

УДК 577.113.3

Памяти Александра Антоновича Краевского посвящается

АНТИ-ВИЧ НУКЛЕОЗИДНЫЕ ПРЕПАРАТЫ: ИСТОРИЯ СОЗДАНИЯ И ВЗГЛЯД В БУДУЩЕЕ

© 2012 г. М. К. Куханова*

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию и принята к печати 13.06.2012 г.

В обзоре рассматриваются данные по созданию анти-ВИЧ препаратов на основе нуклеозидных аналогов. За 25 лет для лечения ВИЧ-инфицированных пациентов утверждено около 30 препаратов, семь из них представляют собой аналоги нуклеозидов – это ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ. В клинике их применяют в виде комбинации с ненуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы и ингибиторами других ферментов вируса, интегразы и протеазы. Обсуждаются причины токсичности современных препаратов и возможность получения безопасных анти-ВИЧ лекарственных средств путем создания их депо-форм. Рассмотрены отечественные разработки по анти-ВИЧ препаратам и перспективы развития анти-ВИЧ исследований.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека, нуклеозидные препараты, токсичность, механизм действия, фосфазад.

ANTI-HIV NUCLEOSIDE DRUGS: RETROSPECTIVE VIEW AT FUTURE, by M. K. Kukhanova* (Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; *e-mail: kukhan86@hotmail.com). This review provides data on the design of antiretroviral drugs based on nucleoside analogs. About 30 drugs were approved for the treatment of HIV-infected patients over 25 years. Seven nucleoside drugs are inhibitors of HIV reverse transcriptase and clinically used in combination with inhibitors of other viral enzymes, integrase and protease, and non-nucleoside inhibitors of reverse transcriptase. Toxicity of nucleoside drugs and approaches to obtaining of safe anti-HIV drugs are discussed. The results of developing of domestic anti-HIV drugs are presented. The future prospects of anti-HIV investigations are considered.

Keywords: HIV, nucleoside drugs, toxicity, mechanism of action, phosphazide.

Обзор посвящен памяти Александра Антоновича Краевского (1932–1999 гг.) – крупного ученого, академика РАН, бесконечно преданного науке, неординарного и обаятельного человека. С 1966 г. по 1999 г. А.А. Краевский работал в Институте молекулярной биологии РАН, был заведующим лабораторией, заместителем и исполняющим обязанности директора Института. Последние годы жизни, с 1985 г. по 1999 г., А.А. Краевский посвятил созданию анти-ВИЧ агентов на основе аналогов нуклеозидов и нуклеотидов. В 90-е годы, в период развала страны и науки, А.А. Краевским была решена задача научно-производственного цикла: от фундаментальных исследований по поиску анти-ВИЧ-соединений, разработки и технологических схем синтеза активных субстан-

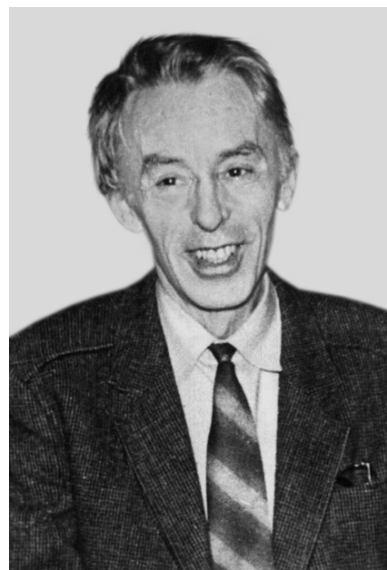
ций, комплекса доклинических и клинических исследований до внедрения отечественного препарата для терапии СПИД в клиническую практику России. За разработку стратегии получения ингибиторов ВИЧ и создание фосфазида, первого российского лекарственного препарата для лечения ВИЧ-инфицированных, А.А. Краевский был удостоен Государственной премии. В представленном обзоре будут рассмотрены работы, которые были выполнены под руководством А.А. Краевского, а также мировые достижения в области анти-ВИЧ-терапии за последующий период, включая разработки сотрудников созданной им лаборатории. С момента открытия в 1983 году нового лимфотропного ретровируса человека (HTLV-III/HIV-1), названного позже вирусом

Принятые сокращения: ABC – абакавир; AZT – 2',3'-дидезокси-3'-азидотимидин; ddI – 2',3'-дидезоксиинозин; d4T – 2',3'-дидезокси-2',3'-дидегидротимидин; FTC – β-L-2'3'-дидезокси-3'-тиа-5-фторцитидин; H-pAZT – H-фосфонат AZT (фосфазад); TDF – тенофовирдизопроксил; 3TC – β-L-2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин; ВИЧ-ОТ – обратная транскриптаза ВИЧ.

* Эл. почта: kukhan86@hotmail.com

иммунодефицита человека (ВИЧ) [1], прошло почти 30 лет, но СПИД, вызываемый ВИЧ, до сих пор остается мировой проблемой и одной из главных причин смертности людей в возрасте от 25 до 44 лет. По оценкам Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), около 35 млн. человек инфицированы ВИЧ, из них 2.3 млн. — дети. К 2010 году от СПИДа умерло более 23 млн. человек.

Через год после того как стало понятно, что СПИД — это следствие инфицирования ВИЧ, д-р Митсуя (Н. Mitsuya), работавший в лаборатории Бродера (S. Broder), показал, что 2',3'-дидезокси-3'-азидотимидин (AZT) подавляет репликацию вируса в культуре клеток [2]. Это открытие стало определяющим фактором для дальнейших исследований. Стало понятно, что репликацию ВИЧ можно контролировать [3]. После клинических испытаний AZT стал первым нуклеозидным анти-ВИЧ препаратом (выпускается под торговой маркой Ретровир® или Зидовудин®), одобренным в 1987 г. для терапии ВИЧ-инфицированных пациентов. За прошедшие десятилетия накопился огромный материал по созданию анти-ВИЧ препаратов, основными мишенями которых стали ферменты вируса, участвующие в его репликации: обратная транскриптаза (ВИЧ-ОТ), протеаза и интегразы. В первые годы после утверждения AZT в качестве анти-ВИЧ-препарата лечение больных проводили в форме монотерапии. Однако вскоре стало очевидным, что через 6–8 месяцев лечения вирус становится резистентным к препарату вследствие появления мутаций в ВИЧ-ОТ и болезнь становится неконтролируемой [4, 5]. Мутации в ВИЧ-ОТ возникают по ряду причин: во-первых, этот фермент не имеет экзонуклеазной активности, которая в случае неправильно включенного нуклеотида удаляла бы его с 3'-конца ДНК-транскрипта, — и это приводит к появлению мутаций в самом ферменте вблизи сайта связывания нуклеотидов (K65R, LL74V, Y115E, M184V/I и Q151M). Так, в случае мутации M184V возникают стерические препятствия для связывания анти-ВИЧ-препаратов 3ТС или FTC с активным центром ВИЧ-ОТ [5]. Мутации D67N, M41L, L210W, T215Y/F и K219Q/E/N/R в ВИЧ-ОТ вблизи места связывания нуклеотидного остатка более эффективно катализируют реакцию АТР-или РР-зависимого пирофосфоролита и способствуют удалению нуклеотидных аналогов с 3'-конца растущей цепи вирусной ДНК. После этого синтез вирусной ДНК возобновляется, что проявляется как резистентность вируса к аналогам нуклеозидов [6]. Второй тип мутаций возникает при дезаминировании остатков аденозина (замена GA) в вирусном геноме клеточной ДНК-дезаминазой [7]. Резистентность вируса при лечении нуклеозидными препаратами может возникать также из-за пониженного уровня лекарственного препарата в плазме крови, что способствует ви-



А.А. Краевский (1932–1999 гг.).

русной репликации и создает основу для появления новых мутаций. Быстрое появление резистентных штаммов вируса при монотерапии привело к необходимости поиска других классов ингибиторов ВИЧ-ОТ, а также новых вирусных и клеточных мишеней. За 25 лет с момента введения AZT в клиническую практику для лечения ВИЧ-инфицированных людей одобрено около 30 препаратов, направленных на подавление основных ферментов вируса (ВИЧ-ОТ, протеазы, интегразы) и на блокирование стадии проникновения вируса в клетку. Среди ингибиторов ВИЧ-ОТ семь представляют собой нуклеозидные аналоги: AZT (1987 г.), ddI (1991 г.), ddC (1991 г.), d4T (1994 г.), 3ТС (1995 г.), ABC (1998 г.), FTC (2003 г.), — один фосфонатный ациклический аналог аденозина, TFV (2001 г.), и четыре ненуклеозидных ингибитора: вирамун (1996 г.), делавирдин (1997 г.), эфавиренц (1998 г.) и этравирин (2008 г.). В настоящее время ddC не применяется в клинике в связи с его высокой токсичностью, обусловленной нарушением функции митохондрий [8]. Структурные формулы нуклеозидных препаратов приведены на рис. 1.

