

УДК 578.282

Терапия ВИЧ-инфекции: методы и перспективы

М. М. Прокофьева*, С. Н. Кочетков, В. С. Прасолов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

*E-mail: m.prokofjeva@gmail.com

Все авторы внесли равный вклад в работу.

Поступила в редакцию 14.04.2016

Принята к печати 14.07.2016

РЕФЕРАТ Вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) является возбудителем одного из самых опасных заболеваний – синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД). За 30 лет, прошедших с момента открытия вируса, разработан ряд препаратов, действие которых направлено на подавление различных стадий жизненного цикла ВИЧ-1. Этот подход позволяет подавить репликацию вируса, что существенно продлевает жизнь ВИЧ-инфицированных. К недостаткам этого метода относится возникновение у вируса устойчивости ко многим препаратам, что требует создания новых лекарственных средств, эффективных против устойчивых форм вируса. В настоящее время изучают возможности таких принципиально новых подходов к терапии СПИД, как использование нейтрализующих антител, редактирование генома и блокирование латентной формы интегрированного провируса. В представленном обзоре рассмотрен традиционный подход с использованием ингибиторов ВИЧ-1, а также перспективы других вариантов терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ВИЧ-1, ингибиторы жизненного цикла вируса, редактирование генома, антивирусная терапия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ОТ – обратная транскриптаза; НИОТ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы; ННИОТ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы; ВААРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия; LTR – длинный концевой повтор.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка подходов к терапии ВИЧ-инфекции представляет одну из наиболее важных задач биомедицинской химии. Применяемые в настоящее время лекарственные препараты направлены на подавление одной из ключевых стадий развития инфекции – первичного контакта вируса с клеткой, проникновения, синтеза ДНК-провируса, его переноса в ядро и интеграцию в геном клетки-хозяина, синтеза и созревания новых вирионов [1]. Высокая изменчивость ВИЧ-1, вызванная тем, что обратная транскриптаза (ОТ) ВИЧ-1 не обладает корректирующей экзонуклеазной активностью, вследствие чего транскрипция всегда происходит с ошибками, приводит к образованию множества мутантных форм вируса, часть из которых лекарственно-устойчивые [2]. Поскольку лекарственно-устойчивые формы вируса постоянно образуются в организме ВИЧ-инфицированных и обнаруживаются, в том числе у так называемых первичных пациентов, ранее не принимавших анти-ВИЧ-препараты, поиск средств, эффективно подавляющих мутантные формы ВИЧ-1, остается актуальным.

ИНГИБИТОРЫ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА

Жизненный цикл ВИЧ-1

Жизненный цикл ВИЧ-1 схематично изображен на *рис. 1А*. Первичный контакт вируса с незараженной клеткой осуществляется за счет неспецифического связывания с гепарансульфатами, расположенными на поверхности клеточной мембраны. После первичного контакта белки оболочки вируса специфически взаимодействуют с поверхностными белками клетки (рецепторами). Рецептором ВИЧ-1 является CD4, T-клеточный рецептор, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов, с которым взаимодействуют гликопротеины оболочки вируса – gp120 и gp41. В качестве корецепторов ВИЧ-1 использует хемокиновые рецепторы CCR5 и CXCR4 [3]. Мутации в гене CCR5 могут существенно влиять на инфекционный процесс. Так, делеция 32 п.н. в кодирующей области гена CCR5 ($\Delta 32$ CCR5) приводит к тому, что в клетке синтезируется укороченная форма CCR5, которая не экспонируется на поверхности клеточной мембраны. Такие клетки устойчивы к штаммам ВИЧ-1, которые в качестве корецептора

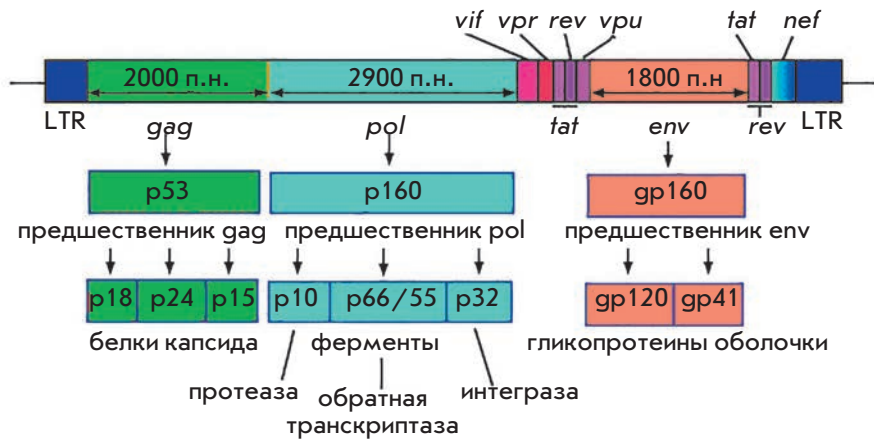
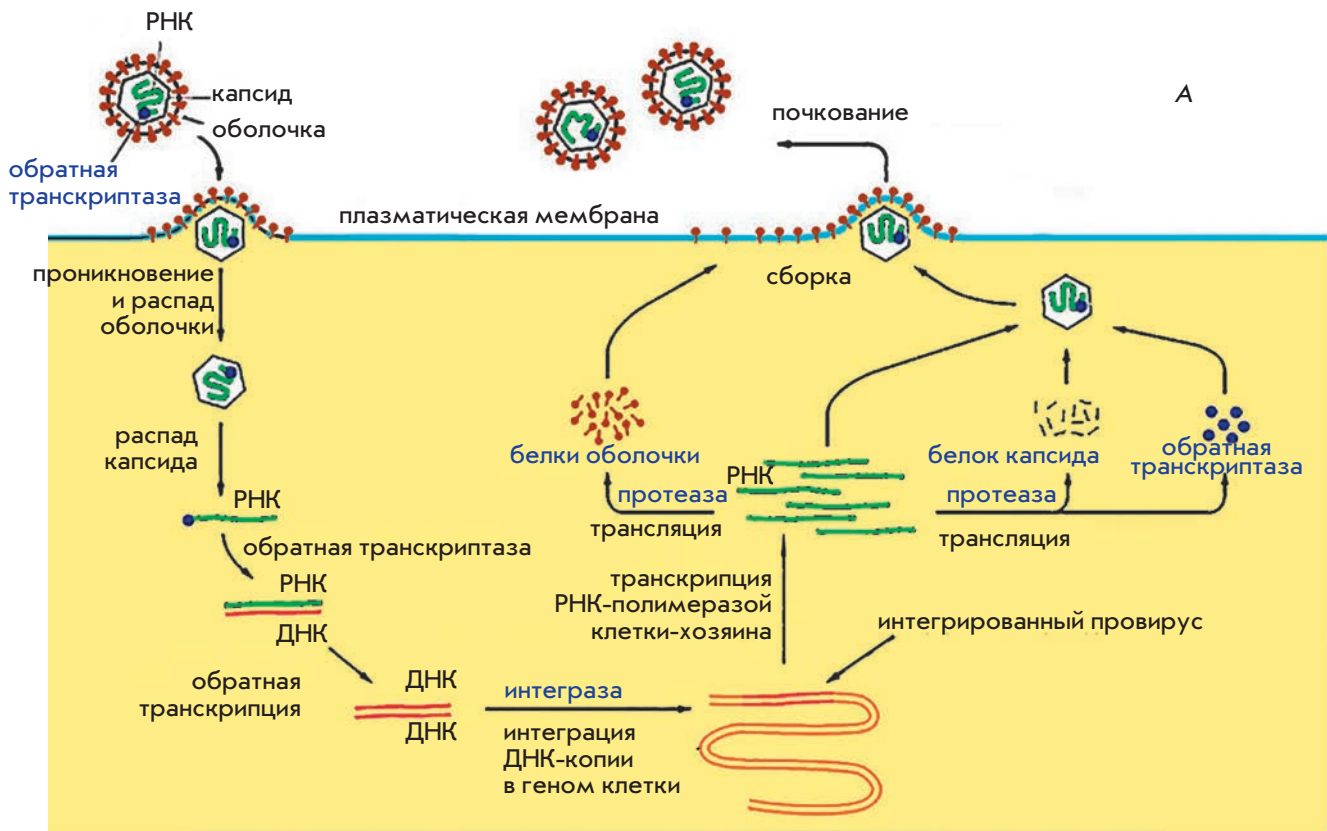


