticals» сообщила также о создании высокоэффективного ингибитора S/GSK1349572 (табл. 5) [70]. Авторы не раскрывают структуру этого соединения, но сообщают, что ингибитор специфично ингибирует реакцию переноса цепи, и механизм его действия основан на хелатировании ионов Mg²⁺ в активном центре ИН [70]. Это позволяет нам предварительно отнести S/GSK1349572 к аналогам ралтегравира, если не по структурным характеристикам, то, по крайней мере, по механизму его воздействия на ИН. Использование этого препарата приводит к появлению мутаций в гене ИН, однако они не способны обеспечить высокую степень устойчивости вируса по отношению к S/GSK1349572. Интересно, что ингибитор оказался активен по отношению к штаммам ВИЧ, устойчивым к ралтегравиру [70] и элвитегравир (см. ниже). Повидимому, этот препарат имеет иной профиль резистентности [14]. Тем не менее, некоторые вторичные мутации, дополняющие G140S/Q148H, например

T97A, M154I или V201, вызывают устойчивость к S/GSK1349572. Кроме того, выявлены множественные мутации, например V75I/E138K/G140S/Q148H/M154I, вызывающие устойчивость и к S/GSK1349572, и к ралтегравиру [71]. Эти данные указывают на необходимость дальнейшего изучения возникновения устойчивости ВИЧ-1 к этому ингибитору.

На 26 здоровых добровольцах установлено, что S/GSK1349572 имеет весьма хороший фармакокинетический профиль, в частности, биодоступность препарата при пероральном приеме составила примерно 70%, а период полувыведения его из плазмы крови T_{1/2} превысил 15 ч [70]. В настоящий момент продолжается вторая стадия клинических испытаний S/GSK1349572 [70].

GS-9137 (элвитегравир)

Попытки компании «Japan Tobacco» (Япония) модифицировать фармакофор ДКС привели к созданию группы ингибиторов ИН на основе 4-оксохинолина, которые сохранили расположение основных функциональных групп, необходимых для взаимодействия с ионами металлов [72]. Подписанное в 2005 году соглашение о сотрудничестве между «Japan Tobacco» и «Gilead Sciences» (США) положило начало клиническим испытаниям ингибитора GS-9137 (рис. 5) [16], названного элвитегравир и наиболее активного представителя ингибиторов ИН данного структурного класса (табл. 5). Фармакокинетический профиль эл-

витегравира изучен на крысах и собаках [73]. Препарат имел неплохие показатели биодоступности F (34 и 30%), периода полувыведения из плазмы крови $T_{1/2}$ (2.3 и 5.2 ч) и клиренса плазмы Cl_p (8.3 и 17 мл/мин/кг) у крыс и собак соответственно [73].

Фармакокинетический профиль элвитегравира изучен на здоровых [74] и ВИЧ-инфицированных [75] добровольцах. Установлено, что элвитегравир быстро усваивается (3.5–4 ч), при увеличении дозы элвитегравира наблюдалось также увеличение параметров C_{max} и АУС. Наилучшие результаты получены, если элвитегравир принимали совместно с ритонавиром (ингибитор протеазы) [75]. В отличие от ралтегравира, элвитегравир метаболизируется цитохромом P450 (CYP3A4) [74]. Стимулирующее действие ритонавира, вероятно, объясняется его способностью ингибировать цитохром P450 и тем самым поддерживать более высокую концентрацию элвитегравира. Изучено также взаимодействие элвитегравира с нуклеозидным и ненуклеозидным ингибиторами обратной транскриптазы и ингибитором проникновения маравироком. Оказалось, что эти ингибиторы не оказывают значительного влияния на эффективность действия элвитегравира [74].

Рандомизированное изучение терапевтической активности элвитегравира проведено на 278 ВИЧ-инфицированных, ранее получавших ВААРТ и приобретших устойчивость к ее компонентам [76]. Больные с вирусной нагрузкой порядка 30000 копий/мл и уровнем CD4-лимфоцитов около 200 клеток/мкл получали элвитегравир 1 раз в день совместно с ритонавиром. После 24 нед испытаний у 90% больных, принимавших элвитегравир, вирусная нагрузка снизилась не менее чем в 10 раз. В 100 раз была снижена вирусная нагрузка у 76% лиц, получавших 125 мг элвитегравира, и у 69% больных, получавших 50 мг элвитегравира [76]. Также проведено исследование на 40 ВИЧ-инфицированных добровольцах с вирусной нагрузкой 10000–300000 копий/мл и средним уровнем CD4-клеток примерно 200 клеток/мкл, которые получали элвитегравир в различных дозах 1 или 2 раза в день либо 1 раз в день вместе с ритонавиром. Спустя 10 дней вирусная нагрузка снизилась в среднем в 80 раз в группах, принимавших элвитегравир дважды в день, а также принимавших элвитегравир совместно с ритонавиром. Однако статистически значимого изменения уровня CD4-клеток не обнаружено [75].