Одновременно велись поиски соединений, которые ингибируют протеазу, интегразу или блокируют проникновение вируса в клетку. После официального одобрения для клинического применения ряда анти-ВИЧ-препаратов стали применять комбинированную терапию, так называемый “коктейль”, в который обычно входят два нуклеозидных препарата и один ненуклеозидный ингибитор ВИЧ-ОТ или ингибиторы протеазы и интегразы (высокоактивная антиретровирусная терапия). Применение “коктейля” произвело революцию в лечении ВИЧ-инфицированных. Ес-

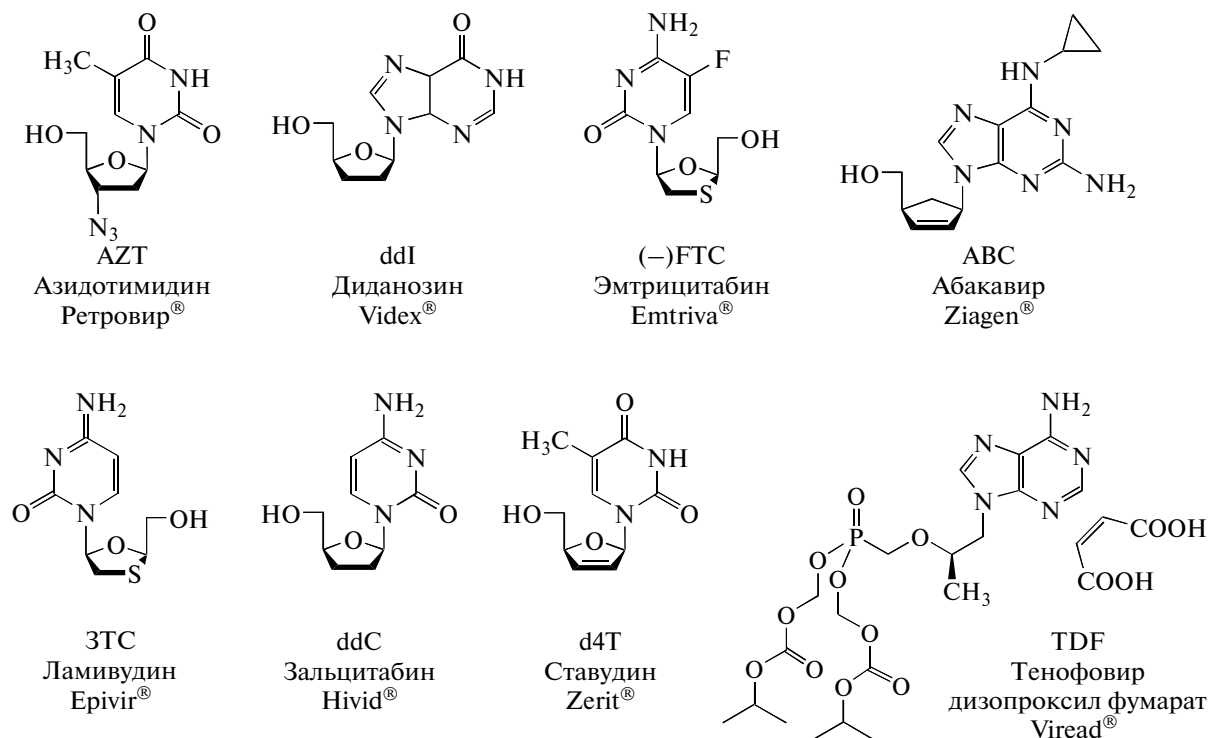


Рис. 1. Структурные формулы нуклеозидных препаратов, одобренных для клинического применения в США.

ли раньше жизнь больных ограничивалась 2–5 годами, то теперь стало возможным продлить полноценную жизнь на 15 и более лет. Эффективное подавление репликации ВИЧ при применении комбинаций нуклеозидных аналогов частично связано с их синергетическими эффектами как с нуклеозидными препаратами, так и с другими классами антиретровирусных препаратов. Благодаря синергизму концентрации активных компонентов можно снизить в несколько раз, что уменьшает их токсические эффекты. Например, добавление ламивудина к “коктейлю”, содержащему AZT и протеазный ингибитор индинавир, увеличивает эффективность препарата в 20 раз.

При этом используется концентрация ламивудина, которая не подавляет репликацию ВИЧ при применении его в моноформе. В отсутствие ламивудина эффект AZT и индинавира на репликацию рассматривается как аддитивный [9]. В таблице 1 приведен утвержденный компонентный состав “коктейлей” для антивирусной терапии.

В следующих разделах рассмотрены механизмы действия нуклеозидных препаратов, причины вызываемых ими побочных токсических эффектов, а также возможные способы улучшения свойств анти-ВИЧ лекарственных средств.

Таблица 1. Состав “коктейлей” для анти-ВИЧ терапии

Название	Состав*	Год начала применения
Двухкомпонентная смесь		
Комбивир (Combivir®)	AZT + 3TC	1997
Калетра (Kaletra®)	LPV + RTV*	2000
Эпзиком/Кивекса (Epzicom®/Kivexa®)	ABC + 3TC	2004
Трувада (Truvada®)	TDF + FTC	2004
Трехкомпонентная смесь		
Тризивир (Trizivir®)	ABC + 3TC + AZT	2000
Атрипла (Atripla®)	TDF + FTC + EFV	2006

* LPV, RTV – лопинавир и ритонавир, ингибиторы протеазы ВИЧ; EFV – ненуклеозидный ингибитор обратной транскриптазы.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ НУКЛЕОЗИДНЫХ ИНГИБИТОРОВ И МЕТАБОЛИЗМ

Нуклеозидные аналоги – это предшественники активных ингибиторов ВИЧ-ОТ и, следовательно, репликации ВИЧ. После проникновения в клетку нуклеозидные аналоги, прежде чем стать ингибиторами ВИЧ-ОТ, проходят три стадии фосфорилирования клеточными нуклеозидфосфотрансферазами. Трифосфаты аналогов нуклеозидов, будучи включены обратной транскриптазой в растущую цепь вирусной ДНК, блокируют ее синтез. Первую стадию фосфорилирования осуществляют цитозольные дезоксицитидинкиназа и тимидинкиназа 1, а также митохондриальные гуанозинкиназа и тимидинкиназа 2 [10–12]. Скорость фосфорилирования зависит от структуры аналога. Первая стадия фосфорилирования AZT, катализируемая тимидинкиназой, проходит с той же скоростью, как и природного тимидина, в то время как скорость присоединения второго фосфатного остатка тимидилаткиназой составляет всего несколько процентов по сравнению с природным нуклеозидом. Для другого анти-ВИЧ препарата – ставудина (d4T) – с низкой эффективностью протекает катализируемая тимидинкиназой стадия синтеза монофосфата. Скорость фосфорилирования аналогов тимидина (AZT и d4T) зависит также от стадии деления клеток. Активность тимидинкиназы в S-фазе существенно выше по сравнению с покоящимися клетками, в то время как скорость фосфорилирования аналогов цитидина (3TC и FTC) цитидинкиназой не зависит от стадии клеточного деления [13]. Монофосфорилирование ddI и ABC осуществляет 5'-нуклеотидаза, используя в качестве донора фосфата IMP и AMP [14]. Присоединение второго фосфатного остатка катализируют тимидилат-, цитидилат- и гуанилаткиназы. Фосфорилирование с образованием трифосфатов аналогов нуклеозидов осуществляют различные

киназы, включая клеточные нуклеозиддифосфаткиназы, фосфоглицераткиназу, пируваткиназу и креатинкиназу [15, 16]. Зависимость фосфорилирования аналогов тимидина от стадии клеточного цикла приводит к неравномерному распределению их трифосфатов внутри клетки во времени. Последняя особенность осложняет подбор режима приема препаратов, так как для эффективного подавления вируса требуется постоянная концентрация ингибиторов в крови.

К важным параметрам, определяющим эффективность нуклеозидных ингибиторов, в том числе их дозировку и частоту приема, относится время жизни аналогов в крови после перорального введения и время жизни их трифосфатов в клетках [17] (табл. 2). В таблице 2 приведены ферменты, участвующие в фосфорилировании аналогов нуклеозидов, а также время жизни препаратов и их трифосфатов соответственно в крови и клетках. Как видно, AZT, ddC и ABC подвергаются быстрому катаболизму и только 2–18% выводятся с мочой в форме исходного препарата, в то время как для остальных аналогов эта величина составляет 60–80%. Важной характеристикой препарата считается время жизни не только самого препарата в организме, но и его трифосфата. Как видно из таблицы, время жизни трифосфатов разных аналогов варьируется в интервале 2–60 ч. Наиболее долгоживущие трифосфаты – это ABC и FTC, что и определяет их широкое применение в составе “коктейлей”. Наиболее хорошо изучен путь катаболизма AZT. Показано, что в печени в результате действия UDP-глюкуронозилтрансферазы до 80% AZT превращается в неактивный по отношению к ВИЧ 5'-О-глюкуронид AZT и выводится с мочой [18, 19]. Другой метаболит AZT, токсичный по отношению к макрофагам, – это 3'-аминотимидин, который образуется в печени в результате взаимодействия AZT с цитохромом P-450 и редуктазами [20]. Короткое время

Таблица 2. Некоторые метаболические характеристики анти-ВИЧ-препаратов*

Препарат	Ферменты фосфорилирования	Время полужизни, ч		Исходный препарат в моче, %
		препарат в плазме	трифосфаты препаратов в клетках РВМС	
AZT	Тимидинкиназа	0.5–3.0	2	14
ddI	IMP-фосфотрансфераза	1.5	24	18
ddC	Дезоксицитидинкиназа	1.0–3.0		80
d4T	Тимидинкиназа I	1.2	7	39
3TC	Дезоксицитидинкиназа	5.0–7.0	22	71
ABC	AMP-фосфотрансфераза	1.45	12–20	1.2
TFV	–	>17	>60	70–80
FTC	Дезоксицитидинкиназа	>10	39	86

* Приведены данные из обзора [17].