Рис. 1. Жизненный цикл (А) и строение генома ВИЧ-1 (Б)

используют CCR5 (R5-штаммы) [4, 5]. Мутации в гене CXCR4, приводящие к устойчивости клеток к заражению, в настоящее время не обнаружены.

В результате слияния клеточной и вирусной мембраны капсид попадает в цитоплазму и разрушается. За этим следует обратная транскрипция – синтез ДНК-копии на матрице вирусной геномной РНК, которая сопровождается деградацией РНК и синтезом второй цепи ДНК. Все три стадии осуществляет один фермент – РНК-зависимая ДНК-полимераза, вхо-

дящая в состав вирусного нуклеокапсида. Конечный продукт полимеразной реакции – двухцепочечный ДНК-провирус – содержит все вирусные гены и фланкирован длинными 3'- и 5'-концевыми повторами (long terminal repeat, LTR). В состав LTR входят регуляторные элементы, в том числе промотор и энхансеры, выполняющие важные функции в ходе жизненного цикла ретровируса.

ДНК-провирус встраивается в геном зараженной клетки, что необходимо для последующей репли-

кации вирусного генома и постоянной экспрессии в зараженных клетках. В интеграции участвует прединтеграционный комплекс (PIC), состоящий из вирусной интегразы, ОТ и ряда клеточных белков [6]. С момента интеграции встроенный ДНК-провирус ведет себя как часть клеточного генома, являясь самостоятельной транскрипционной единицей. Последующую транскрипцию интегрированного провируса, а также процессинг и сплайсинг новосинтезированной вирусной РНК осуществляют клеточные ферменты. Синтезированная вирусная РНК подвергается альтернативному сплайсингу. С дважды сплайсированной РНК транслируются вспомогательные белки ВИЧ-1 – Tat, Rev, Vpr, Vpr, Vif (рис. 1Б). Со сплайсированной 1 раз РНК синтезируются регуляторный белок Nef и предшественник белка оболочки Env, необходимые на поздних стадиях жизненного цикла вируса. Несплайсированная вирусная РНК включается в капсиды вновь образующихся вирусных частиц, а также служит матрицей для синтеза белков-предшественников Gag и Gag/Pol, кодируемых генами *gag* (структурные белки – матриксный MA (p17), капсидный CA (p24) и нуклеокапсидный NC (p7) и *pol* (вирусные ферменты – обратная транскриптаза (p66/51), интеграза (p32) и протеаза (p10)). Изначально вирус формируется как неинфекционный незрелый вирион, который отпочковывается от мембраны инфицированной клетки. После отпочковывания происходит созревание вируса, в процессе которого белки-предшественники расщепляются вирусной протеазой, а продукты расщепления занимают свое функциональное положение внутри вирусной частицы [7].

Ингибиторы обратной транскриптазы

Большинство используемых лекарственных средств действует на один из ферментов ВИЧ-1: обратную транскриптазу, интегразу или протеазу (табл. 1). Ингибиторы ОТ можно условно разделить на две группы: нуклеозидные и нуклеотидные (НИОТ), и ненуклеозидные (ННИОТ). Аналоги нуклеозидов и нуклеотидов представляют наиболее раннюю группу ингибиторов репликации ВИЧ, одобренных для клинического применения [8] (рис. 2). Эти соединения представляют собой предшественники субстратов фермента, а не активную форму ингибитора. Проникая в клетку, они превращаются (посредством фосфорилирования клеточными киназами) в аналоги нуклеозидтрифосфатов, которые выступают в качестве субстратов при синтезе провирусной кДНК. Встраивание НИОТ в растущую цепь кДНК приводит к терминации обратной транскрипции из-за отсутствия 3'-гидроксильной группы. Таким образом

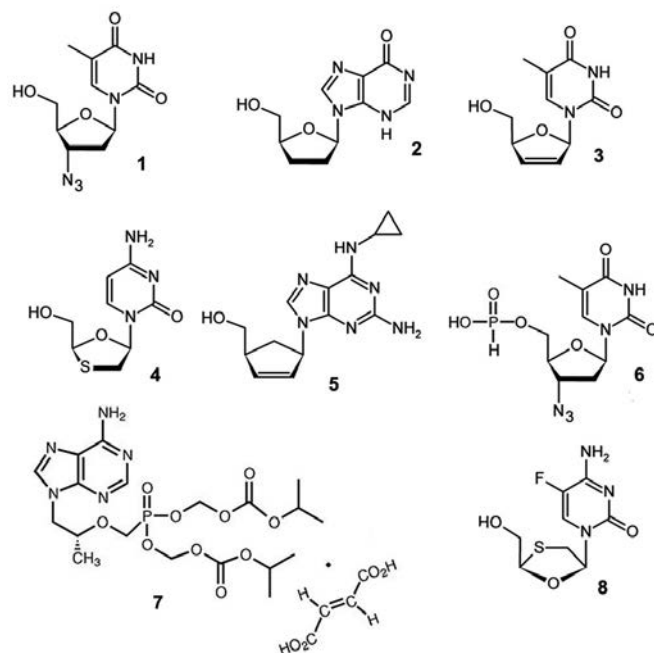


Рис. 2. Нуклеозидные и нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1. Нумерация соответствует табл. 1

НИОТ блокируют репликацию ВИЧ-1 на ранней стадии жизненного цикла [9–11].

Первым ингибитором этого класса был азидотимидин (Зидовудин) (1). Этот препарат был синтезирован в 1964 году и в течение нескольких лет испытывался как экспериментальный клеточный цитотоксин. После клинических испытаний, проведенных в 1985 году, было показано, что он подавляет как инфекционные, так и цитопатические свойства ВИЧ-1 [12]. К 2015 году FDA было одобрено клиническое использование семи препаратов. Один препарат – Никавир (6), созданный академиком А.А. Краевским и сотрудниками в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, разрешен к применению в 1999 году и широко применяется в России и странах СНГ. Каждый из нуклеозидных аналогов специфично конкурирует с одним из клеточных нуклеозидтрифосфатов: AZT, Никавир (6) и ставудин (d4T) (3) – с dTTP, эмтрицитабин (FTC) (8) и ламивудин (3TC) (4) – с dCTP, диданозин (ddI) (2) и тенофовир (TDF) (7) – с dATP, а абакавир (ABC) (5) – с dGTP [13–17].