Рандомизированное, двойное слепое изучение действия элвитегравира на ВИЧ-инфицированных добровольцах, ранее не получавших ВААРТ, проводили в течение 48 нед [77]. Испытуемых разделили на две группы: одна получала смесь элвитегравира с ингибитором цитохрома P450 кобицистатом,

а вторая – ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы эфавиренц. Кроме того, обе группы получали два нуклеозидных ингибитора обратной транскриптазы – эмтрицитабин/тенофовир. Оказалось, что доля больных с неопределяемой вирусной нагрузкой в обеих группах достигла 83% через 24 нед и 90% после 48 нед [77]. Таким образом, элвитегравир показал высокую эффективность, сравнимую с эффективностью широко применяемого противовирусного средства эфавиренца.

Информация о безопасности элвитегравира ограничена результатами второй фазы испытаний, во время которой ВИЧ-инфицированные получали смесь элвитегравира/ритонавира или конкурентный ингибитор протеазы [76]. Не обнаружено заметных различий между двумя группами ни по частоте побочных эффектов, ни по их тяжести. Для подтверждения безопасности элвитегравира в терапии ВИЧ-инфицированных необходимы дополнительные исследования. На настоящий момент элвитегравир находится на третьей стадии клинических испытаний.

Анализ возникновения устойчивости у лиц, принимавших элвитегравир, ограничен данными, полученными на изолятах ВИЧ, выделенных от больных, участвующих во второй стадии клинических испытаний [52, 78]. Наиболее часто встречались первичные мутации E92Q, T66I/A/K, E138K, S147G, Q148R/H/K и N155H в интегразе ВИЧ-1, которые связывают также с устойчивостью к другим ингибиторам, разработанным на основе ДКС, и, в первую очередь, к ралтегравиру [79]. Хотя бы одна из первичных мутаций встречалась у 39% лиц, устойчивых к элвитегравиру. Помимо этого обнаружена перекрестная устойчивость к ралтегравиру: в среднем 150-кратное снижение восприимчивости к элвитегравиру приводило также к 30-кратному снижению восприимчивости к ралтегравиру. Перекрестная устойчивость ВИЧ к действию ралтегравира и элвитегравира подтверждается и результатами клеточных испытаний, приведенными в работе [80]. В этой работе выделены штаммы ВИЧ, устойчивые к элвитегравиру, и обнаружено, что у них повышена устойчивость к ралтегравиру, а также к производным дикетокислоты L-731.988 и нафтиридина L-870.810.

Новые ингибиторы интеграции ВИЧ-1, созданные на основе ралтегравира

Проведение большого количества исследований, направленных на поиск новых ингибиторов ИН на основе ралтегравира, привело к разработке ингибиторов ИН нескольких новых структурных классов. Все они специфически ингибируют реакцию переноса цепи и содержат функциональные группы, способные хе-

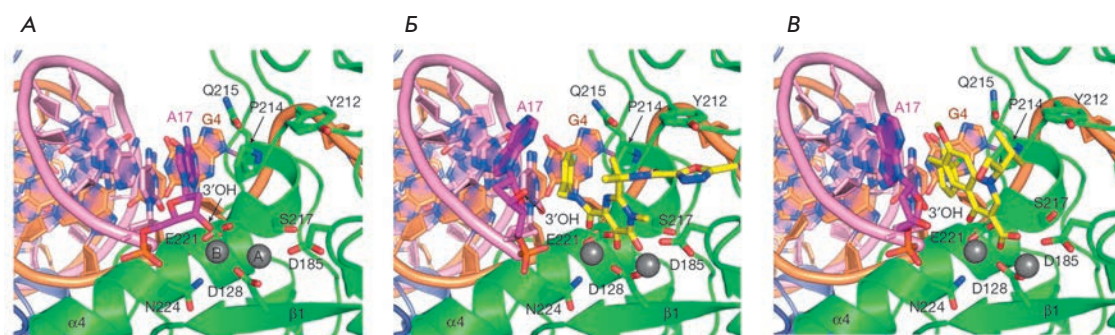


Рис. 6. Структура активного центра интегразы пенящего вируса человека без ингибитора (А); в присутствии ингибиторов МК-0518 (Б) и GS-9137 (В) [28].

латировать ионы металла в активном центре ИН [18]. Названия новых структурных классов ингибиторов ИН, структура отдельных представителей (рис. 5) с указанием их активности в исследованиях *in vitro* и клеточных испытаниях, а также данные по изучению фармакокинетики на крысах, представлены в табл. 5.

Проблемы применения аналогов ралтегравира в качестве ингибиторов интеграции

Все данные, изложенные выше, указывают на то, что известные аналоги ралтегравира действуют на интегразу ВИЧ-1 по одному и тому же механизму, содержат сходный структурный мотив и проявляют сравнимую активность *in vitro* и в клеточных испытаниях. Идентичность подобного рода ставит под сомнение успех будущего применения данных ингибиторов в качестве лекарственных средств. Эти опасения вызваны перекрестной резистентностью вируса к этим ингибиторам.