жизни препарата приводит к резким перепадам его концентрации в кровяном русле, что способствует выживаемости вируса и появлению резистентных штаммов. Возникает необходимость повышения дозы лекарственного препарата, а это усиливает токсические эффекты. Интенсивному катаболизму подвергается АВС, в результате чего только 1–2% введенного препарата выводится с мочой. В этом процессе участвуют два фермента: алкогольдегидрогеназа, которая окисляет 5'-ОН группу АВС, и UDP-глюкуронозилтрансфераза, образующая 5'-глюкуронид АВС. Аналоги ddI и d4T после попадания в организм подвергаются депуринизации и депириминизации, однако сведений о ферментах, участвующих в этих процессах, мало.

ПОБОЧНЫЕ ТОКСИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НУКЛЕОЗИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Длительное лечение людей с использованием анти-ВИЧ “коктейлей” неизбежно сопровождается появлением побочных токсических эффектов, которые зависят как от природы препарата, так и индивидуальной восприимчивости пациента. Токсичность препаратов проявляется как токсический эпидермальный некролиз (АВС, ddI, AZT), лактоацидоз (d4T, ddI, AZT), подавление функции костного мозга (AZT), периферическая нейропатия (d4T, ddI, ddC), нефротоксическое действие (AZT), миопатия (AZT) и панкреатиты (AZT) [21]. Клиницисты отмечают, что для каждого человека восприимчивость к различным препаратам носит индивидуальный характер. Приблизительно 6–8% пациентов проявляют сверхчувствительность к АВС, причем прослеживается прямая связь между реакцией на АВС и комплексом гистосовместимости класса I (аллель А-В*5701) [22, 23].

В литературе обсуждается несколько причин токсичности нуклеозидных препаратов, основной из которых считается нарушение функций митохондрий [24–26]. Митохондриальная токсичность меняется в широком диапазоне и зависит от структуры препарата. Митохондрии содержат мтДНК, кодирующую синтез 13 полипептидов, которые участвуют в электронном транспорте и в окислительном фосфорилировании. ДНК-полимераза гамма, ответственная за репликацию и репарацию мтДНК, взаимодействует с трифосфатами нуклеозидных препаратов и включает их в растущую цепь ДНК, после чего синтез ДНК прерывается. Уменьшение количества ДНК приводит к нарушению окислительного фосфорилирования, дефициту энергии и накоплению свободных радикалов, что ведет к дисбалансу между активными формами кислорода и ферментами-антиоксидантами и, как следствие, к окислительному стрессу [27]. Окислительный

стресс вызывают не только нуклеозидные препараты. Эфавиренц, нуклеозидный ингибитор ВИЧ-ОТ, увеличивает содержание активных форм кислорода в митохондриях печени с последующим уменьшением количества глутатиона, что приводит к гепатотоксичности. При обработке клеток антиоксидантами “эффект эфавиренца” частично обратим, что свидетельствует об участии в нем активных форм кислорода [28]. В отличие от нуклеозидных ингибиторов, действие которых на клетку заключается в уменьшении белковой массы митохондрий, эфавиренц, наоборот, вызывает увеличение как уровня экспрессии белков, так и митохондриальной массы. Таким образом, механизм действия эфавиренца, вызывающего окислительный стресс, отличается от механизма “задержанной токсичности” с участием ДНК – основной механизм токсичности нуклеозидных препаратов. Накопление активных форм кислорода способствует разрушению мтДНК, окислению лизина, аргинина, гистидина, пролина и треонина, тем самым приводя к изменениям во вторичной и третичной структурах белков и, как следствие, к дисфункции митохондрий. Нарушения в работе митохондрий обуславливают развитие прогрессирующей печеночной и сердечной недостаточности, неврологических нарушений и лактоацидоза – заболевания, приводящего к липодистрофии [29]. Кроме нарушения митохондриальных функций окислительный стресс способствует репликации ВИЧ, стимулируя активность ВИЧ-1 IRES элемента [30].

Клеточная токсичность всех исследованных нуклеозидных препаратов хорошо коррелирует с эффективностью их взаимодействия с мтДНК-полимеразой: ddC > ddA > ddI > d4T ≫ 3ТС > тенофовир > AZT ≫ карбовир. Исключение составляет AZT, проявляющий достаточно высокую токсичность, несмотря на его слабое взаимодействие с мтДНК-полимеразой. Подавление синтеза мтДНК нуклеозидными аналогами определяется не только эффективностью их включения в ДНК, но также возможностью их замещения с помощью 3'-экзонуклеазы мтДНК-полимеразы или АТР- и РР_i-зависимых реакций пиррофосфоролиза. Лим и Копелан (S.E Lim & W.C. Copeland) показали, что AZTMP (монофосфат AZT) практически не удаляется с 3'-конца растущей цепи ДНК ни одной из этих реакций, тем самым блокируя рост цепи мтДНК [31]. Кроме того, AZTMP подавляет экзонуклеазную активность мтДНК-полимеразы, а значит, фермент теряет способность корректировать неправильно включенные нуклеотиды, что приводит к появлению мутаций в мтДНК. В отличие от AZT, остаток 3ТСMP, включенный на 3'-конец мтДНК, эффективно замещается. Эти данные хорошо согласуются с тем фактом, что 3ТС практически не вызывает митохондриальной токсичности. Таким образом, не-

эффективность реакций замещения AZTMP вносит вклад в его токсичность. Предполагается, что кроме взаимодействия с мтДНК-полимеразой нуклеозидные аналоги имеют и другие специфические для разных аналогов мишени. МакКи (E.E. McKee) и др. показали [32], что токсичность AZT может быть результатом подавления тимидин-фосфорилирующих ферментов, а уменьшение пула ТТР в митохондриях замедляет синтез мтДНК. Также показано, что в митохондриях, изолированных из AZT-обработанных клеток печени, существенно подавлена активность цитохром *c*-оксидазы (СОХ) и цитратсинтазы. В результате действия AZT на цитратсинтазу снижается соотношение АТР/АДР и путь синтеза пирувата становится преимущественно анаэробным. Все эти процессы приводят к увеличению концентрации молочной кислоты в организме и, как следствие, к серьезным осложнениям и даже смертельному исходу [33, 34]. Дефицит СОХ вызывает ряд серьезных заболеваний, включая паралич глазных нервов [35]. Показано также, что AZT накапливается в митохондриальном матриксе в концентрациях, в 4 раза более высоких, чем в окружающей среде (до 30–50 мкМ) и подавляет АТР/АДР митохондриальный транслокатор [36]. Причиной нефротоксичности другого нуклеозидного аналога – ddA, который в 1990-х гг. рассматривался в качестве потенциального анти-ВИЧ препарата, оказалась его нестабильность в кислой среде желудка (при pH ≈ 2–3). После перорального приема ddA гидролизует до аденина, затем превращался в плохо растворимый в водной среде 2,8-дигидроксиаденин, который выкристаллизовывается в почках, вызывая тем самым нефротоксичность [37]. Одновременно показали, что метаболизм ddA проходит через стадию его превращения в ddI аденозиндезаминазой. Оказалось, что анти-ВИЧ-активность этих двух соединений одинакова, но ddI гораздо менее токсичен, так как его метаболизм не включает стадию образованию аденина [38, 39]. В результате проведенных исследований в качестве анти-ВИЧ препарата для клинического применения одобрен ddI.

