

УДК 547.854"4.057
©Коллектив авторов

ПРОИЗВОДНЫЕ НИТРОБЕНЗОФУРОКСАНОВ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ ВИЧ-1 ДВОЙНОГО ДЕЙСТВИЯ

С.П. Королев^{1}, М.А. Пустоварова¹, А.М. Старосотников², М.А. Бастратов²,
Ю.Ю. Агапкина¹, С.А. Шевелев², М.Б. Готтих¹*

¹Химический факультет и НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
МГУ имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы д. 1, стр. 3 и 40; эл. почта: spkorolev@mail.ru

²Институт органической химии имени Н.Д. Зелинского РАН, Москва

Вирус иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) вызывает одно из опаснейших заболеваний – ВИЧ-инфекцию и СПИД, и поиск новых ингибиторов этого вируса до сих пор остается актуальной задачей. Одним из подходов к лечению ВИЧ-инфекции является использование ингибиторов двойного действия, направленных на подавление двух этапов жизненного цикла вируса. Каталитический домен интегразы ВИЧ-1 имеет сходную пространственную организацию с рибонуклеазным доменом (РНКаза Н) обратной транскриптазы, поэтому создание ингибиторов двойного действия, которые одновременно подавляли бы активность и РНКазы Н, и интегразы, представляется перспективным подходом. В настоящей работе синтезирована серия производных 6-нитробензофуроксана, и изучена их способность ингибировать два фермента ВИЧ-1 – интегразу и РНКазу Н.

Ключевые слова: ВИЧ-1, ингибитор, интеграна, обратная транскрипция, РНКаза Н

DOI 10.18097/PBMC20166206725

ВВЕДЕНИЕ

Темпы распространения вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в Российской Федерации являются одними из самых высоких в мире. ВИЧ-1 вызывает одно из наиболее опасных заболеваний современности – синдром приобретённого иммунодефицита человека (СПИД). Несмотря на достигнутые успехи в поиске препаратов против ВИЧ, разработка новых лекарств с механизмом действия, отличным от имеющихся, остаётся актуальной задачей [1, 2]. Недавно нами было показано, что представители одной из нитробензаннелированных гетероциклических систем – нитрозамещенные бензофуроксаны и бензофуразаны – способны ингибировать каталитическую активность одного из трёх ферментов ВИЧ-1 – интегразы [3]. В ходе репликации вируса интеграна катализирует две реакции: 3'-концевой процессинг, в результате которого с 3'-концов обеих цепей вирусной ДНК удаляется динуклеотид GT, и перенос цепи, в ходе которого происходит встраивание вирусной ДНК в геном инфицированной клетки [4]. Активность некоторых нитробензофуроксанов и фуразанов в реакции 3'-процессинга была сопоставима с активностью одного из трёх разрешённых к применению синтетических ингибиторов интегразы первого поколения – ралтегравира, хотя последний был значительно активнее в реакции переноса цепи [3]. В экспериментах с использованием рекомбинантной интегразы данные вещества препятствовали связыванию ДНК-субстрата в активном центре фермента, не взаимодействуя при этом с ионами металла-кофактора; это свидетельствует о принципиально ином механизме ингибирования интегразы, чем у применяемого при лечении ВИЧ-1 ралтегравира [5]. Исследованные нитробензофуроксаны

и -фуразаны оказались активны по отношению к мутантным формам интегразы, устойчивым к действию ралтегравира. Таким образом, поиск новых типов эффективных ингибиторов интегразы среди нитросодержащих конденсированных ароматических гетероциклов является, несомненно, важным и перспективным направлением в создании новых препаратов против ВИЧ-1.

Необходимо отметить, что каталитический центр интегразы имеет сходную пространственную организацию с рибонуклеазным доменом (РНКаза Н) другого фермента ВИЧ-1 – обратной транскриптазы (ОТ). Оба фермента относятся к классу полинуклеотидилтрансфераз, и в их активном центре находятся три консервативные аминокислоты – DDE-мотив (Asp, Asp, Glu), которые хелатируют ионы двухвалентного металла (Mg^{2+} или Mn^{2+}), необходимые для осуществления катализа [6-9]. В связи с этим весьма перспективным представляется подход, направленный на создание ингибиторов двойного действия, которые одновременно подавляют активность и РНКазы Н, и интегразы [10-12].

В рамках данной работы мы решили синтезировать новые производные нитробензофуроксана и изучить их ингибирующее действие на активность интегразы и РНКазы Н ВИЧ-1. В качестве объекта исследования был выбран 6-нитробензофуроксан **1**, его производные по 4-положению **2–4**, а также продукты конденсации с различными гетероциклами **5–9** (рисунк).

МЕТОДИКА

Соединения **1–3** получены по методу, описанному ранее [13].