Возникновение перекрестной устойчивости можно объяснить, в первую очередь, схожим механизмом связывания ингибиторов переноса цепи с комплексом ИН и вирусной ДНК [14]. Эти соединения связываются таким образом, что «выталкивают» 3'-концевую гидроксил процессированной цепи ДНК из активного центра фермента и тем самым блокируют интеграцию. Этот механизм связывания предложен для ИН ВИЧ-1 [81], а затем показан для фермента пенящего вируса человека (рис. 6) [28]. Причем в последней работе впервые показали, что место 3'-гидроксила занимает фторбензильный остаток ингибитора, совершенно необходимый структурный элемент всех ингибиторов переноса цепи (рис. 4, 5).

Используя данные рентгеноструктурного анализа каталитического домена ИН в комплексе с Mg^{2+} (1BL3) [18], провели молекулярный докинг некоторых ингибиторов ИН, разработанных на основе ДКС. Согласно предложенной модели, ралтегравир взаимодействует с остатками T66, E92, Y143, Q148 и N155, замены которых приводят к 5–35-кратному

снижению восприимчивости к ралтегравиру [48, 82]. Молекулярный докинг также подтвердил, что аминокислотные остатки, с которыми взаимодействуют GSK-364735 и GS-9137, идентичны тем, с которыми взаимодействует ралтегравир [83, 84], за исключением G140, сближение с которым наблюдается только в случае элвитегравира [18]. Этот результат согласуется с данными о том, что мутация G140S в 4 раза снижает восприимчивость ВИЧ-1 к элвитегравиру и лишь в 1.6 раза к ралтегравиру.

Молекулярный докинг некоторых новых ингибиторов ИН (рис. 5) показал, что эти соединения связываются с ИН аналогично ралтегравиру. Таким образом, если результаты проведенного в работе [18] исследования корректны, то весьма маловероятно, что новые ингибиторы, созданные на основе ралтегравира, могут оказаться активными по отношению к штаммам ВИЧ, устойчивым к ралтегравиру, а значит, стать его адекватной заменой.

Еще одна проблема, способная осложнить успешное применение ингибиторов интеграции, – недостаток наших знаний о полиморфизме ИН у ВИЧ-1 различных подтипов. К настоящему времени проведено только одно исследование, в котором проверяли чувствительность к ралтегравиру 137 клинических изолятов, из которых 60 не принадлежали к В-подтипу [85]. Никаких различий обнаружено не было. Однако в опытах *in vitro* показано, что ИН вируса подтипа С, содержащая мутацию E92Q/N155H, в 10 раз более чувствительна к ралтегравиру и элвитегравиру, чем фермент ВИЧ-1 подтипа В [86]. Показано также, что у вируса подтипа CRF02_AG реже возникают мутации остатка G140, чем у подтипа В [87]. Есть данные и о том, что ралтегравир чаще оказывается неэффективным у лиц, инфицированных вирусом не-В-подтипа [88].

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ ПУТИ ИНГИБИРОВАНИЯ ИНТЕГРАЦИИ ВИЧ-1

На наш взгляд, оптимальный альтернативный путь поиска ингибиторов интеграции ВИЧ-1 состоит в соз-

дании ингибиторов, действующих по другому механизму, чем ралтегравир и его аналоги, специфично ингибирующие перенос цепи. Позволим себе ограничиться краткой характеристикой нескольких классов ингибиторов ИН, отличающихся по механизму действия от ингибиторов переноса цепи, и указанием некоторых их представителей.

Ингибиторы 3'-процессинга

Ингибиторы этого класса, как правило, подавляют обе стадии интеграции: и 3'-процессинг, и перенос цепи. Это происходит благодаря тому, что они взаимодействуют с активным центром самого фермента, а не с его комплексом с ДНК-субстратом. Это весьма многочисленный класс ингибиторов, но наиболее изученными ингибиторами 3'-процессинга являются стирилхинолины [89]. Стирилхинолин KHD161 (рис. 7) практически одинаково действует и на 3'-процессинг ($IC_{50} = 2.4 \text{ мкМ}$), и на перенос цепи ($IC_{50} = 1 \text{ мкМ}$), он способен подавлять цитопатическое действие ВИЧ-1 в клетках с $SI_{50} = 1.3 \text{ мкМ}$ [90, 91]. Известно, что стирилхинолиновые ингибиторы ИН не способны разрушать пресформированный комплекс ИН с ДНК-субстратом и не ингибируют реакцию 3'-процессинга с его участием, кроме того, способность стирилхинолинов связываться с ИН зависит от ионов Mg^{2+} [92]. Таким образом, можно предположить конкурентный механизм ингибирования ИН стирилхинолинами за счет взаимодействия с ионом металла в ее активном центре.