Помимо данных, полученных при изучении побочных эффектов, вызываемых анти-ВИЧ препаратами, с конца 90-х годов стали накапливаться сведения о токсических эффектах самого вируса на митохондрии и другие органеллы клетки. У трансгенных мышей, экспрессирующих регуляторный вирусный белок Tat, AZT вызывал более глубокое поражение печени, костного мозга и тимуса по сравнению с контрольной группой животных [40, 41], получающих только AZT. Это свидетельствует о вкладе самого вируса в клеточную токсичность. При анализе состояния комплекса I в цепи транспорта электронов митохондрий в T-клетках обнаружили, что у ВИЧ-инфи-

цированных пациентов, не принимающих анти-ВИЧ-терапию, активность этого комплекса подавлена [42]. Клиницисты отмечают, что у ВИЧ-инфицированных в стадии прогрессирующего СПИДа происходит нарушение мозговой деятельности, ведущее к развитию умственной отсталости. Такие тяжелые последствия при ВИЧ-инфекции связывают с индуцируемым инфекцией окислительным стрессом в мозге и цереброспинальной жидкости [43], что связано как с антивирусной терапией, так и с действием самого вируса. Подавление ВИЧ в мозге осложняется тем, что AZT и ряд других анти-ВИЧ препаратов с трудом преодолевают гематоэнцефалический барьер, поэтому их реальная концентрация в клетках мозга оказывается слишком низкой для подавления репликации ВИЧ [44]. Таким образом, имеются две точки зрения относительно причин токсичности и клеточной дисфункции, развивающейся в результате ВИЧ-инфекции. С одной стороны, есть убедительные доказательства, что нарушения в функционировании митохондрий и последующие токсические эффекты есть следствием применения анти-ВИЧ препаратов; с другой стороны, сам вирус вызывает существенные повреждения митохондрий и других органелл клетки. Выяснение причин токсичности различных препаратов, а также поиск путей снижения побочных эффектов нуклеозидных ингибиторов ВИЧ должно стать в ближайшем будущем общим делом клиницистов, химиков и фармацевтов.

ДЕПО-ФОРМЫ НУКЛЕОТИДОВ/НУКЛЕОЗИДОВ

Как сказано в предыдущих разделах, к основным недостаткам нуклеозидных анти-ВИЧ препаратов при их длительном применении относится токсичность, которая обуславливает подавление функции костного мозга, развитие миопатии и гепатитов, быстрое появление резистентных штаммов вируса и короткое время жизни препаратов в организме. На протяжении многих лет для улучшения свойства нуклеозидных препаратов применялись многочисленные химические стратегии. С целью снизить токсические эффекты препаратов на основе нуклеозидов, увеличить их оральную биодоступность, улучшить фармакокинетические и другие характеристики были разработаны различные депо-формы нуклеозидов и нуклеотидов. Большинство депо-форм включает модификацию 5'-положения аналогов нуклеозидов/нуклеотидов. Депо-форма сама по себе не активна, но в организме в результате химического или ферментативного гидролиза превращается в антивирусный препарат. Создано огромное количество депо-форм потенциальных нуклеозидных препаратов, которые подавляют репликацию

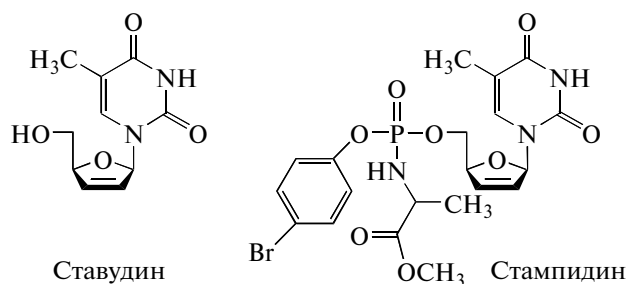


Рис. 2. Структурные формулы ставудина и его депо-формы стамвидина.

ВИЧ, но только одна депо-форма одобрена Управлением по контролю за лекарственными препаратами и пищевыми продуктами США (Food & Drug Administration, FDA) как лекарство — это препарат вирид (Viread[®]) [45], и несколько препаратов находятся на различных стадиях клинических испытаний. На сегодняшний день наиболее перспективной депо-формой считается стамвидин.

Вирид

В 1993 г. был синтезирован новый фосфонатный ациклический аналог аденина 9-(3-фосфонилметоксипропил)аденин (PMPA, тенофовир) — ингибитор репликации вируса герпеса и ВИЧ [46]. К преимуществам фосфонатных аналогов по сравнению с аналогами нуклеотидов относится их химическая и ферментативная стабильность и способность достаточно эффективно проникать в клетки. Кроме того, для активации фосфонатных аналогов не требуется, необходимая для других нуклеозидных аналогов, наиболее медленная первая стадия фосфорилирования. Главный недостаток тенофовира — плохая проникаемость через клеточные мембраны и низкая биодоступность из-за наличия двух зарядов у фосфонатного остатка. Для решения задачи увеличения биодоступности тенофовира развернулись интенсивные поиски его депо-форм, которые привели к созданию анти-ВИЧ-препарата под названием вирид (Viread[®], рис. 1). Если биодоступность тенофовира ограничивается несколькими процентами, то для препарата Viread[®] она составляет 45% [46]. Viread[®] — пока что единственная депо-форма анти-ВИЧ-препарата, одобренная FDA для использования в анти-ВИЧ “коктейле”.

Стамвидин

Перспективной депо-формой анти-ВИЧ-препарата ставудина считается его фосфарильное производное стамвидин (рис. 2), которое сейчас проходит третью стадию клинических исследований [47, 48]. Идея получения стамвидина заклю-

чалась в создании препарата, первая низкоэффективная стадия фосфорилирования которого не зависела бы от клеточной тимидинкиназы. Кроме того, ставудин вызывал кардиотоксичность, периферическую невропатию, нарушение функции почек. Депо-форма ставудина могла бы снизить эти токсические эффекты.

При исследовании на клеточных культурах показано, что по сравнению со ставудином стамвидин эффективнее подавляет репликацию ВИЧ-1 и ВИЧ-2. Кроме того, стамвидин проявляет противовирусную активность в культурах клеток, дефицитных по тимидинкиназе, и в отношении штаммов ВИЧ, резистентных к ставудину. Последнее свойство свидетельствует о том, что в результате внутриклеточного гидролиза образуется 5'-монофосфат ставудина. Стамвидин имеет также улучшенную фармакокинетику по сравнению со ставудином. Как показано при испытаниях на мышах, крысах, собаках и кошках, концентрация активного анти-ВИЧ-компонента в крови животных после введения стамвидина увеличивается в 1000 раз по сравнению с его внутриклеточной концентрацией, необходимой для подавления репликации вируса в культуре клеток [48]. Это свидетельствует о том, что биодоступность препарата стала значительно выше.

Никавир[®] (фосфазид) — первый российский анти-ВИЧ препарат

Через два года после открытия ВИЧ, этиологического фактора СПИДа, и через год после того, как было показано, что AZT подавляет репликацию вируса, в лаборатории под руководством А.А. Краевского стали заниматься созданием антиретровирусных препаратов. А.А. Краевский предложил использовать различные фосфонатные производные AZT, d4T, ddA и другие аналоги нуклеозидов для синтеза потенциальных анти-ВИЧ-агентов. Среди многочисленных синтезированных соединений был и *H*-фосфонат AZT (фосфазид, *H*-pAZT) (рис. 3). Данные, полученные из разных лабораторий относительно анти-ВИЧ-активности фосфазиды в клеточных культурах, были неоднозначны. Результаты исследований, проведенных в лаборатории А.А. Краевского в 1989—1992 г., свидетельствовали о том, что *H*-pAZT проявляет достаточно высокую анти-ВИЧ-активность и низкую токсичность в клеточной культуре МТ-4, его индекс селективности был в 3—4 раза выше, чем у AZT [49—51]. Позднее эти результаты получили подтверждение в лаборатории Г. Гослена (G. Gosselin) на культурах клеток МТ-4, СЕМ-SS и СЕМ X-174 [52], однако рассчитанный ими индекс селективности соединения оказался на порядок ниже, чем у нас. По данным другой лаборатории [53], анти-ВИЧ-активность *H*-pAZT на культуре клеток С8 166 и JM

оказалась в 10–15 раз меньше, чем у AZT. В то же время Мачадо (J. Machado) и др. показали, что для двух штаммов ВИЧ (IIIb и HXB2) на моноядерных клетках пуповинной крови индексы селективности фосфазида от 1.5 до 15 раз выше, чем у AZT [54]. Эти данные свидетельствовали о том, что активность фосфазида как ингибитора ВИЧ зависит от культуры клеток и штамма вируса. Важным моментом для отбора *H*-pAZT как кандидата для дальнейших исследований в качестве анти-ВИЧ-агента стали результаты по селекции резистентных штаммов вируса в клеточной культуре. Оказалось, что устойчивые к фосфазиду варианты ВИЧ развиваются медленнее, чем к AZT [54]. При мутационном анализе четырех резистентных к фосфазиду изолятов ВИЧ выявлена только одна мутация – D67N, которая ответственна также за резистентность вируса к AZT. Других мутаций в резистентных к фосфазиду штаммах за период селекции (84 сут) обнаружено не было, в то время как в штаммах, резистентных к AZT, появилось 4–5 мутаций [54, 55]. На основании этих данных фосфазад был отобран в качестве потенциального анти-ВИЧ-препарата для проведения исследований по биодоступности и фармакокинетике. Но для этого требовались большие количества препарата. В 1992 г. по инициативе А.А. Краевского было создано Закрытое акционерное общество “Производственно-коммерческая Ассоциация AZT”. Цель, которую ставили организаторы “Ассоциации”, – объединить усилия ученых, технологов, клиницистов и производителей для изготовления и внедрения в клиническую практику фармацевтических препаратов, применяемых для терапии ВИЧ-инфекции. В том же году выпустили первую партию отечественного азидотимидина (Тимазид®), применение которого для лечения ВИЧ-инфицированных к тому времени уже было официально одобрено в других странах. Первые опыты, проведенные сотрудниками “Ассоциации” на животных, показали, что после перорального или внутривенного введения фосфазида в крови животных детектируется только AZT – значит фосфазад быстро гидролизует до AZT в крови и/или в желудочно-кишечном тракте [56]. В то же время в лаборатории Г. Госслена показали, что как AZT, так и фосфазад не ингибируют ВИЧ в клетках, дефицитных по тимидинкиназе – ферменту, осуществляющему стадию первого фосфорилирования [52]. Это означало, что фосфазад гидролизует до AZT уже при проникновении через клеточные мембраны и/или в желудочно-кишечном тракте. Таким образом, фосфазад представляет собой не что иное как депо-форму AZT. Других метаболитов фосфазида не обнаружено. В доклинических исследованиях токсикологии и фармакокинетики фосфазида, выполненных в Институте экспериментальной кардиологии, уста-