6-Нитро[1,2,5]оксадиаоло[3,4-*b*]пиридин-1-оксид (**4**) синтезировали следующим образом: к суспензии

* - адресат для переписки

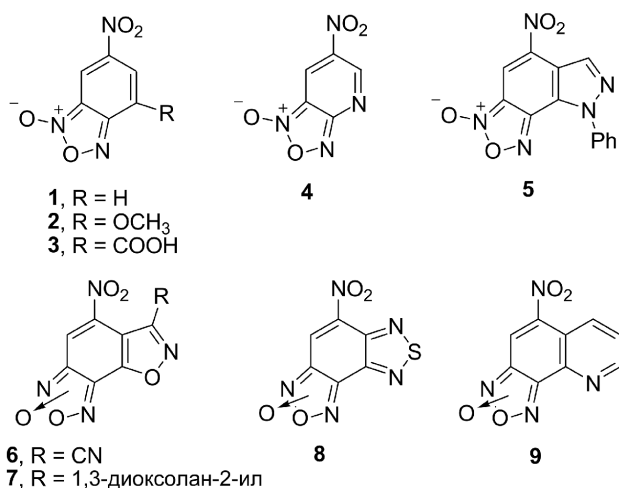


Рисунок. Структурные формулы исследуемых ингибиторов ВИЧ-1

1,84 г (10 ммоль) 2-амино-3,5-динитропиридина в 120 мл бензола добавили 4,83 г (15 ммоль) PhI(OAc)₂ и кипятили 24 ч. Смесь охлаждали, растворитель упаривали, остаток промывали гексаном. Выход 1,8 г (99%) Т. пл. 94-95°C (Т. пл. лит. [14] = 92°C) Спектр ¹H ЯМР (CDCl₃, δ, м.д.): 9,34 (с, ¹H), 9,53 (с, ¹H).

Соединение **5** получено по методу, описанному ранее [15].

Соединения **6, 7** получены по методу, описанному ранее [16].

Соединение **8** получено по методу, описанному ранее [17].

Соединение **9** получено по методу, описанному ранее [18].

Рекомбинантные препараты интегразы и обратной транскриптазы

Рекомбинантную интегразу ВИЧ-1 выделяли из клеток штамма-продуцента Rosetta *Escherichia coli* и очищали без добавления детергента как описано в [9]. Рекомбинантная ОТ ВИЧ-1 дикого типа и все её мутантные формы были любезно предоставлены В.Т. Валуевым-Эллистоном и А.В. Ивановым (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва). Фермент представлял собой димер субъединиц р66 и р51 с последовательностью из шести гистидинов на N-конце субъединицы р66 [19].

Олигонуклеотиды (все структуры 5'-3')

Олигодезоксирибонуклеотиды d(GTGTGGAAA-ATCTCTAGCAGT) (U5B), d(GTGTGGAAAATCTCT-AGCA) (U5B-2) и d(ACTGCTAGAGATTTTCCACAC) (U5A) для изучения влияния ингибиторов на каталитическую активность интегразы, а также олигорибонуклеотид γ(GAUCUGAGCCUGGGAGCU)-флуоресцеин (18-R-FI) и олигодезоксирибонуклеотид d(AGCTCCCAGGCTCAGAUC) (18-D) для анализа рибонуклеазной активности ОТ синтезировали амидофосфитным методом на автоматическом ДНК-синтезаторе ABI 3400 ("Applied Biosystems", США) по стандартному регламенту с использованием

коммерческих реагентов ("Glen Research", США). Для получения олигорибонуклеотида 18-R-FI с остатком флуоресцеина на 3'-конце его синтез проводили на полимерном носителе 3'-6-Fluorescein Serinol CPG ("Glen Research"). Очистку олигонуклеотидов проводили электрофоретически в 20%-ном денатурирующем ПААГ в присутствии 7 М мочевины.

5'-[³²P]-Фосфорилирование олигонуклеотидов

5'-[³²P]-Фосфорилирование 10 пмоль олигонуклеотидов U5B или U5B-2 проводили с помощью Т4-полинуклеотидкиназы и 2 пмоль [γ-³²P]-АТР (3000 Ки/ммоль) в течение 60 мин при 37°C в 20 мкл буфера, содержащего 50 мМ Трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ DTT.

Ингибирование реакции 3'-концевого процессинга

Ингибирование реакции 3'-концевого процессинга осуществляли согласно методике [20], для этого ³²P-меченный дуплекс U5B/U5A (3 нМ) инкубировали с интегразой (100 нМ) в 20 мкл буфера (20 мМ HEPES, рН 7,2, 7,5 мМ MgCl₂, 1 мМ DTT) в присутствии возрастающих концентраций ингибитора (0-500 мкМ) при 37°C в течение 2 ч. Реакцию останавливали добавлением 80 мкл стоп-раствора (7 мМ ЭДТА, 0,3 М NaOAc, 10 мМ Трис-НСl, рН 8, 0,125 мг/мл гликоген). Интегразу экстрагировали смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт = 25 : 24 : 1, ДНК-дуплекс осаждали этиловым спиртом (250 мкл) и анализировали электрофоретически в 20% полиакриламидном геле (ПААГ) с 7 М мочевиной. Гель анализировали на мультифункциональном сканере Typhoon FLA 9500™ ("GE Healthcare", США). О протекании реакции судили по появлению на геле полосы, соответствующей по подвижности олигонуклеотиду U5B, укороченному на два звена (U5B-2). Эффективность реакции оценивали при помощи программы Quantity One™ 4.6.6. По результатам трёх независимых экспериментов строили кривую зависимости эффективности протекания 3'-процессинга от концентрации ингибитора. По кривой определяли значение IC₅₀ как концентрацию ингибитора, при которой реакция подавляется на 50%.