Некоторые НИОТ обладают высокой стабильностью внутри клетки, что позволяет осуществлять длительное ингибирование вируса [8].

Нуклеотидные ингибиторы, в отличие от нуклеозидных, уже фосфорилированы, и после проникновения в клетку им требуется на одну стадию фосфорилирования меньше. Как и нуклеозидные ингибиторы,

Таблица 1. Анти-ВИЧ-препараты, разрешенные к применению*

Русское название	Латинское название	Коммерческое название	Одобрено FDA
Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ, NRTI)			
Зидовудин (1)	Zidovudine (azidothymidine, AZT, ZDV)	Retrovir	19/03/1987
Диданозин (2)	Didanosine (dideoxyinosine, ddI)	Videx	09/10/1991
	Delayed-release didanosine, enteric-coated didanosine, ddI EC)	Videx EC	31/10/2000
Ставудин (3)	Stavudine (d4T)	Zerit	24/06/1994
Ламивудин (4)	Lamivudine (3TC)	EpiVir	17/11/1995
Абакавир (5)	Abacavir (ABC)	Ziagen	17/12/1998
Фосфазид (6)	Азидотимидин Н-фосфонат	Никавир	05/10/1999**
Тенофовир (7)	Tenofovir disoproxil fumarate (tenofovir DF, TDF)	Viread	26/10/2001
Эмтрицитабин (8)	Emtricitabine (FTC)	Emtriva	02/07/2003
Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ, NNRTI)			
Невирапин** (9)	Nevirapine (NVP)	Viramune	21/06/1996
Невирапин XR*** (10)	Extended-release nevirapine (NVP XR)	Viramune XR	25/03/2011
Делавирдин (11)	Delavirdine (delavirdinemesylate, DLV)	Rescriptor	04/04/1997
Эфавиренз (12)	Efavirenz (EFV)	Sustiva	17/09/1998
Этравирин (13)	Etravirine (ETR)	Intelence	18/01/2008
Рилпивирин (14)	Rilpivirine (RPV)	Edurant	20/05/2011
Ингибиторы протеазы (ИП, PI)			
Саквинавир (15)	Saquinavir (SQV)	Invirase	06/12/1995
Ритонавир (16)	Ritonavir (RTV)	Norvir	01/03/1996
Индинавир (17)	Indinavir (IDV)	Crixivan	13/03/1996
Нелфинавир (18)	Nelfinavir (NFV)	Viracept	14/03/1997
Атазанавир (19)	Atazanavir (ATV)	Reyataz	20/06/2003
Фосампренавир (20)	Fosamprenavir (FOS-APV, FPV)	Lexiva	20/10/2003
Типранавир (21)	Tipranavir (TPV)	Aptivus	22/06/2005
Дарунавир (22)	Darunavir (DRV)	Prezista	23/06/2006
Ингибиторы интегразы (INI)			
Ралтегравир (23)	Raltegravir (RAL)	Isentress	12/10/2007
Долутегравир (24)	Dolutegravir (DTG)	Tivicay	13/08/2013
Элвитегравир (25)	Elvitegravir (EVG)	Vitekta	24/09/2014
Прочие			
Энфувиртид**** (26)	Enfuvirtide (T-20)	Fuzeon	13/03/2003
Маравирук***** (27)	Maraviroc (MVC)	Selzentry	06/08/2007
Кобицистат***** (28)	Cobicistat, Tybost (COBI)	Tybost	24/09/2014

*Порядковые номера соединений соответствуют номерам на рисунках.

**Одобен к применению в Российской Федерации.

***Невирапин с пролонгированным сроком действия.

****Ингибитор слияния.

*****Ингибитор взаимодействия вирус-корцептор.

*****Фармакокинетический усилитель действия атазанавира (19) или дарунавира (22).

нуклеотидные аналоги работают как терминаторы растущей цепи ДНК. Фосфонатная группа, которую они содержат, не может отщепляться клеточными гидролазами, а это значительно затрудняет выщепление встроившихся в растущую цепь ДНК нуклеотидных аналогов 3'-5'-экзонуклеазами по сравнению

с нуклеозидными. Единственный нуклеотидный ингибитор, применяемый в анти-ВИЧ-терапии, – тенофовир (7) [1].

Дизайн и синтез новых нуклеозидных и нуклеотидных аналогов – предмет работы многих исследователей, разрабатывающих препараты против

ВИЧ-1. Новые нуклеозидные аналоги необходимы, потому что в ОТ ВИЧ-1 возникают точечные мутации, сообщающие вирусу лекарственную устойчивость. Клинические исследования показали, что у инфицированных ВИЧ-1, получавших только АЗТ в течение полугода, заметно снижалась чувствительность к препарату [18]. Существуют штаммы вируса, полностью резистентные к действию АЗТ и других нуклеозидных аналогов [19–21].

Известны два варианта механизма, вызывающего устойчивость ОТ к нуклеозидным ингибиторам. Первый – уменьшение сродства к искусственным субстратам относительно природных субстратов. Второй – увеличение уровня фосфоролитического выщепления встроенного в цепь терминатора [22, 23]. ОТ ВИЧ-1 несмотря на то, что не обладает 3'-экзонуклеазной активностью, способна катализировать реакцию пирофосфоролиза, обратную реакции полимеризации [24].

Ненуклеозидные ингибиторы ОТ (рис. 3) – это неконкурентные ингибиторы, которые связываются в так называемом гидрофобном кармане вблизи каталитического центра фермента. В силу своей гидрофобности ННИОТ способны попадать в клетку и не требуют никаких дополнительных реакций [25]. Одобрено клиническое применение пяти препаратов этой группы: невирапина (**10**), делавирдина (**11**), эфавиренза (**12**), этравирина (**13**) и рилпивирина (**14**). Первым препаратом этой группы, утвержденным в качестве лекарственного средства в 1996 году, стал

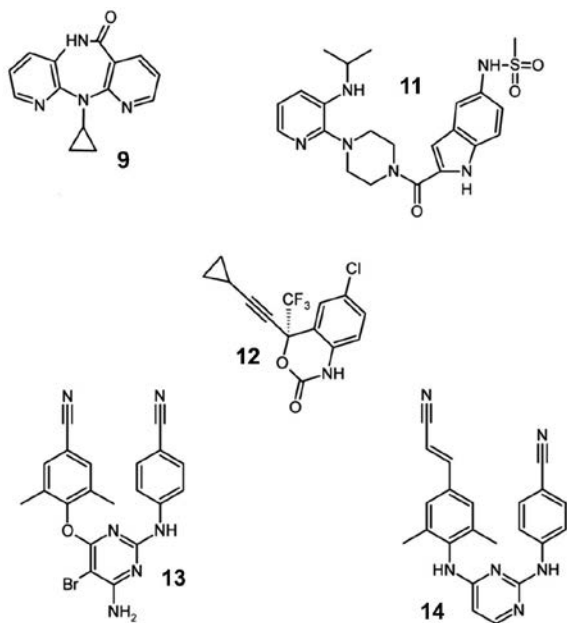


Рис. 3. Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1

невирапин [26]. Сейчас этот препарат редко назначают, поскольку широко распространены мутантные формы ВИЧ-1, устойчивые к действию невирапина. Из препаратов этой группы первичным пациентам в настоящее время наиболее часто назначают эфавиренз [27].