Аллостерические ингибиторы

Ингибитор V-165 (рис. 7), относящийся к классу 5H-пирано[2,3-d:-6,5-d']дипириимидинов, предотвращает связывание ИН с ДНК-субстратом. Он более эффективно ингибирует реакцию 3'-процессинга ($IC_{50} = 0.9 \text{ мкМ}$), чем переноса цепи ($IC_{50} = 16 \text{ мкМ}$) [93]. Кроме того, V-165 подавляет ВИЧ-инфекцию в культуре клеток [93]. В результате селекции устойчивых к действию ингибитора V-165 штаммов вируса удалось идентифицировать двойную мутацию T206S/S230N в гене ИН [94]. Этот результат подтверждает аллостерический механизм действия V-165, так как мутация находится в С-концевом домене ИН, основная функция которого состоит в связывании ДНК [94].

Ингибиторы мультимеризации интегразы

В настоящее время активно проводится поиск соединений, которые влияют на взаимодействие ИН с компонентами ПИК или на ее собственную способность к образованию активного мультимера [95]. К соединениям, подавляющим мультимеризацию ИН, относятся производные гидроксикумарина. Показано,

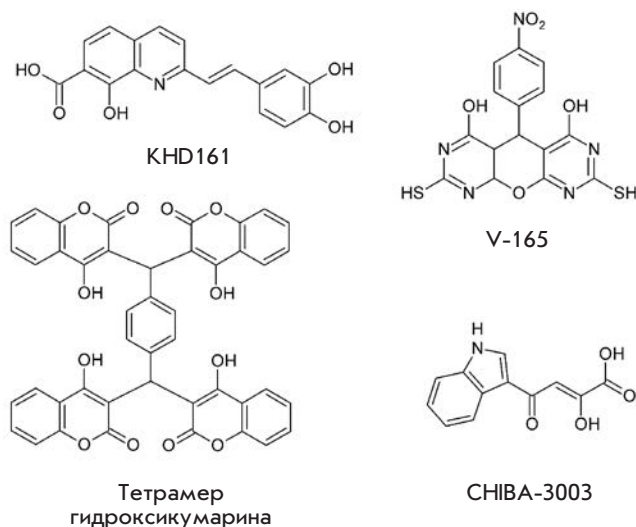


Рис. 7. Структуры KHD161, V-165, тетрамера гидроксикумарина, CHIBA-3003.

что тетрамер гидроксикумарина (рис. 7) подавляет репликацию ВИЧ-1 в культуре клеток со значением $SI_{50} = 11.5 \text{ мкМ}$ [96]. Он способен ингибировать активность интегразы ВИЧ-1 *in vitro*. Тетрамер гидроксикумарина ингибирует 3'-процессинг и перенос цепи ($IC_{50} = 1.5-2.0 \text{ мкМ}$) [96]. Проведено ковалентное присоединение бензофенонового производного гидроксикумарина к интегразе с тем, чтобы идентифицировать участок связывания ингибитора с ферментом [97]. Определен пептид $^{128}AACWWAGIK^{136}$, к которому присоединялся ингибитор [97]. Этот пептид участвует в образовании димерного комплекса каталитического домена [39]. Таким образом, гидроксикумариновый ингибитор связывается с ферментом вблизи поверхности контакта двух мономеров. Связывание производных гидроксикумарина с ИН в районе пептида $^{128}AACWWAGIK^{136}$ может нарушать подобного рода взаимодействие и влиять на формирование и стабильность каталитически активного мультимера интегразы.

Ингибиторы взаимодействия интегразы с LEDGF/p75

Это наиболее молодое направление поиска ингибиторов интеграции. Несмотря на то что в состав ПИК помимо ИН входит большое количество вирусных и клеточных белков, именно взаимодействие ИН с ее клеточным партнером LEDGF/p75 определяет интеграцию ВИЧ-1 [95]. Информация об ингибиторах, способных разрушать комплекс ИН/LEDGF, весьма ограничена, их активность, как правило, пока невысока. С помощью компьютерного моделирования удалось разработать соединение CHIBA-3003

(рис. 7), способное разрушать комплекс ИН/LEDGF с $IC_{50} = 35$ мкМ [98]. Также было изучено влияние пептида LEDGF³⁵⁵INAEIKNSLKIDNLDVNRNC IEAL³⁷⁷ на стабильность комплекса ИН/LEDGF и каталитическую активность ИН [99]. Оказалось, что этот пептид препятствует образованию комплекса ИН/LEDGF с $IC_{50} = 25$ мкМ, а также ингибирует 3'-процессинг и перенос цепи с $IC_{50} = 160$ мкМ [99].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В 1996 г. расходы, связанные с изучением, лечением и предотвращением распространения ВИЧ/СПИД, составили 300 млн долларов США. С тех пор они постоянно росли и на настоящий момент составляют примерно 10 млрд долларов США в год [18]. Значительная часть этих средств тратится на разработку новых ингибиторов, направленных на подавление вирусных ферментов, в том числе ИН. В течение трех с половиной лет, прошедших после того как ралтегравир разрешили к применению в качестве лекарственного средства против ВИЧ-1, основные усилия