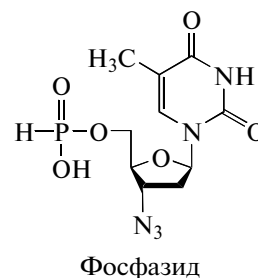


Рис. 3. Структурная формула фосфазида.

новлено [57], что фосфазад относится к препаратам с низкой токсичностью. Так, концентрация фосфазида, при которой у мышей развивается острая токсичность, почти в 4 раз выше, чем соответствующая концентрация AZT (8200–8830 мг/кг против 2380–2730 мг/кг) при внутривенном введении препаратов и в 2 раза выше (2260–2390 мг/кг против 1320–1660 мг/кг) при внутривенном введении. В 1997 г. фосфазад был рекомендован для второй и третьей стадий клинических испытаний, которые проводили в нескольких городах (Санкт-Петербург, Тверь и Тюмень) [58]. Клиницисты отмечали высокую эффективность фосфазида при лечении и его хорошую переносимость пациентами. Лечение фосфазадом в течение двух лет не приводило к появлению резистентных штаммов [59], что согласовывалось с результатами Мачадо и др. [54], полученными на клеточных культурах. Проверка канцерогенных свойств фосфазида показала, что препарат не проявляет мутагенных свойств и не вызывает ни аллергических, ни гематологических эффектов [57]. В 1999 г. Министерство здравоохранения Российской Федерации зарегистрировало фосфазад (под коммерческим названием Никавир®) как лекарственное средство и одобрило для широкого клинического применения на территории Российской Федерации (регистрационный номер 99/358/12).

Следующим этапом стало исследование, которое должно было дать ответ на вопрос: можно ли заменить AZT в составе “коктейля” на фосфазад, – что, безусловно, связано с побочными эффектами AZT, которые соответствуют 2–4-ой степени тяжести и проявляются в форме тошноты, анемии и гранулоцитопении. После изучения в различных комбинациях с другими компонентами антивирусной терапии (диданозин, невирапин, калетра) фосфазад – как замену AZT – рекомендовали к применению для лечения ВИЧ-инфицированных пациентов в составе “коктейля”. В настоящее время препарат Никавир® применяется как в форме монотерапии, так и в комбинации с ламивудином или в трехкомпонентной смеси: никавир + ламивудин + невирапин/калетра [60].

Параллельно изучали возможность применения препарата Никавир® для лечения беременных женщин и профилактики передачи инфекции от матери к ребенку во время беременности, родов и кормления. Фосфазид эффективно проникает через плаценту и его концентрация в пуповине равна концентрации в крови матери. Результаты сравнительного изучения эмбриотоксичности фосфазид и AZT на беременных крысах не дали статистически достоверной разницы между двумя препаратами по таким параметрам, как время созревания плода, число эмбрионов, их размер и масса, гибель плода во время беременности и после рождения. Однако в клинических испытаниях беременные женщины лечение фосфазидом переносили лучше, чем лечение AZT, поэтому Никавир® был рекомендован как лекарственный препарат, предназначенный для предотвращения вертикальной передачи вируса от матери ребенку. Последующий мониторинг новорожденных показал отсутствие вируса в крови детей [57].

С 2000 г., уже без А.А. Краевского, в лаборатории продолжили изучение фосфазид. Цель этих исследований – понять принципы и разработать основу для создания безопасных анти-ВИЧ препаратов. Не прекращался и поиск новых депозитов AZT и ЗТС.

Первые опыты по изучению фосфазид на собаках и кроликах показали, что фармакокинетические параметры AZT, образующегося в организме из фосфазид (обозначим его AZT*), отличаются от таковых после введения животным AZT. Время достижения максимальной концентрации AZT* в крови животных после введения фосфазид было больше, максимальная концентрация AZT* ниже и время выведения препарата в 2–3 раза больше, чем после введения непосредственно AZT.

Прежде всего, хотелось понять, почему время жизни образующегося из фосфазид AZT* больше по сравнению с введением AZT как такового. Возникли два предположения: 1) в организме имеется резервуар, в котором накапливается фосфазид и медленно освобождает AZT*, и 2) фосфазид, с двумя зарядами при фосфонатном остатке, имеет другую скорость проникновения в клетки и всасывания из кишечника, что определяет измененную по сравнению с AZT фармакодинамику. Метаболизм фосфазид в клеточной культуре HL-60 и распределение его и образующихся метаболитов по органам мышцы подробно изучали, используя радиоактивно-меченый фосфазид [^3H -*H*-pAZT]. При внутрижелудочном введении [^3H -*H*-pAZT] мышам радиоактивные продукты быстро распределялись между органами мышцы, включая желудок, кровь и кишечник, причем во всех органах находили только азидотимидин. Небольшое количество

радиоактивности обнаружили в мышцах и селезенке. Существенных различий в распределении радиоактивных продуктов после введения [^3H -*H*-pAZT] и [^3H -AZT] не было [56, 61]. Радиоактивность несколько дольше сохранялась в кишечнике после введения [^3H -*H*-pAZT] по сравнению с [^3H -AZT]. Это означает, что всасывание фосфазид происходит медленнее. Количество неидентифицированных радиоактивных продуктов было несколько больше в печени животных, которым ввели [^3H -AZT] по сравнению с обработанными [^3H -*H*-pAZT]. Таким образом, попытки выявить наличие “особого” резервуара для [^3H -*H*-pAZT] не увенчались успехом [61]. При изучении кинетики накопления фосфазид внутри клеток показано, что скорость накопления радиоактивных продуктов в клетках после введения ^3H -фосфазид в несколько раз ниже по сравнению с ^3H -азидотимидин – и это неудивительно, так как фосфазид более липофильное соединение [61]. Через час после добавления фосфазид к клеточной культуре внутри клеток можно обнаружить лишь несколько процентов фосфазид и его метаболита AZT*. Основным продуктом метаболизма фосфазид оказался азидотимидин-5'-монофосфат: при прохождении через клеточные стенки фосфазид быстро гидролизуется до AZT с последующим фосфорилированием его до AZTMP тимидинкиназой. Ранее выдвинутое Боулом (J.H. Boal) [62] предположение об окислении фосфонатного остатка *H*-pAZT до фосфонатного с образованием AZTMP не подтвердилось.

Подробное изучение фармакокинетики фосфазид при пероральном и внутривенном способе введения собакам и кроликам показало, что в обоих случаях наблюдается быстрое превращение фосфазид в AZT*, причем у обоих типов животных его фармакокинетические параметры отличались от таковых при непосредственном введении AZT. Фармакокинетика фосфазид была более плавная, чем у AZT. Так, в крови собаки максимальная концентрация (C_{\max}) образующегося из фосфазид AZT* была в 5 раз ниже чем для AZT при его прямом введении, а время достижения максимальной концентрации увеличено в 1.5 раза. Время полувыведения и клиренс (очень важные характеристики лекарственного препарата) AZT* из фосфазид были в 1.5 и 3.5 раза больше, чем для AZT. Продолжительное время жизни фосфазид в организме определил измененный по сравнению с AZT режим приема созданного на его основе препарата Никавир® – больные принимают его дважды в день вместо трех раз в случае AZT [57]. Таким образом, антивирусную активность в клеточной культуре можно считать необходимым, но не определяющим фактором перспективности соединений как потенциальных препаратов. Плавная фармакокинетика и дли-

тельное время жизни – важные параметры лекарственного препарата, характеризующие его “безвредность”. Быстрое нарастание концентрации препарата в крови и быстрое ее падение – такие свойства способствуют развитию токсичности и появлению резистентных штаммов вируса.