ННИОТ имеют различную химическую структуру, сходно только их действие на фермент. Ингибиторы этой группы специфичны к ОТ ВИЧ-1 и не активны в отношении других ретровирусов.

Изначально полагали, что ННИОТ связываются только с фермент-субстратным комплексом [28]. Позже показали, что ННИОТ связываются с ОТ независимо от субстрата [29, 30], однако некоторые из них обладают повышенным сродством к ферменту в присутствии субстрата [31]. При этом ННИОТ не только не препятствуют связыванию субстрата в активном центре, но даже способствуют ему [32, 33]. Эта особенность позволяет использовать ННИОТ совместно с НИОТ. Показано, что ННИОТ также способны подавлять активность РНКазы Н в составе ОТ [34].

Большинство мутаций, придающих устойчивость к ННИОТ, находятся в сайте связывания ННИОТ. Всего обнаружено более 40 мутаций, которые *in vivo* и *in vitro* делают ОТ устойчивой к ННИОТ. Однако, если такие давно используемые препараты, как невирапин, неэффективны против мутантного фермента, то новые препараты, так называемые ННИОТ второго поколения, этравирин или рилпивирин, обладают достаточной ингибиторной активностью против мутантных форм ОТ [35].

Ингибиторы протеазы ВИЧ-1

Второе место по клиническому использованию после ингибиторов ОТ занимают ингибиторы протеазы (рис. 4). Большинство этих соединений представляют

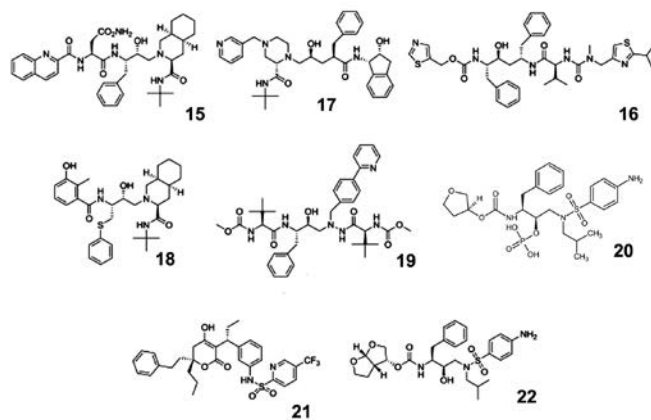


Рис. 4. Ингибиторы протеазы ВИЧ-1

собой пептидомиметики, которые действуют по одному и тому же принципу, связываясь с активным центром фермента. В отличие от природной мишени, ингибиторы не подвержены протеолитическому расщеплению, поскольку вместо пептидных связей $[-NH-CO-]$ содержат гидроксиэтиленовые $[-CH_2-CH(OH)-]$. Связываясь с ферментом в его активном центре, они конкурируют с природными субстратами протеазы и препятствуют ее функционированию, что приводит к резкому снижению протеолитического процессинга вирусных белков [36–38]. Первым из ингибиторов этой группы стал саквинавир (15) [39]. В настоящее время используются восемь ингибиторов протеазы, это самая многочисленная группа одобренных ингибиторов ВИЧ-1 (15–22). Механизм, вызывающий устойчивость ВИЧ-1 к действию ингибиторов протеазы, заключается в замене аминокислотного остатка в вирусной протеазе, что приводит к снижению сродства к ингибитору, в то время как природные субстраты продолжают взаимодействовать с лекарственно-устойчивой протеазой [40]. Изменение сродства к природным субстратам также ухудшает эффективность самой протеазы. Как следствие, в лекарственно-устойчивых формах вируса возникают компенсаторные мутации, направленные на реорганизацию эффективности фермента, не влияющие непосредственно на устойчивость к ингибитору [41].

Ингибиторы интегразы ВИЧ-1

Активная разработка ингибиторов этой группы началась с 2000 года, когда было показано, что дикетонные органические кислоты, например препарат L-731,988, ингибируют интеграцию и репликацию ВИЧ-1 в культуре клеток, в частности, стадию встраивания ДНК-провируса в клеточную геномную ДНК [42]. Это стало первым указанием на то, что ингибиторы интегразы могут стать потенциальными противовирусными препаратами. Первым ингибитором интегразы, одобренным в 2007 году в качестве лекарственного средства, был ралтегравир (Isentress®) (23). Ралтегравир показал очень высокую эффективность и быстро стал одним из самых часто используемых препаратов [43–45]. Сейчас используются три препарата этой группы: ралтегравир, долутегравир (24) и элвитегравир (25) (рис. 5), которые связываются с комплексом интеграции и препятствуют встраиванию ДНК-провируса в геномную ДНК.

Ингибиторы проникновения вируса в клетку

Помимо ингибиторов ферментов ВИЧ-1, разрабатываются ингибиторы, действующие на других стадиях жизненного цикла вируса. Ингибиторы проникновения вируса в клетку, применяемые

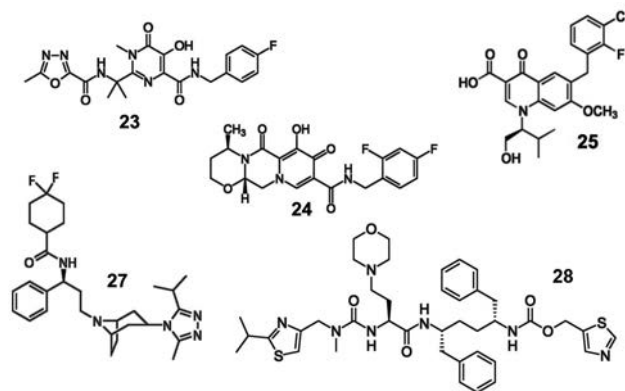


Рис. 5. Прочие ингибиторы жизненного цикла ВИЧ

при ВИЧ-инфекции, можно разделить на два вида: ингибиторы слияния мембран вируса и клетки и ингибиторы связывания белков оболочки вируса с рецепторами.

В настоящее время известен только один ингибитор слияния, одобренный в качестве лекарственного средства – энфувиртид (Fuzeon®) (26) (рис. 6). Это синтетический полипептид, состоящий из 36 аминокислотных остатков, последовательность которых гомологична участку трансмембранного гликопротеина оболочки ВИЧ-1 gp41, состоящему из гептадных повторов, потому энфувиртид способен с ним взаимодействовать [46, 47]. Вследствие этого взаимодействия изменяется конформация gp41, что предотвращает слияние вируса с клеткой. Энфувиртид – единственный синтетический полимер из всех одобренных препаратов против ВИЧ-1, что обуславливает его высокую стоимость. Энфувиртид выпускается в виде инъекционной формы, он вводится дважды в день, что затрудняет его использование.