фармацевтических компаний, таких, как «Merck Pharmaceuticals», «Japan Tobacco», «Gilead Sciences», «Shionogi-GlaxoSmithKline Pharmaceuticals», были направлены на разработку аналогов этого препарата. Вместе с тем многие из аналогов ралтегравира неспособны подавлять репликацию штаммов ВИЧ-1, резистентных к ралтегравиру [83, 84]. По нашему мнению, в дальнейшем следует вести более активную разработку ингибиторов с иным механизмом действия, которые могут быть активными по отношению к устойчивым к ралтегравиру штаммам вируса. Однако необходимо отметить, что ни один ингибитор интеграции ВИЧ-1, не относящийся к специфическим ингибиторам переноса цепи, пока не смог успешно пройти даже первую стадию клинических испытаний. ●

*Работа поддержана грантами
РФФИ (№ 11-04-01004_a, 11-04-01586_a),
грантом Президента Российской Федерации
(МК-4821.2011.4), ГК № 16.512.11.2193.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. <http://www.unaids.org/ru>
2. Simon V., Ho D.D., Abdool Karim Q. // Lancet. 2006. V. 368. № 9534. P. 489–504.
3. Turner B.G., Summers M.F. // J. Mol. Biol. 1999. V. 285. P. 1–32.
4. Miller M.D., Farnet C.M., Bushman F.D. // J. Virol. 1997. V. 71. P. 5382–5390.
5. Piller S.C., Caly L., Jans D.A. // Cur. Drug. Targets. 2003. V. 4. № 5. P. 409–429.
6. Li L., Olvera J., Yoder K., Mitchell R.S., Butler S.L., Lieber M., Martin S.L., Bushman F.D. // EMBO J. 2001. V. 20. P. 3272–3281.
7. Farnet C.M., Bushman F.D. // Cell. 1997. V. 88. P. 483–492.
8. Lin C.W., Engelman A. // J. Virol. 2003. V. 77. P. 5030–5036.
9. Vandegraaff N., Devroe E., Turlure F., Silver P.A., Engelman A. // Virology. 2006. V. 346. P. 415–426.
10. Marcelin A.G., Ceccherini-Silberstein F., Perno C.F., Calvez V. // Curr. Opin. HIV AIDS. 2009. V. 4. № 6. P. 531–537.
11. FDA approves raltegravir tablets // AIDS Patient Care STDS. 2007. V. 21. № 11. P. 889.
12. Cara A., Guarnaccia F., Reitz M.S. Jr., Gallo R.C., Lori F. // Virology. 1995. V. 208. P. 242–248.
13. Ramkumar K., Serrao E., Odde S., Neamati N. // Med. Res. Rev. 2010. V. 30. № 5. P. 750–814.
14. Mouscadet J.F., Delelis O., Marcelin A.G., Tchertanov L. // Drug Resist Updat. 2010. V. 13. № 4–5. P. 139–150.
15. De Clercq E. // Curr. Opin. Pharmacol. 2010. V. 10. № 5. P. 507–515.
16. Al-Mawsawi L.Q., Al-Safi R.I., Neamati N. // Expert Opin. Emerg. Drugs. 2008. V. 13. № 2. P. 213–225.
17. Gatell J.M. // Eur. J. Med. Res. 2009. V. 14. P. 30–35.
18. Serrao E., Odde S., Ramkumar K., Neamati N. // Retrovirology. 2009. V. 6. № 25.
19. Приказчикова Т.А., Сычева А.М., Агапкина Ю.Ю., Александров Д.А., Готтих М.Б. // Успехи химии. 2008. Т. 77. № 5. С. 445–459.
20. Агапкина Ю.Ю., Приказчикова Т.А., Смолов М.А., Готтих М.Б. // Усп. биол. хим. 2005. Т. 45. С. 87–122.
21. Delelis O., Carayon K., Saïb A., Deprez E., Mouscadet J.-F. // Retrovirology. 2008. V. 5. P. 114.
22. Poeschla E.M. // Cell Mol. Life Sci. 2008. V. 65. № 9. P. 1403–1424.
23. Zheng R., Jenkins T.M., Craigie R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. № 24. P. 13659–13664.
24. Gallay P., Hope T., Chin D., Trono D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 94. P. 9825–9830.
25. Podtelezhnikov A.A., Gao K., Bushman F.D., McCammon J.A. // Biopolymers. 2003. V. 68. № 1. P. 110–120.
26. Wielens J., Crosby I.T., Chalmers D.K. // J. Comput. Aided Mol. Des. 2005. V. 19. № 5. P. 301–317.
27. Ren G., Gao K., Bushman F.D., Yeager M. // J. Mol. Biol. 2007. V. 366. № 1. P. 286–294.
28. Hare S., Gupta S.S., Valkov E., Engelman A., Cherepanov P. // Nature. 2010. V. 464. № 7286. P. 232–236.
29. Delelis O., Carayon K., Guiot E., Leh H., Tauc P., Brochon J.C., Mouscadet J.-F., Deprez E. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. № 41. P. 27838–27849.
30. Княжанская Е.С., Смолов М.А., Кондрашина О.В., Готтих М.Б. // Acta Naturae. 2009. Т. 1. № 2 (2). С. 88–91.
31. Sinha S., Pursley M.H., Grandgenett D.P. // J. Virol. 2002. V. 76. P. 3105–3113.
32. van Maele B., Debyser Z. // AIDS Rev. 2005. V. 7. P. 26–43.
33. Yu F., Jones G.S., Hung M., Wagner A.H., MacArthur H.L., Liu X., Leavitt S., McDermott M.J., Tsiang M. // Biochemistry. 2007. V. 46. № 10. P. 2899–2908.
34. 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.
35. Hazuda D.J., Anthony N.J., Gomez R.P., Jolly S.M., Wai J.S., Zhuang L., Fisher T.E., Embrey M., Guare J.P. Jr., Egbertson M.S., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. № 31. P. 11233–11238.