В ходе работы по созданию анти-ВИЧ препаратов наше внимание привлекли 5'-фосфонаты AZT с замещенным аминокарбонилфосфонильным остатком при NH-группе AZT [63, 64] (рис. 4). При отборе синтезированных соединений для дальнейших исследований мы учитывали не только данные по их антивирусной активности на культурах клеток, но и пласт знаний, полученный при изучении фосфазида. Так, при анализе новых производных AZT как блокаторов ВИЧ-репликации оказалось, что их противовирусная активность на порядок ниже, чем у AZT, в то же время их токсичность – за исключением соединения (2) – также существенно ниже. Дальнейшие исследования показали, что все соединения стабильны в биологических жидкостях (в сыворотке крови человека, в цельной крови), а после перорального введения собакам и кроликам в крови животных обнаружен AZT, т.е. эти соединения генерируют AZT. Наиболее эффективным донором AZT оказалось соединение (1), для которого были определены фармакологические параметры при пероральном и внутривенном введении кроликам и собакам (табл. 3). Как видно из таблицы, проведенная модификация привела к двукратному увеличению временного интервала достижения максимальной концентрации AZT в крови собак по сравнению с AZT как таковым и на один час – по сравнению с фосфазидом, т.е. нарастание AZT в крови собак, получивших соединение (1), более плавное чем у животных, получивших AZT или фосфазид. Время полужизни препарата также увеличилось, а клиренс стал в 6 раз медленнее, чем у AZT.

Исследования, проведенные на кроликах, показали те же закономерности по фармакологическим параметрам. Острая токсичность соединения (1) возникала при более высокой концентрации препарата по сравнению с AZT и

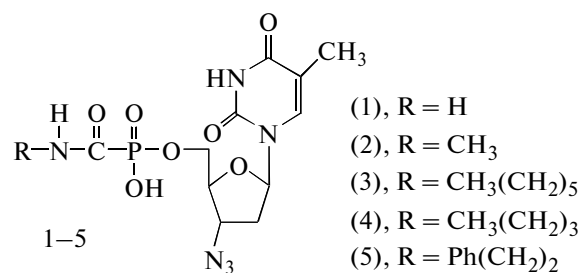


Рис. 4. Структурные формулы аминокарбонилфосфонатов AZT.

фосфазидом – снизилась в 4 и 2.5 раза соответственно (табл. 4). Таким образом, новое производное AZT – фосфонат (1) – превосходит AZT и фосфазид по таким параметрам как токсичность и время жизни в организме. В настоящее время фосфонат (1) проходит первую стадию клинических исследований.

Наряду с поиском анти-ВИЧ-препаратов в лаборатории все больше внимания стало уделяться оппортунистическим инфекциям, практически всегда сопровождающим ВИЧ-инфекцию. К наиболее распространенным ко-инфицирующим агентам относятся вирусы гепатита С и герпеса, а также бактерии *Mycobacterium tuberculosis*. По данным ВОЗ, туберкулезом заболевает ежегодно около 9 млн. человек, из них 10% инфицированы ВИЧ. Заражение ВИЧ повышает также шанс реактивации латентной формы туберкулеза. Риск перехода латентной формы туберкулеза в активную фазу для больных СПИДом достигает 50%. Герпетическая инфекция человека охватывает не менее 70% населения земного шара, а у ВИЧ-инфицированных эта цифра достигает 100%, причем из них около 6–8% заражены вирусом герпеса, резистентного к имеющимся антигерпетическим препаратам. В настоящее время в лаборатории началось создание ингибиторов репликации вируса герпеса и микобактерий туберкулеза на основе нуклеозидов и нуклеотидов. Синтезированный в лаборатории 5'-фосфит антигерпетического препарата ацикловира эффективно подавляет репликацию как вируса герпеса

Таблица 3. Фармакокинетические параметры AZT после однократного перорального введения препарата собакам

Соединение	Фармакологические параметры AZT*					
	C_{\max} , мг/л	T_{\max} , ч	AUC, (мг ч)/л	$T_{1/2}$, ч	MRT, ч	CL, л/ч
1	0.74 ± 0.03	5.0	9.2 ± 0.2	9.6 ± 0.2	13.9 ± 0.2	27.0 ± 2.6
Фосфазид	1.89 ± 0.07	4.0	16.6 ± 0.3	7.2 ± 0.3	10.4 ± 0.5	15.0 ± 0.7
AZT	9.77 ± 0.30	2.5	58.8 ± 1.1	5.2 ± 0.5	7.5 ± 0.4	4.2 ± 0.3

* Все значения рассчитаны как среднее \pm SD на основании 3 независимых экспериментов; C_{\max} – максимальная концентрация AZT* в крови собаки; T_{\max} – время достижения C_{\max} ; AUC – площадь под кривой зависимости концентрации вещества от времени; $T_{1/2}$ – время полужизни вещества в крови; MRT – среднее время жизни вещества в крови; CL – клиренс.

дикого типа, так и ацикловир-резистентных штаммов. Аналогично ацикловиру, *H*-фосфонат ацикловира проявляет синергизм с интерфероном альфа [65]. Первые результаты по созданию противотуберкулезных агентов показали, что производные 2'-дезоксинуридина и 2'-дезоксипиридина с 5-алкилоксиметильными заместителями и 5-(1-алкинил) производные карбоциклического d4-5'-норуридина эффективно подавляют рост микобактерий туберкулеза и их резистентных штаммов, не оказывая при этом токсического действия на клетки.

ПЕРСПЕКТИВЫ И НЕРЕШЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ АНТИ-ВИЧ ТЕРАПИИ

1. Нуклеозидные аналоги, будучи основными компонентами антиретровирусного «коктейля», останутся, по-видимому, таковыми и в ближайшее время. Это связано прежде всего с тем, что они эффективно ингибируют репликацию ВИЧ и проявляют синергизм как с классом нуклеозидных ингибиторов, так и с другими классами анти-ВИЧ препаратов. В настоящее время около десяти нуклеозидных ингибиторов ВИЧ и их депо-форм проходят в США различные стадии клинических исследований и ждут одобрения FDA. Основная задача состоит в понижении токсичности уже одобренных нуклеозидных препаратов путем их модификации – для снижения риска инфарктов, метаболических осложнений, панкреатитов, лимфодистрофии и других. Необходимо более глубокое понимание причин токсичности как анти-ВИЧ препаратов, так и самого вируса, их взаимодействия с митохондриями и другими клеточными мишенями.

2. Создание препаратов, активных против штаммов ВИЧ, резистентных к имеющимся лекарственным препаратам. К решению этой задачи универсальных подходов пока нет, кроме создания новых депо-форм нуклеозидных/нуклеотидных аналогов с улучшенной фармакокинетикой и фармакодинамикой.

3. Поиск новых вирусных и клеточных мишеней для подавления репликации ВИЧ. Только препарат T20, или Fuzeon® (enfuvirtide), одобрен

как ингибитор слияния вируса с клеткой. Специфически связываясь с гликопротеином gp41 ВИЧ-1 вне клетки и ингибируя его структурную реаранжировку, T20 блокирует проникновение вируса внутрь клетки. Еще один препарат, маравирик (maraviroc), действует как антагонист рецептора CCR5, необходимого для проникновения вируса в клетки [66]. Перспективными считаются ингибиторы сборки и созревания вируса. Мишенями для создания ингибиторов могут быть РНазы Н обратной транскриптазы и фактор инфекционности ВИЧ – белок Vif [67]. Спектр ингибиторов интегразы будет расширяться. В настоящее время только два ингибитора интегразы: Raltegravir® (2007 г.) и Elvitegravir® (2011 г.) – применяются в антиретровирусном «коктейле».

4. В отсутствие вакцин против ВИЧ, помимо поиска новых эффективных и малотоксичных лекарств, большое значение имеет создание препаратов, предотвращающих сексуальную передачу ВИЧ и ко-патогенов от человека человеку. В связи с этим во всем мире большое внимание уделяется разработке противовирусных вагинальных микробицидов – средств местного применения, предотвращающих передачу вирусных инфекций половым путем. В состав анти-ВИЧ-микробицида должны входить, во-первых, компоненты, инактивирующие вирус во влагалище, и, во-вторых, не повреждающие здоровую ткань, служащую барьером для проникновения ВИЧ. В настоящее время проводятся испытания микробицидов на основе различных классов соединений – ингибиторов репликации ВИЧ. Клинические испытания микробицида CAPRISA 004, содержащего ациклический нуклеозидный фосфонатный аналог тенофовир, применяемый в терапии ВИЧ-инфицированных пациентов, уменьшает одновременно трансмиссию ВИЧ и вируса герпеса, однако эффективность предотвращения передачи вируса составляет всего 50–60%. Тенофовир® применяют также в виде таблеток как профилактическое средство для предотвращения передачи ВИЧ-инфекции, хотя эффективность его низка. В клинической практике используется и другой нуклеозидный аналог, 5F-L-2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин, также применяемый в терапии ВИЧ.

5. Создание лекарственных препаратов, подавляющих одновременно с ВИЧ другие неизбежно сопровождающие ВИЧ-инфекцию патогены, такие как туберкулез, герпес и гепатит С.