Ингибиторы связывания белков оболочки ВИЧ-1 с рецепторами должны взаимодействовать с одним из корецепторов, CCR5 или CXCR4, с которыми взаимодействует частица ВИЧ-1 при контакте с клеткой. В настоящее время эта группа представлена только препаратом маравирик (Selzentry®) (27) (рис. 5), который взаимодействует с корецептором CCR5 [48]. Разрабатываются и другие ингибиторы этой группы. Главный недостаток ингибиторов CCR5 – неспособность воздействовать на X4-штаммы ВИЧ-1, которые используют корецептор CXCR4 [1].

В качестве потенциальных антивирусных препаратов рассматриваются полисахариды из морских водорослей, а также производные хитозана. Эти соединения, действующие на стадии проникновения вируса в клетку, показали свою эффективность против

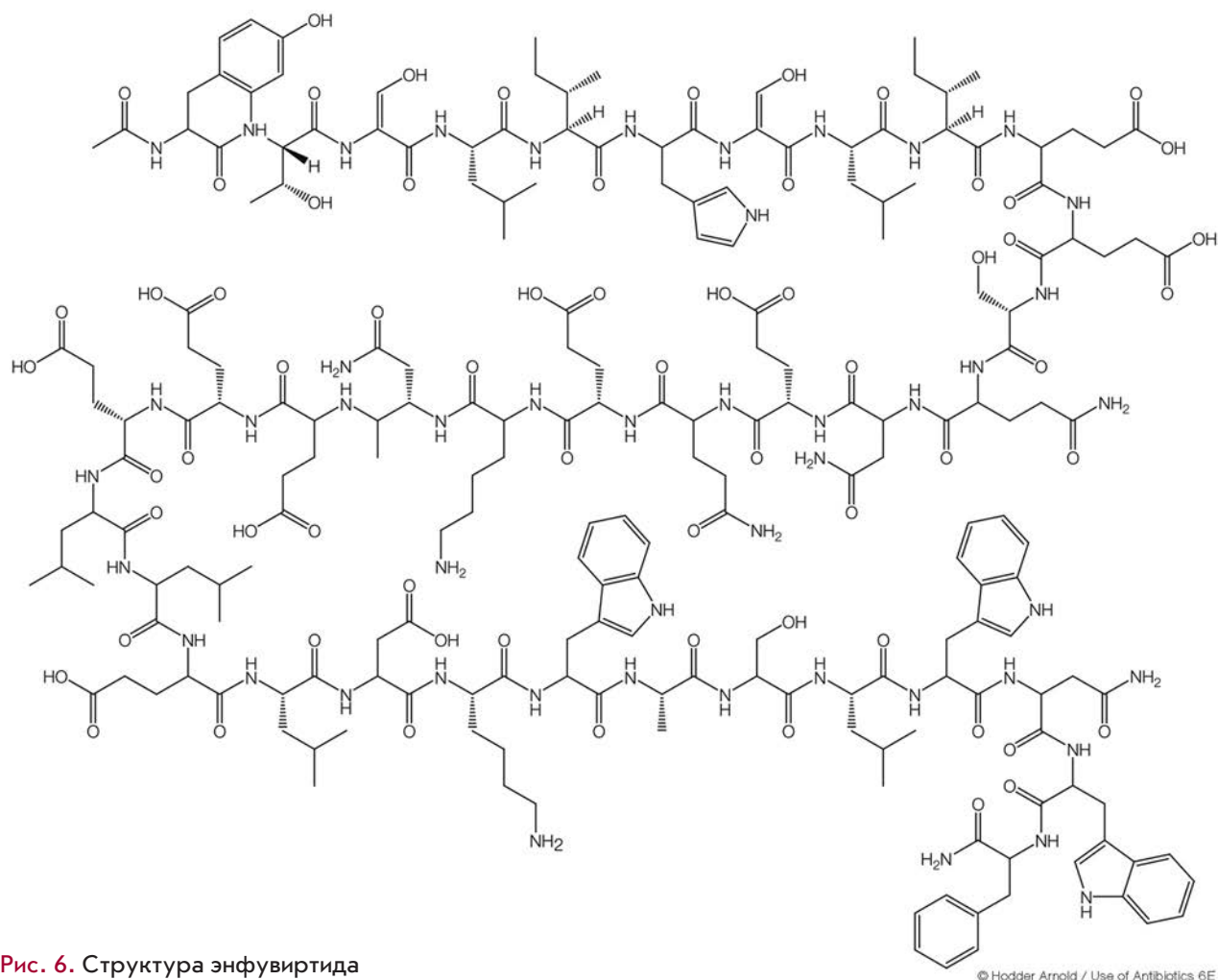


Рис. 6. Структура энфувиртида

ВИЧ-1 и других ретровирусов *in vitro*, но они не приняты в настоящее время в качестве лекарственных средств, поскольку не обладают гомогенным составом и четко определяемой структурой [49]. Сульфатированные полисахариды по своей структуре близки к гепарансульфатам – первичным неспецифическим клеточным рецепторам, с которыми взаимодействует ВИЧ-1. Предположительно, они связываются с белком оболочки ВИЧ-1 и препятствуют его взаимодействию с рецепторами на поверхности клетки. Как правило, полисахариды с высокой молекулярной массой и степенью сульфатирования обладают более выраженной противовирусной активностью [50].

К клиническому применению разрешен еще один препарат – кобицистат (28). В отличие от перечисленных выше соединений, кобицистат не является ингибитором какой-либо стадии жизненного цикла ВИЧ-1. Кобицистат действует как фармакокинетический усилитель (энхансер) действия атазанавира или да-

рунавира, он используется в качестве добавки к коктейлям, применяемым в терапии ВИЧ-инфекции.

Высокоактивная антиретровирусная терапия

В терапии ВИЧ-инфекции обычно используют сочетание разных групп ингибиторов. Сначала это были нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы в сочетании с нуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы и ингибиторами протеазы. Этот метод получил название высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ). Комбинация трех или более ингибиторов позволяет снизить дозу каждого из них, увеличивает эффективность благодаря одновременному воздействию на несколько стадий жизненного цикла ВИЧ-1 и уменьшает вероятность возникновения новых форм вируса с лекарственной устойчивостью. Применение в коктейле двух типов ингибиторов одного фермента – ОТ – объясняется направленностью этих ингибиторов на разные функциональные участки фермента, что предопределя-

Таблица 2. Комбинации препаратов (коктейли), применяемые в комплексной терапии ВИЧ-инфекции

Состав	Коммерческое название	Одобрено FDA
Ламивудин/Зидовудин (3TC / ZDV)	Combivir	27/9/1997
Абакавир/Ламивудин/ Зидовудин (ABC / 3TC / ZDV)	Trizivir	14/11/ 2000
Абакавир/Ламивудин (ABC/3TC)	Epzicom	2/8/2004
Эмтрицитабин / Тенофовир (FTC / TDF)	Truvada	2/8/2004
Эфавиренз/Эмтрицитабин/Тенофовир (EFV / FTC / TDF)	Atripla	12/6/2006
Эмтрицитабин/Рилпивирин/Тенофовир (FTC / RPV / TDF)	Complera	10/8/2011
Элвитеграви́р/Кобицистат/Эмтрицитабин/Тенофовир (QUAD, EVG / COBI / FTC / TDF)	Stribild	27/8/2012
Абакавир/Долутеграви́р/ Ламивудин (ABC/DTG/3TC)	Triumeq	22/8/ 2014
Атазана́вир/Кобицистат (ATV / COBI)	Evotaz	29/1/2015
Даруна́вир/Кобицистат (DRV / COBI)	Prezcobix	29/1/2015
Элвитеграви́р/Кобицистат/Эмтрицита́бин/Тенофови́р алафена́мид (EVG / COBI / FTC / TAF)	Genvoya	5/11/2015

ет усиленное блокирование его функции. В табл. 2 приведены разрешенные коктейли анти-ВИЧ-препаратов, применяемых при ВААРТ.

ДРУГИЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

За последние 25 лет внимание исследователей было сосредоточено в основном на развитии и оптимизации препаратов, направленных на подавление репликации ВИЧ-1. Применяемая антивирусная терапия, в том числе ВААРТ, имеет свои ограничения. Пациенты вынуждены принимать препараты в течение всей жизни, при этом появляются новые мутантные формы вируса, обладающие устойчивостью к широкому спектру лекарственных препаратов. При длительной терапии возможно развитие накопительного токсического эффекта применяемых препаратов. Многие специалисты сходятся во мнении, что нужен новый подход, при котором постоянной ремиссии можно добиться при более щадящем вмешательстве. Кроме того, ингибиторы жизненного цикла подавляют ВИЧ-1 только в клетках, в которых происходит активное размножение вируса, но они не действуют на вирус, находящийся в латентном состоянии. Копии вирусного генома встраиваются в геном Т-клеток памяти (CD4+ Т-клетки) и остаются невидимыми для иммунной системы [51, 52]. Индукция транскрипции в таких клетках приводит к образованию инфекционных вирусных частиц [53].

В качестве альтернативного варианта рассматривается создание вакцины против ВИЧ-1. Первая вакцина была разработана в начале 2000-х, однако, эффект вакцинации был намного ниже эффекта классических анти-ВИЧ-препаратов [54, 55]. В настоящее время проводятся клинические испытания активности так называемых нейтрализующих антител

широкого спектра. Результаты предварительных исследований позволяют предположить, что нейтрализующие антитела могут стать перспективным анти-ВИЧ-препаратом [56, 57].

В настоящее время изучается возможность воздействия на вирус, находящийся в латентном состоянии. Существуют два варианта стратегии, названные стерилизующим и функциональным лечением. Под стерилизующим лечением понимается полное очищение организма от вирусного генома путем уничтожения клеток, несущих интегрированный в их геном провирус; под функциональным – полное подавление активности вируса в организме, включающее блокирование реактивации провируса, находящегося в латентном состоянии.

Один из вариантов стерилизующей терапии – пересадка костного мозга от доноров, устойчивых к ВИЧ-инфекции (например, несущих в своем геноме мутантный ген одного из корецепторов ВИЧ-1, Δ32 CCR5). В 2009 году показали, что таким методом можно полностью излечить человека от ВИЧ-инфекции, т.е. удалить из организма все копии вирусного генома. Этот случай получил название «берлинский пациент» [58]. Пациент прошел радиационную терапию и пересадку костного мозга от донора с Δ32 CCR5, в дальнейшем после отмены анти-ВИЧ-терапии вирус в его организме не обнаруживался. Вначале этот случай вызвал большой оптимизм у медиков, однако к настоящему времени есть примеры, когда данный подход не оказал ожидаемого эффекта, потому поиски других методов терапии продолжаются.

Выведение провируса из латентного состояния

Один из вариантов стерилизующей терапии – «включение» провирусов, находящихся в латентном

состоянии. Лекарственные препараты, способные выводить провирус из латентного состояния, теоретически могут последовательно индуцировать транскрипцию генома ВИЧ-1, синтез вирусных белков и появление инфекционных частиц ВИЧ-1, что приведет к гибели инфицированной клетки и уменьшит количество копий латентной формы ВИЧ-1 в геноме человека. Этот подход получил название «shock and kill». Предполагается, что клетки, несущие копии вирусного генома, либо погибнут в результате цитопатического действия вируса, либо будут уничтожены в результате действия иммунной системы. При использовании этого подхода необходима поддерживающая терапия ингибиторами ВИЧ-1, чтобы предотвратить распространение реактивированного вируса.

В качестве возможных препаратов изучали вориностат – ингибитор гистондеацетилазы, используемый в терапии опухолей [59]. На клетках, полученных от больных, и в дальнейших клинических испытаниях показано, что ингибитор может индуцировать транскрипцию вирусных генов у части пациентов. В то же время вориностат обладает цитотоксичностью, а поскольку он эффективен не во всех случаях, то широкое клиническое применение этого препарата в настоящее время проблематично. Проводятся клинические испытания и других ингибиторов гистондеацетилазы [60, 61].

Этот подход имеет не менее двух недостатков. Первый – возможность побочных эффектов в виде неспецифической индукции транскрипции генов хозяйской клетки. Второй – невозможно предсказать, погибнут ли все клетки с индуцированным провирусом. Есть данные, что иммунная система распознает не все подобные клетки [62]. Для развития этого подхода необходимо дополнительно разработать метод эффективного уничтожения клеток, несущих в себе активированный провирус.

Параллельно с изучением возможности «стерилизации» организма от всех копий провируса ведутся работы по поиску функционального лечения, не требующего полного удаления всех копий вирусного генома, но эффективно подавляющего его потенциальную активность, чтобы не требовалось постоянно применять ингибиторы жизненного цикла ВИЧ-1.

Ингибирование транскрипции интегрированного провируса

Одной из возможных терапевтических мишеней является белок Tat ВИЧ-1 и комплекс Tat/TAR/P-TEFb. Tat – один из регуляторных белков ВИЧ-1, активатор транскрипции. Tat связывается с так называемой областью TAR – участком длиной 60 нуклеотидов, расположенным на 5'-конце растущей цепи РНК, при транскрипции, не влияя на инициа-

цию транскрипции, но увеличивая процессивность РНК-полимеразы и тем самым многократно усиливая транскрипцию. Киназа P-TEFb, третий компонент комплекса, также может служить мишенью для терапии. Ингибирование формирования и активности этого комплекса будет приводить к снижению уровня транскрипции и препятствовать реактивации провируса [63, 64]. В настоящее время разрабатываются низкомолекулярные ингибиторы, действующие либо на белок Tat, либо на TAR. Для подбора потенциальных низкомолекулярных ингибиторов используется метод компьютерного моделирования.

Последовательность TAR высококонсервативна среди штаммов ВИЧ-1, потому можно подобрать универсальные препараты, взаимодействующие с TAR. Эффективными блокаторами Tat-зависимой транскрипции являются хинолоны [65, 66]. В настоящее время установлен молекулярный механизм связывания с мишенью только некоторых соединений, показавших ингибиторную активность. Например, 6-аминохинолон WM5 блокирует взаимодействие Tat и TAR, специфически связываясь с TAR. В то же время некоторые производные хинолонов ингибируют Tat-зависимую транскрипцию, но при этом не выявлено их взаимодействия с комплексом TAR/Tat [67].