36. Summa V., Petrocchi A., Matassa V.G., Gardelli C., Muraglia E., Rowley M., Paz O.G., Laufer R., Monteagudo E., Pace P. // *J. Med. Chem.* 2006. V. 49. № 23. P. 6646–6649.
37. Guare J.P., Wai J.S., Gomez R.P., Anthony N.J., Jolly S.M., Cortes A.R., Vacca J.P., Felock P.J., Stillmock K.A., Schleif W.A., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006. V. 16. № 11. P. 2900–2904.
38. Espeseth A.S., Felock P., Wolfe A., Witmer M., Grobler J., Anthony N., Egbertson M., Melamed J.Y., Young S., Hamill T., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 21. P. 11244–11249.
39. Goldgur Y., Craigie R., Cohen G.H., Fujiwara T., Yoshinaga T., Fujishita T., Sugimoto H., Endo T., Murai H., Davies D.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 23. P. 13040–13043.
40. Grobler J.A., Stillmock K., Hu B., Witmer M., Felock P., Espeseth A.S., Wolfe A., Egbertson M., Bourgeois M., Jeffrey Melamed J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 10. P. 6661–6666.
41. Marchand C., Zhang X., Pais G.C.G., Cowansage K., Neamati N., Burke T.R., Pommier Y. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 12596–12603.
42. Billich A. // *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2003. V. 4. № 2. P. 206–209.
43. Zhuang L., Wai J.S., Embrey M.W., Fisher T.E., Egbertson M.S., Payne L.S., Guare J.P. Jr., Vacca J.P., Hazuda D.J., Felock P.J., et al. // *J. Med. Chem.* 2003. V. 46. № 4. P. 453–456.
44. Cotellet P. // *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery.* 2006. V. 1. P. 1–15.
45. Petrocchi A., Koch U., Matassa V.G., Pacini B., Stillmock K.A., Summa V. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007. V. 17. № 2. P. 350–353.
46. Pace P., Di Francesco M.E., Gardelli C., Harper S., Muraglia E., Nizi E., Orvieto F., Petrocchi A., Poma M., Rowley M., et al. // *J. Med. Chem.* 2007. V. 50. № 9. P. 2225–2239.
47. Gardelli C., Nizi E., Muraglia E., Crescenzi B., Ferrara M., Orvieto F., Pace P., Pescatore G., Poma M., Ferreira Mdel R., et al. // *J. Med. Chem.* 2007. V. 50. № 20. P. 4953–4975.
48. 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.
49. Kassahun K., McIntosh I., Cui D., Hreniuk D., Merschman S., Lasseter K., Azrolan N., Iwamoto M., Wagner J.A., Wenning L.A. // *Drug. Metab. Dispos.* 2007. V. 35. № 9. P. 1657–1663.
50. Iwamoto M., Wenning L.A., Petry A.S., Laethem M., De Smet M., Kost J.T., Merschman S.A., Strohmaier K.M., Ramael S., Lasseter K.C., et al. // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2008. V. 83. № 2. P. 293–299.
51. Markowitz M., Morales-Ramirez J.O., Nguyen B.Y., Kovacs C.M., Steigbigel R.T., Cooper D.A., Liporace R., Schwartz R., Isaacs R., Gilde L.R., et al. // *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2006. V. 43. № 5. P. 509–515.
52. Schafer J.J., Squires K.E. // *Ann. Pharmacother.* 2010. V. 44. № 1. P. 145–156.
53. Ménard A., Solas C., Mokthari S., Bregigeon S., Drogoul M.P., Tamalet C., Lacarelle B., Martin I.P. // *AIDS.* 2009. V. 23. № 7. P. 869–871.
54. Grinsztejn B., Nguyen B.Y., Katlama C., Gatell J.M., Lazzarin A., Vittecoq D., Gonzalez C.J., Chen J., Harvey C.M., Isaacs R.D. // *Lancet.* 2007. V. 369. № 9569. P. 1261–1269.
55. Steigbigel R.T., Cooper D.A., Tepler H., Eron J.J., Gatell J.M., Kumar P.N., Rockstroh J.K., Schechter M., Katlama C., Markowitz M., et al. // *Clin. Infect. Dis.* 2010. V. 50. № 4. P. 605–612.