Данный обзор не претендует на изложение всего огромного материала по созданию анти-ВИЧ-препаратов. Десятки лабораторий интенсивно работали над проблемой лечения ВИЧ-инфицированных в течение 30 лет. За последнее время появилось много блестящих обзоров, в которых подробно рассматриваются различные аспекты создания лекарственных препаратов про-

Таблица 4. Токсичность соединений при одноразовом внутривенном введении мышам Balb/c*

Соединение	LD ₁₆	LD ₅₀	LD ₈₄
1	5090	5365	6000
AZT	1300	1500	1700
Фосфазид	2000	2300	2500

* Данные представлены как концентрация препарата (мг/кг веса), вызывающая смертность 16% (LD₁₆), 50% (LD₅₀) и 84% (LD₈₄) мышей.

тив ВИЧ [8, 17, 21, 57, 64, 66]. В связи с 80-летием А.А. Краевского в обзоре нам хотелось вспомнить историю создания первого российского анти-ВИЧ-препарата и показать продолжение работ, начатых А.А. Краевским.

Автор выражает глубокую благодарность генеральному директору ЗАО “Ассоциация АЗТ” А.В. Кононову, внесшему большой вклад в становление препарата Никавир® как анти-ВИЧ-препарата.

Работа поддержана грантами РФФИ 12-04-00581-а, 11-04-12035-офи-м и грантом президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gallo R.C., Salahuddin S.Z., Popovich M., et al. 1984. Frequent detection and isolation of cytoplasmic retroviruses (HTLV-III) from patient with AIDS and risk for AIDS. *Science*. **224**, 500–503.
- Mitsuya H., Weinhold K.J., Furman P.A., St. Clair M.H., Lehrman S.N., Gallo R.C., Bolognesi D., Barry D., Barry D.W., Broder S. 1985. 3'-Azido-3'-azidothymidine, an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **82**, 7096–7100.
- Enimi E.A., Fan H.Y. 1997. Immunological and pharmacological approaches of the control of retroviral infection. In: *Retroviruses*. Eds Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Temesgen Z., Cainelli Poeschla E.M., Vlahakis S.A., Vento S. 2006. Approach to salvage antiretroviral therapy in heavily antiviral-experienced HIV-positive adults. *Lancet Infect.* **6**, 496–507.
- Schinazi R.F., Lloyd Jr. R.M., Nguen M.H., Cannon D.L., McMillan A., Ilksoe N., Chu C.K., Liotta D.C., Bazmi H.Z., Mellors. 1993. Characterization of human immunodeficiency viruses resistant to oxathiolan-cytosine nucleosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 875–881.
- Arion D., Kaushik N., VeCornick., Borkov G., Parniak M.A. 1998. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to AZT: increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. *Biochemistry*. **37**, 1590–15917.
- Mulder L.C., Harari A., Simon V. 2008. Cytidine deamination induced HIV-1 drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 5501–5506.
- De Clercq E. 2010. Antiviral drugs. *Cur. Opin. Pharmacol.* **10**, 507–515.
- Snider S., D'argenio D.Z., Weisloiw O., Bilello J., Drusano G.L. 2000. The triple combination indinavir-zidovudine-lamivudine is highly synergistic. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1051–1058.
- Arner E.S., Eriksson S.E. 1995. Mammalian deoxynucleoside kinases. *Pharmacol. Ther.* **67**, 155–186.
- Furman P.A., Fyve J.A., St. Clair M.H., Weinhold K., Rideout J.L., Freeman C.A., Lehrman S.N., Bolognesi D.P., Broder S., Mitsuya H., et al. 1986. Phosphorylation of AZT and selective interaction of 5'-triphosphates with HIV reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**, 8333–8337.
- Shewach D.S., Liotta D.C., Schinazi R.F. 1993. Affinity of the antiviral enantiomers of oxithiolane cytosine nucleosides for human 2'-deoxycytidine kinase. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 1540–1543.
- Gao W.Y., Shirasaka T., Johns D.G., Broder S., Mitsuya H. 1993. Differential phosphorylation AZT, ddC, and ddI in resting and activated peripheral blood mononuclear cells. *J. Clin. Invest.* **91**, 2326–2333.
- Faletto M.B., Miller W.H., Garvey E.P., StClair M.H., Daluge S.M., Good S.S. 1997. Unique intracellular activation of the potent anti-HIV agent 1592U89. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 1099–1107.
- Bourdais J., Biondi R., Sarfati S., Guerreiro C., Lascu I., Jamin J., Veron M. 1996. Cellular phosphorylation of anti-HIV nucleosides. Role of nucleoside diphosphate kinase. *J. Biol. Chem.* **272**, 7887–7890.
- Krishnan P., Fu Q., Lam W., Liou J.Y., Dutschman G., Cheng Y.C. 2002. Phosphorylation of pyrimidine deoxynucleoside analog diphosphates: selective phosphorylation of L-nucleoside analog diphosphates by 3-phosphoglycerate kinase. *J. Biol. Chem.* **277**, 5453–5459.
- Cihlar T., Ray A.S. 2010. Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors. *Antivir. Res.* **85**, 39–59.
- Resetar A., Spector T. 1989. Glucuronidation of 3'-azido-3'-deoxythymidine: human and rat enzymes specificity. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 1389–1393.
- Blum M.B., Liao S.H.T., Good S.S., De Miranda P. 1988. Pharmacokinetic and bioavailability of zidovudine in humans. *Am. J. Med.* **85**, 189–194.
- Creton E.M., Somadossi J.P. 1993. Reduction of 3'-azido-2',3'-dideoxynucleosides to their 3'-amino metabolite is mediated by cytochrome P-450 and NADH-cytochrome P-450 reductase in rat liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **21**, 946–950.
- Hakins T. 2010. Understanding and managing the adverse effects of antiretroviral therapy. *Antivir. Res.* **85**, 201–209.
- Lucas A., Nolan D., Mallal S. 2007. HLA-B*5701 screening for susceptibility to abacavir hypersensitivity. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 591–593.
- Mallas S., Phillips E., Caros G., Molina J.M., Workman C., Tomazic J., Jagel-Guedes E., Rugina S., Kozyrev O., Cid J.F., Hay P., et al. 2008. HLA-B*5701 screening for hypersensitivity to Abacavir. *N. Eng. J. Med.* **358**, 568–579.
- Brinkman K., Hofstede H.J., Burger D.M., Smeitink J.A., Koopman P.P. 1998. Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS*. **12**, 1735–1744.
- Benbrick E., Chariot P., Bonavaud S., Ammi-Said M., Frisdal E., Rey E., Gherardi R., Barlovatz-Meimon G. 1997. Cellular and mitochondrial toxicity of zidovudine (AZT), didanosine (ddI) and zalcitabine (ddC) on cultured human muscle cells. *J. Neurol. Sci.* **149**, 19–25.
- Chen C.H., Cheng Y.C. 1989. Delayed cytotoxicity and selective loss of mitochondrial DNA in cells treated with the anti-human immunodeficiency virus compound 2',3'-dideoxycytidine. *J. Biol. Chem.* **264**, 11934–11937.