Существует ряд низкомолекулярных соединений, взаимодействующих с белком Tat и блокирующим его связывание с TAR. Эти препараты еще не используются в анти-ВИЧ-терапии. В настоящее время один из них, блокатор Tat триптолид, проходит клинические испытания. Триптолид – природное соединение, выделенное из растения *Tripterygium wilfordii*. Показано, что триптолид способствует быстрой деградации Tat в клетках, препятствуя таким образом Tat-зависимой транскрипции [68].

Редактирование генома

Совершенно новый вариант анти-ВИЧ-1-терапии – генная терапия, включающая редактирование интегрированного провируса с блокированием его дальнейшего функционирования. В 2013 году метод CRISPR/Cas9 использовали на модельных клетках линий HEK293 и HeLa, несущих в геноме экспрессирующую кассету, содержащую ген, кодирующий GFP, и последовательность, кодирующую белок Tat ВИЧ-1, под контролем LTR ВИЧ-1. Показано, что в результате активности системы CRISPR/Cas9, направленной на редактирование последовательности LTR, в клетках линии HEK293 снижается уровень экспрессии GFP. Аналогичные результаты получены и на модельных клетках линии Jurkat, несущих имитацию латентной формы провируса в геноме, что указывает на возможность использования

системы CRISPR/Cas9 для предотвращения реакции латентной формы провируса.

В этой работе показано, что последовательность TAR может использоваться в качестве мишени для редактирования генома системой CRISPR/Cas9 [69]. Другой вероятной мишенью является корцептор ВИЧ-1 CCR5 [70–72].

Однако перед применением этой системы в клинической практике необходимо разработать эффективную систему доставки, а также провести серию доклинических испытаний. Можно утверждать, что этот метод обладает большим потенциалом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антивирусная терапия с использованием ингибиторов ВИЧ-1 остается в настоящее время единственным активно применяемым методом. Использование

в рамках ВААРТ комбинации препаратов, действие которых направлено на подавление разных стадий жизненного цикла ВИЧ-1, позволяет минимизировать недостатки этого подхода, поскольку при ВААРТ снижена вероятность селективного отбора лекарственно-устойчивых форм вируса и требуются меньшие дозы всех препаратов, что уменьшает возможность развития накопительного токсического эффекта. Разрабатываемые новые варианты терапии нуждаются в дальнейшем изучении и проведении клинических испытаний, однако они представляются перспективными для использования в будущем. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных
исследований (грант № 16-34-00989 мол_a).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- De Clercq E. // Rev. Med. Virol. 2009. V. 19. P. 287–299.
- Roberts J.D., Bebenek K., Kunkel T.A. // Science. 1988. V. 242. № 4882. P. 1171–1173.
- Clapham P.R., McKnight A. // Br. Med. Bull. 2001. V. 58. P. 43–59.
- Benkirane M., Jin D.Y., Chun R.F., Koup R.A., Jeang K.T. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 30603–30606.
- Wilkinson D.A., Operskalski E.A., Busch M.P., Mosley J.W., Koup R.A. // J. Infect. Dis. 1998. V. 178. P. 1163–1166.
- Depienne C., Mousnier A., Leh H., Le Rouzic E., Dormont D., Benichou S., Dargemont C. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 18102–18107.
- Ganser-Pornillos B.K., Yeager M., Sundquist W. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2008. V. 18. P. 203–217.
- Cihlar T., Ray A.S. // Antiviral Res. 2010. V. 85. P. 39–58.
- Lavie A., Schlichting I., Vetter I.R., Konrad M., Reinstein J., Goody R.S. // Nat. Med. 1997. V. 3. P. 922–924.
- Lavie A., Vetter I.R., Konrad M., Goody R.S., Reinstein J., Schlichting I. // Nat. Struct. Biol. 1997. V. 4. P. 601–604.
- Schneider B., Xu Y. W., Sellam O., Sarfati R., Janin J., Veron M., Deville-Bonne D. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 19. P. 11491–11497.
- Nakashima H., Matsui T., Harada S., Kobayashi N., Matsuda A., Ueda T., Yamamoto N. // Antimicrob. Agents Chemother. 1986. V. 30. № 6. P. 933–937.
- Doong S.L., Tsai C.H., Schinazi R.F., Liotta D.C., Cheng Y.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 19. P. 8495–8499.
- Furman P.A., Davis M., Liotta D.C., Paff M., Frick L.W., Nelson D.J., Dornsife R.E., Wurster J.A., Wilson L.J., Fyfe J.A., et al. // Antimicrob. Agents Chemother. 1992. V. 36. № 12. P. 2686–2692.
- Hoong L.K., Strange L.E., Liotta D.C., Koszalka G.W., Burns C.L., Schinazi R.F. // J. Org. Chem. 1992. V. 57. P. 5563–5565.
- Schinazi R.F., McMillan A., Cannon D., Mathis R., Lloyd R.M., Peck A., Sommadossi J.P., St Clair M., Wilson J., Furman P.A., et al. // Antimicrob. Agents Chemother. 1992. V. 36. № 11. P. 2423–2431.
- Schinazi R.F., Boudinot F.D., Ibrahim S.S., Manning C., McClure H.M., Liotta D.C. // Antimicrob. Agents Chemother. 1992. V. 36. P. 2432–2438.
- Hooker D.J., Tachedjian G., Solomon A.E., Gurusinge A.D., Land S., Birch C., Anderson J.L., Roy B.M., Arnold E., Deacon N.J. // J. Virol. 1996. V. 70. № 11. P. 8010–8018.
- Cruchaga C., Anso E., Rouzaut A., Martinez-Irujo J.J. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 38. P. 27744–27752.
- Coffin J.M. // Science. 1995. V. 267. № 5197. P. 483–489.
- Larder B.A., Darby G., Richman D.D. // Science. 1989. V. 243. № 4899. P. 1731–1734.
- Goldschmidt V., Marquet R. // Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2004. V. 36. № 9. P. 1687–1705.
- Deval J., Courcambeck J., Selmi B., Boretto J., Canard B. // Curr. Drug Metab. 2004. V. 5. № 4. P. 305–316.
- Naeger L.K., Margot N.A., Miller M.D. // Antimicrob. Agents Chemother. 2002. V. 46. № 7. P. 2179–2184.
- de Béthune M. // Antiviral Res. 2010. V. 85. P. 75–90.
- 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.
- De Clercq E. // Chem. Biodivers. 2004. V. 1. № 1. P. 44–64.
- Debyser Z., Pauwels R., Andries K., Desmyter J., Kukla M., Janssen P.A., De Clercq E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 4. P. 1451–1455.
- Althaus I.W., Chou J.J., Gonzales A.J., Deibel M.R., Chou K.C., Kezdy F.J., Romero D.L., Palmer J.R., Thomas R.C., Aristoff P.A., et al. // Biochemistry. 1993. V. 32. № 26. P. 6548–6554.
- Ren J., Milton J., Weaver K.L., Short S.A., Stuart D.I., Stammers D.K. // Structure. 2000. V. 8. № 10. P. 1089–1094.
- Fletcher R.S., Syed K., Mithani S., Dmitrienko G.I., Parniak M.A. // Biochemistry. 1995. V. 34. № 13. P. 4346–4353.
- Rittinger K., Divita G., Goody R.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. № 17. P. 8046–8049.
- Zhou Z., Madrid M., Evanseck J.D., Madura J.D. // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. № 49. P. 17253–17260.
- Hang J.Q., Li Y., Yang Y., Cammack N., Mirzadegan T., Klumpp K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. V. 352. № 2. P. 341–350.
- Janssen P.A.J., Lewi P.J., Arnold E., Daeyaert F., de Jonge M., Heeres J., Koymans L., Vinkers M., Guillemont J., Pasquier E., et al. // J. Med. Chem. 2005. V. 48. № 6. P. 1901–1909.