56. Markowitz M., Nguyen B.Y., Gotuzzo E., Mendo F., Ratanasuwana W., Kovacs C., Prada G., Morales-Ramirez J.O., Crumpton C.S., Isaacs R.D., et al. // *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2007. V. 46. № 2. P. 125–133.
57. Lennox J.L., DeJesus E., Lazzarin A., Pollard R.B., Madruga J.V., Berger D.S., Zhao J., Xu X., Williams-Diaz A., Rodgers A.J., et al. // *Lancet.* 2009. V. 374. № 9692. P. 796–806.
58. Towner W., Klein D., Kerrigan H.L., Follansbee S., Yu K., Horberg M. // *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2009. V. 51. № 4. P. 367–373.
59. FDA notifications. Raltegravir indication extended for treatment-naive patients // *AIDS Alert.* 2009. V. 24. № 8. P. 93.
60. 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.
61. Malet I., Delelis O., Valantin M.A., Montes B., Soulie C., Wiriden M., Tchertanov L., Peytavin G., Reynes J., Mouscadet J.-F., et al. // *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2008. V. 52. № 4. P. 1351–1358.
62. Delelis O., Malet I., Na L., Tchertanov L., Calvez V., Marcelin A.G., Subra F., Deprez E., Mouscadet J.-F. // *Nucleic. Acids Res.* 2009. V. 37. № 4. P. 1193–1201.
63. Wiscount C.M., Williams P.D., Tran L.O., Embrey M.W., Fisher T.E., Sherman V., Homnick C.F., Donnette Staas D., Lyle T.A., Wai J.S., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. V. 18. № 16. P. 4581–4583.
64. Di Francesco M.E., Pace P., Fiore F., Naimo F., Bonelli F., Rowley M., Summa V. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. V. 18. № 8. P. 2709–2713.
65. Wai J.S., Kim B., Fisher T.E., Zhuang L., Embrey M.W., Williams P.D., Staas D.D., Culberson C., Lyle T.A., Vacca J.P., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007. V. 17. № 20. P. 5595–5599.
66. Muraglia E., Kinzel O., Gardelli C., Crescenzi B., Donghi M., Ferrara M., Nizi E., Orvieto F., Pescatore G., Laufer R., et al. // *J. Med. Chem.* 2008. V. 51. № 4. P. 861–874.
67. Jin H., Wright M., Pastor R., Mish M., Metobo S., Jabri S., Lansdown R., Cai R., Pyun P., Tsiang M., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008. V. 18. № 4. P. 1388–1391.
68. Garvey E.P., Johns B.A., Gartland M.J., Foster S.A., Miller W.H., Ferris R.G., Hazen R.J., Underwood M.R., Boros E.E., Thompson J.B., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. V. 52. № 3. P. 901–908.
69. Reddy Y.S., Min S.S., Borland J., Song I., Lin J., Palleja S., Symonds W.T. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007. V. 51. № 12. P. 4284–4289.
70. Min S., Song I., Borland J., Chen S., Lou Y., Fujiwara T., Piscitelli S.C. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. V. 54. № 1. P. 254–258.
71. Vandekerckhove L. // *Curr. Opin. Invest. Drugs.* 2010. V. 11. P. 203–212.
72. Sato M., Motomura T., Aramaki H., Matsuda T., Yamashita M., Ito Y., Kawakami H., Matsuzaki Y., Watanabe W., Yamataka K., et al. // *J. Med. Chem.* 2006. V. 49. № 5. P. 1506–1508.
73. Sato M., Kawakami H., Motomura T., Aramaki H., Matsuda T., Yamashita M., Ito Y., Matsuzaki Y., Yamataka K., Ikeda S., et al. // *J. Med. Chem.* 2009. V. 52. № 15. P. 4869–4882.
74. Correll T., Klibanov O.M. // *Pharmacotherapy.* 2008. V. 28. № 1. P. 90–101.
75. DeJesus E., Berger D., Markowitz M., Cohen C., Hawkins T., Ruane P., Elion R., Farthing C., Zhong L., Cheng A.K., et al. // *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 2006. V. 43. № 1. P. 1–5.
76. Zolopa A.R., Berger D.S., Lampiris H., Zhong L., Chuck S.L., Enejosa J.V., Kearney B.P., Cheng A.K. // *J. Infect. Dis.* 2010. V. 201. № 6. P. 814–822.