27. Pinti M., Salomoni P., Cossarizza A. 2006. Anti-HIV drugs and the mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1757**, 700–707.
28. Apostolova N., Gomez-Sucerquia L.J., Moran A., Alvarez A., Plas-Garcia A., Esplugues J.V. 2010. Enhance oxidative stress and increased mitochondrial mass during efavirenz-induced apoptosis in human hepatic cell. *British J. Pharmac.* **160**, 2069–2084.
29. Kohler J.J., Hosseini S.H., Lewis W. 2008. Mitochondrial DNA impairment in nucleoside reverse transcriptase inhibitor-associated cardiomyopathy. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 990–996.
30. Gendron K., Ferbeyre G., Heveker N., Brakier-Gingras L. 2011. The activity of the HIV-1 IRES is stimulated by oxidative stress and controlled by a negative regulatory element. *Nucl. Acids Res.* **39**, 902–912.
31. Lim S.E., Copeland W.C. 2001. Differential incorporation and removal of antiviral deoxynucleotides by human DNA polymerase gamma. *J. Biol. Chem.* **276**, 23616–23623.
32. McKee E.E., Bentley A.T., Hatch M., Gingerich J., Susan-Resiga D. 2004. Phosphorylation of thymidine and AZT in heart mitochondria: elucidation of a novel mechanism of AZT toxicity. *Cardiovasc. Toxicol.* **4**, 155–167.
33. Lewis W., Copeland W.C., Day B.J. 2001. Mitochondrial depletion, oxidative stress, and mutation: mechanisms of dysfunction from nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Lab. Invest.* **81**, 777–790.
34. Lewis W., Kohler J.J., Hosseini S.H., Haase C.P., Copeland W.C., Bienstock R.J., Ludaway T., McNaught J., Russ R., Stuart T., Santoianni R. 2006. Antiretroviral nucleosides. Nucleoside carrier and mitochondrial DNA: evidence supporting the DNA pol gamma hypothesis. *AIDS.* **21**, 675–684.
35. Taanman J.W. 1997. Human cytochrome c oxidase: structure, function, and deficiency. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**, 151–163.
36. Barile M., Valenti D., Passarella S. 1997. 3'-Azido-3'-deoxythymidine uptake into isolated rat liver mitochondria and impairment of ADP/ATP translocator. *Biochem. Pharmacol.* **53**, 913–920.
37. Hatch M., Gingerich J., Susan-Resiga D. 1973. Adenine toxicity: a three week intravenous study in dogs. *Acta Pharmacol. Toxic.* **32**, 246–256.
38. Ahluwalia G., Cooney D.A., Mitsuya H., Fridland A., Flora K.P., Hao Z., Dalal M., Broder S., Johns D.G. 1987. Initial studies on the cellular pharmacology of 2',3'-dideoxyinosine, an inhibitor of HIV infectivity. *Biochem. Pharmacol.* **26**, 3797–3800.
39. McLaren C., Detema R., Knupp C.A., Buroker R.A. 1991. Review: didanosine. *Antivir. Chem. Chemother.* **2**, 321–328.
40. Prakash O., Teng S., Ali M., Zhu X.Z., Coleman R., Dadbout R.A., Chambers R., Aw T.Y., Flores S.C., Joshi B.H. 1997. The human immunodeficiency virus type 1 Tat protein potentiates zidovudine-induced cellular toxicity in transgenic mice. *Arch. Biochem. Biophys.* **343**, 173–180.
41. Samuels D.C. 2006. Mitochondrial AZT metabolism. *Life.* **58**, 403–408.
42. Ladha J.S., Tripathy M.K., Mitra D. 2005 Mitochondrial complex I activity is impaired during HIV-1 induced T-cell apoptosis. *Cell Death Differ.* **12**, 1417–1428.
43. Pocernich C.B., Sultana R., Muhmmad-Abdul H., Nath A., Butterfield D.A. 2005. HIV-dementia, Tat-induced oxidative stress, and antioxidant therapeutic consideration. *Brain Res. Rev.* **50**, 14–26.
44. Pardridge W.M. 2003. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol. Interv.* **3**, 90–105.
45. Balzarini J., Holy A., Jindrich J., Naesens L., Snoeck R., Schols D., De Clercq E., 1993. Differential antiherpes and antiretrovirus effects of the (S) and (R) enantiomers of acyclic nucleoside phosphonates: potent and selective *in vitro* and *in vivo* antiretroviral activity of (R)-9-(2-phosphonomethoxypropyl)-2,6-diaminopurine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 332–338.
46. Barditch-Crovo P., Deeks S.G., Collier A., Safrin S., Coakley D.F., Miller M., Kearney B.P., Coleman R.L., Lamy P.D., Kahn J.O., McGowan I., Lietman P.S. 2001. Phase I/II trial of the pharmacokinetics, safety, and antiviral activity of tenofovir disoproxil fumarate in HIV-1 infected adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2733–2739.
47. Cahn P., Rolon M.J., Gun A.M., Ferrari I., Dibirdik I., Qazi S., D'Cruz O., Sahin K., Uckun F. 2010. Preclinical and first-in-human phase I clinical evaluation of stampidine, a potent anti-HIV pharmaceutical drug candidate. *J. AIDS Clin. Res.* **3**, 1–8.
48. Chen C.L., Venkatachalan T.K., Zhu Z.H., Uckun F.M. 2001. *In vivo* pharmacokinetics and metabolism of anti-HIV agent d4T-5'-(p-bromophenylmethoxy)alaninyl phosphate in mice. *Drug Metab. Dispos.* **29**, 1035–1041.
49. Тарусова Н.Б., Хорлин А.А., Краевский, А.А., Корнилова М.Н., Носик Д.Н., Круглов Н.Б., Галегов Г.А., Бибилашвили Р.Ш. 1989. Подавление репродукции ВИЧ в культуре клеток 5'-фосфонатами 3'-азидо-2',3'-дидезоксинуклеозидами. *Молекуляр. биология.* **23**, 1716–1723.
50. Tarusova N.B., Kukhanova M.K., Krayevsky A.A., Karamov E.V., Lukashov V.V., Korniyalaeva G.V., Rodina M.A., Galegov G.A. 1991. Inhibition of HIV replication by hydrogenphosphonates of 3'-azido-2',3'-dideoxynucleosides. *Nucleosides & Nucleotides.* **10**, 351–354.
51. Krayevsky A.A., Tarusova N.B., Zhu Q.Y., Vidal P., Chou T.C., Baron P., Polsky B., Jiang X.J., Matulic-Adamic J., Rosenberg I., Watanabe K.A. 1992. New 5'-phosphonates of sugar modified nucleosides as inhibitors of HIV production. *Nucleosides & Nucleotides.* **11**, 177–196.
52. Gosselin G., Perigaud C., Lefebvre I., Pompou A., Aubertin A.M., Kern A., Azabo T., Stawinski J., Imbach J.L. 1993. 5'-Hydrogenphosphonates of anti-HIV nucleoside analogues revisited: controversial mode of action. *Antivir. Res.* **22**, 143–153.
53. McGuigan C., Bellevergue P., Jones B.C.N.M., Mahmood N., Hay A.J., Petrik J., Karpas A. 1994. Alkyl hydrogen phosphonate derivatives of the anti-HIV agent AZT may be less toxic than the parental nucleoside analogue. *Antivir. Chem. Chemother.* **5**, 271–277.

54. Machado J., Salomon H., Olivera M., Tsoukas C., Kravetsky A., Wainberg M. 1999. Antiviral activity and resistance profile of phosphazide – a novel prodrug of AZT. *Nucleosides & Nucleotides*. **18**, 901–906.
55. Селимова Л., Краевский А.А., Галегов Г. 1999. Фосфазад и криксиван ингибируют ВИЧ-1 штамм, резистентный к азидотимидину. *Доклады Акад. Наук*. **369**, 847–849.
56. Kukhanova M.K., Shirokova E.A. 2005. 5'-O-Modified nucleoside analogues as prodrugs of anti-HIV agents. In: *Front. Nucleic Acids*. Eds Schinazi R., Liotta D. IHL press, USA. pp. 341–363.
57. Ivanova E., Shmagel N., Vorobeva N. 2010. Nikavir in chemoprevention regimens of vertical HIV transmission. In: *Understanding HIV/AIDS management and care – pandemic approaches in the 21st century*. Ed. Kasenga F.H.
58. Юрин О.Г., Краевский А.А., Афонина Л.Ю., Балаганин В.А., Бутова Н.В., Воронин Е.Е., Колесник А.Н., Молодов И.Б., Мошкович Г.Ф., Покровский В.В. 2001. Фосфазад – новый отечественный противовирусный препарат. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. **1**, 43–45.
59. Галегов Г.А. 2004. Никавир (фосфазад) как антиретровирусный агент: анти-ВИЧ активность, токсикология, фармакокинетические и некоторые перспективы использования в клинике. *Антибиотики и химиотерапия*. **49**, 3–8.
60. Кравченко А.И., Саламов Г.Г., Богословская Е.В., Серебровская Л.В., Сергиенко О.Г., Покровский В.В. 2001. Трехкомпонентная комбинированная антиретровирусная терапия с применением ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. **4**, 541–544.
61. Skoblov Yu., Karpenko I., Shirokova E., Popov K., Andronova V., Galegov G., Kukhanova M. 2004. Intracellular metabolism and pharmacokinetics of 5'-hydrogenphosphonate of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, a prodrug of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine. *Antivir. Res.* **63**, 107–113.
62. Boal J.H., Iyer R.P., Egan W. 1993. The 5'-hydrogenphosphonate analog as a potential prodrug of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT). *Nucleosides Nucleotides*. **12**, 1075–1084.
63. Khandazhinskaya A.L., Yanvarev D.V., Jasko M.V., Shipitzyn A.V., Khalizev V.A., Shram S.I., Skoblov Y.S., Shirokova E.A., Kukhanova M.K. 2009. 5'-Aminicarbonyl phosphonates as new zidovudine deport forms: antiviral properties, intracellular transformations, and pharmacokinetic parameters. *Drug Metab. Dispos.* **37**, 494–501.
64. Khandazhinskaya A., Matyugina E., Shirokova E. 2010. Anti-HIV therapy with AZT prodrugs: AZT phosphonate derivatives, current state and prospects. *Expert Opin. Drug Metab.* **6**, 701–714.
65. Skoblov Y.S., Karpenko I.L., Jasko M.V., Kukhanova M.K., Andronova V.L., Galegov G.A., Sidorov G.V., Myasoedov N.F. 2007. Cell metabolism of acyclovir phosphonate derivatives and antiherpesvirus activity of their combinations with alpha2-interferon. *Chem. Biol. Drug Des.* **69**, 429–434.
66. Doms R.W. 2010. Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Antivir. Res.* **85**, 91–100.
67. Greene W.C., Debyser Z., Ikeda Y., Freed E.O., Stephens E., Yonemoto W., Buckheit R.W., Esté J.A., Cihlar T. 2008. Novel targets for HIV therapy. *Antivir. Res.* **80**, 251–265.