36. Madruga J.V., Cahn P., Grinsztejn B., Haubrich R., Lalezari J., Mills A., Pialoux G., Wilkin T., Peeters M., Vingerhoets J., et al. // *Lancet*. 2007. V. 370. № 9581. P. 29–38.
37. Lazzarin A., Campbell T., Clotet B., Johnson M., Katlama C., Moll A., Towner W., Trottier B., Peeters M., Vingerhoets J., et al. // *Lancet*. 2007. V. 370. № 9581. P. 39–48.
38. Pauwels R. // *Antiviral Res.* 2006. V. 71. № 2–3. P. 77–89.
39. Roberts N.A., Martin J.A., Kinchington D., Broadhurst A.V., Craig J.C., Duncan I.B., Galpin S.A., Handa B.K., Kay J., Kröhn A., et al. // *Science*. 1990. V. 248. № 4953. P. 358–361.
40. Clavel F., Hance A.J. // *N. Engl. J. Med.* 2004. V. 350. № 10. P. 1023–1035.
41. Wensing A.M.J., van Maarseveen N.M., Nijhuis M. // *Antiviral Res.* 2010. V. 85. P. 59–74.
42. 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.
43. 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., et al. // *Lancet*. 2007. V. 369. № 9569. P. 1261–1269.
44. Steigbigel R.T., Cooper D.A., Kumar P.N., Eron J.E., Schechter M., Markowitz M., Loutfy M.R., Lennox J.L., Gatell J.M., Rockstroh J.K., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 359. № 4. P. 339–354.
45. 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.
46. Matthews T., Salgo M., Greenberg M., Chung J., DeMasi R., Bolognesi D. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004. V. 3. № 3. P. 215–225.
47. Wild C., Greenwell T., Matthews T. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 1993. V. 9. № 11. P. 1051–1053.
48. Perros M. // *Adv. Antiviral Drug Design.* 2007. V. 5. P. 185–212.
49. Baba M., Snoeck R., Pauwels R., De Clercq E. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988. V. 32. № 11. P. 1742–1745.
50. Prokofjeva M.M., Imbs T.I., Shevchenko N.M., Spirin P.V., Horn S., Fehse B., Zvyagintseva T.N., Prassolov V.S. // *Marine Drugs.* 2013. V. 11. № 8. P. 3000–3014.
51. Siliciano J.D., Kajdas J., Finzi D., Quinn T.C., Chadwick K., Margolick J.B., Kovacs C., Gange S.J., Siliciano R.F. // *Nat. Med.* 2003. V. 9. P. 727–728.
52. Adams M., Sharmeen L., Kimpton J., Romeo J.M., Garcia J.V., Peterlin B.M., Groudine M., Emerman M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. № 9. P. 3862–3866.
53. Chun T.W., Stuyver L., Mizell S.B., Ehler L.A., Mican J.A., Baseler M., Lloyd A.L., Nowak M.A., Fauci A.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 24. P. 13193–13197.
54. Autran B., Carcelain G., Combadiere B., Debre P. // *Science.* 2004. V. 305. № 5681. P. 205–208.
55. Carcelain G., Autran B. // *Immunol Rev.* 2013. V. 254. № 1. P. 355–371.
56. Shingai M., Donau O.K., Plishka R.J., Buckler-White A., Mascola J.R., Nabel G.J., Nason M.C., Montefiori D., Moldt B., Pognard P., et al. // *J. Exp. Med.* 2014. V. 211. № 10. P. 2061–2074.
57. Caskey M., Klein F., Lorenzi J.C., Seaman M.S., West A.P. Jr., Buckley N., Kremer G., Nogueira L., Braunschweig M., Scheid J.F., et al. // *Nature.* 2015. V. 522. № 7557. P. 487–491.
58. Hutter G., Nowak D., Mossner M., Ganepola S., Mussig A., Allers K., Schneider T., Hofmann J., Kücherer C., Blau O., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2009. V. 360. № 7. P. 692–698.
59. Archin N.M., Liberty A.L., Kashuba A.D., Choudhary S.K., Kuruc J.D., Crooks A.M., Parker D.C., Anderson E.M., Kearney M.F., Strain M.C., et al. // *Nature.* 2012. V. 487. P. 482–485.
60. Rasmussen T.A., Tolstrup M., Brinkmann C.R., Olesen R., Erikstrup C., Solomon A., Winckelmann A., Palmer S., Dinarello C., Buzon M., et al. // *Lancet HIV.* 2014. V. 1. № 1. P. e13–21.
61. Sogaard O.S., Graversen M.E., Leth S., Olesen R., Brinkmann C.R., Nissen S.K., Kjaer A.S., Schleimann M.H., Denton P.W., Hey-Cunningham W.J., et al. // *PLoS Pathog.* 2015. V. 11. № 9. P. e1005142.
62. Shan L., Deng K., Shroff N.S., Durand C.M., Rabi S.A., Yang H.C., Zhang H., Margolick J.B., Blankson J.N., Siliciano R.F. // *Immunity.* 2012. V. 36. № 3. P. 491–501.
63. Jones L.E., Perelson A.S. // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2007. V. 45. № 5. P. 483–493.
64. Sklar P.A., Ward D.J., Baker R.K., Wood K.C., Gafoor Z., Alzola C.F., Moorman A.C., Holmberg S.D. // *AIDS.* 2002. V. 16. № 15. P. 2035–2041.
65. Cecchetti V., Parolin C., Moro S., Pecere T., Filipponi E., Calistri A., Tabarrini O., Gatto B., Palumbo M., Fravolini A., et al. // *J. Med. Chem.* 2000. V. 43. № 20. P. 3799–3802.
66. Parolin C., Gatto B., Del Vecchio C., Pecere T., Tramontano E., Cecchetti V., Fravolini A., Masiero S., Palumbo M., Palu G. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003. V. 47. № 3. P. 889–896.
67. Tabarrini O., Stevens M., Cecchetti V., Sabatini S., Dell’Uomo M., Manfroni G., Palumbo M., Pannecouque C., De Clercq E., Fravolini A. // *J. Med. Chem.* 2004. V. 47. № 22. P. 5567–5578.
68. Richter S.N., Palu G. // *Curr. Med. Chem.* 2006. V. 13. № 11. P. 1305–1315.
69. Ebina H., Misawa N., Kanemura Y., Koyanagi Y. // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. P. 2510.
70. Tebas P., Stein D., Tang W.W., Frank I., Wang S.Q., Lee G., Spratt S.K., Surosky R.T., Giedlin M.A., Nichol G., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2014. V. 370. № 10. P. 901–910.
71. Cho S.W., Kim S., Kim J.M., Kim J.S. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 3. P. 230–232.
72. Wang W., Ye C., Liu J., Zhang D., Kimata J.T., Zhou P. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 12. P. e115987.