77. Cohen C., Elion R., Ruane P., Shamblaw D., DeJesus E., Raschbaum B., Chuck S.L., Yale K., Liu H.C., Warren D.R., et al. // *AIDS*. 2011. V. 25. № 6. P. F7–F12.
78. McColl D.J., Fransen S., Gupta S., Parkin N., Margot N., Chuck S., Cheng A.K., Miller M.D. // *Antivir. Ther.* 2007. V. 12. P. S11–S111.
79. 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.
80. Goethals O., Clayton R., van Ginderen M., Vereycken I., Wagemans E., Geluykens P., Dockx K., Strijbos R., Smits V., Vos A., et al. // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 21. P. 10366–10374.
81. Langley D.R., Samanta H.K., Lin Z., Walker M.A., Krystal M.R., Dicker I.B. // *Biochemistry*. 2008. V. 47. P. 13481–13488.
82. Marinello J., Marchand C., Mott B.T., Bain A., Thomas C.J., Pommier Y. // *Biochemistry*. 2008. V. 47. № 36. P. 9345–9354.
83. Kobayashi M., Nakahara K., Seki T., Miki S., Kawauchi S., Suyama A., Wakasa-Morimoto C., Kodama M., Endoh T., Oosugi E., et al. // *Antiviral Res.* 2008. V. 80. № 2. P. 213–222.
84. Nakahara K., Wakasa-Morimoto C., Kobayashi M., Miki S., Noshi T., Seki T., Kanamori-Koyama M., Kawauchi S., Suyama A., Fujishita T., et al. // *Antiviral Res.* 2009. V. 81. № 2. P. 141–146.
85. an Baelen K., van Eygen V., Rondelez E., Stuyver L.J. // *AIDS*. 2008. V. 22. P. 1877–1880.
86. Bar-Magen T., Donahue D.A., McDonough E.I. // *AIDS*. 2010. V. 24. № 14. P. 2171–2179.
87. Maiga A.I., Malet I., Soulie C., Derache A., Koita V., Amellal B., Tchertanov L., Delelis O., Morand-Joubert L., Mouscadet J.-F., et al. // *Antivir. Ther.* 2009. V. 14. P. 123–129.
88. Sichtig N., Sierra S., Kaiser R., Daumer M., Reuter S., Schalter E., Altmann A., Fatkenheuer G., Dittmer U., Pfister H., et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2009. V. 64. P. 25–32.
89. Mekouar K., Mouscadet J.-F., Desmaële D., Subra F., Leh H., Savoure D., Auclair C., d'Angelo J. // *J. Med. Chem.* 1998. V. 41. P. 2846–2857.
90. Ouali M., Laboulais C., Leh H., Gill D., Desmaele D., Mekouar K., Zouhiri F., d'Angelo J., Auclair C., Mouscadet J.-F., et al. // *J. Med. Chem.* 2000. V. 43. № 10. P. 1949–1957.
91. Zouhiri F., Mouscadet J.-F., Khalid Mekouar K., Desmaële D., Savouré D., Leh H., Subra F., Le Bret M., Auclair C., d'Angelo J. // *J. Med. Chem.* 2000. V. 43. P. 1533–1540.
92. Deprez E., Barbe S., Kolaski M., Leh H., Zouhiri F., Auclair C., Brochon J.-C., Le Bret M., Mouscadet J.-F. // *Mol. Pharmacol.* 2004. V. 65. № 1. P. 85–98.
93. Pannecouque C., Pluymers W., van Maele B., Tetz V., Cherepanov P., De Clercq E., Witvrouw M., Debyser Z. // *Curr. Biol.* 2002. V. 12. № 14. P. 1169–1177.
94. Hombrouck A., Hantson A., van Remoortel B., Michiels M., Vercammen J., Rhodes D., Tetz V., Engelborghs Y., Christ F., Debyser Z., et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2007. V. 59. № 6. P. 1084–1095.
95. Al-Mawsawi L.Q., Neamati N. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2007. V. 28. № 10. P. 526–535.
96. Mazumder A., Wang S., Neamati N., Nicklaus M., Sunder S., Chen J., Milne G.W.A., Rice W.G., Burke T.R. Jr., Pommier Y. // *J. Med. Chem.* 1996. V. 39. P. 2472–2481.
97. Al-Mawsawi L.Q., Fikkert V., Dayam R., Witvrouw M., Burke T.R. Jr., Borchers C.H., Neamati N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 26. P. 10080–10085.
98. De Luca L., Barreca M.L., Ferro S., Christ F., Iraci N., Gitto R., Monforte A.M., Debyser Z., Chimirri A. // *Chem. Med. Chem.* 2009. V. 4. № 8. P. 1311–1316.
99. Al-Mawsawi L.Q., Christ F., Dayam R., Debyser Z., Neamati N. // *FEBS Lett.* 2008. V. 582. № 10. P. 1425–1430.