Ингибирование реакции переноса цепи

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

Ингибирование рибонуклеазной активности ОТ

100 нМ гибридный дуплекс 18-R-FI/18-D инкубировали с ОТ ВИЧ-1 (12,5 нМ) в присутствии ингибитора в различных концентрациях (0-500 мкМ) в 20 мкл буфера, содержащего 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 5 мМ MgCl₂, 60 мМ KCl в течение 15 мин при 37°C. Для остановки реакции к смеси добавляли 80 мкл стоп-смеси: 10 мМ Трис-НСl (рН 8,0),

7 мМ ЭДТА, 0,3 М NaOAc, 0,125 мг/мл гликогена. РНК и ДНК осаждали 250 мкл этилового спирта при 0°C и анализировали электрофоретически в 20%-ном денатурирующем ПААГ. Гель визуализировали на мультифункциональном сканере Typhoon FLA 9500™ (“GE Healthcare”). О протекании реакции судили по появлению в геле полос с более высокой подвижностью, чем у исходного олигонуклеотида 18-R-Fl. Эффективность ингибирования определяли с использованием программы Quantity One™ 4.6.6. Все эксперименты проводили не менее трёх раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе были синтезированы и изучены производные 6-нитробензофураксана (рисунок) в качестве ингибиторов двойного действия, направленных на подавление активности интегразы и РНКазы Н ВИЧ-1. Ранее было показано, что 6-нитробензофураксан **1** (рисунок) одинаково эффективно ингибирует обе реакции, катализируемые интегразой, 3'-процессинг и перенос цепи со значениями IC_{50} 6 мкМ и 5 мкМ соответственно [3]. В настоящей работе изучена способность производных 6-нитробензофураксана (рисунок) подавлять каталитическую активность интегразы. Для этого использовали рекомбинантный белок и ДНК-дуплексы U5B/U5A и U5B-2/U5A, соответствующие концевому участку вирусной ДНК до и после отщепления динуклеотида GT. Дуплекс U5B/U5A представлял собой субстрат интегразы в реакции 3'-концевого процессинга, а дуплекс U5B-2/U5A – в реакции переноса цепи. Необходимо отметить, что в реакции переноса цепи рекомбинантная интеграза может использовать любую ДНК в качестве мишени для встраивания процессированного субстрата, поэтому дуплекс U5B-2/U5A служил одновременно и субстратом, и мишенью в этой реакции. Оказалось, что все исследуемые соединения ингибируют каталитическую активность интегразы с близкими значениями IC_{50} для реакций 3'-процессинга и переноса цепи (таблица). Только соединение **4** более эффективно ингибирует реакцию переноса цепи, чем 3'-процессинг. Среди всех соединений наиболее эффективными оказались **1** и **6**.

Таблица. Результаты ингибирования каталитической активности интегразы и домена РНКазы Н в составе ОТ ВИЧ-1 исследуемыми нитробензофураксанами

Название	IC_{50} , мкМ		
	Интегразы		ОТ
	3'-процессинг	Перенос цепи	РНКазы Н
1	6±1	5±1	10±2
2	100±20	100±30	490±90
3	350±50	400±100	50±10
4	190±30	60±15	90±20
5	250±40	210±50	45±12
6	25±4	20±3	8±2
7	200±30	170±20	10±2
8	50±10	40±5	16±5
9	500±100	450±70	25±4

Кроме того, впервые была изучена способность нитробензофураксанов **1-9** (рисунок) подавлять каталитическую активность домена РНКазы Н в составе ОТ ВИЧ-1. Для этого использовали гибридный дуплекс 18-R-Fl/18-D и рекомбинантную ОТ ВИЧ-1. Результаты ингибирования РНКазы Н представлены в таблице. Все использованные нитробензофураксаны ингибировали РНКазу Н, однако наиболее эффективными оказались соединения **1**, **6** и **7**. Для них значения IC_{50} составили 8-10 мкМ. Соединение **8** ингибировало активность РНКазы Н с IC_{50} = 16 мкМ. Следует заметить, что близкие по структуре соединения **6** и **7**, отличающиеся исключительно строением радикала в оксазольном фрагменте, ингибируют РНКазу Н с практически одинаковой эффективностью, но при этом активность по отношению к интегразе у соединения **6** практически на порядок выше, чем у соединения **7**. Особо следует отметить тот факт, что большинство соединений эффективнее ингибировало РНКазу Н, чем интегразу; исключением явилось лишь соединение **2**, которое оказалось более эффективным ингибитором интегразы. Наиболее перспективными ингибиторами двойного действия считаются соединения, одинаково эффективно подавляющие активность обоих ферментов [11, 12]. В связи с этим при дальнейшей оптимизации структуры ингибиторов двойного действия из класса нитробензофураксанов, по всей видимости, первостепенное значение следует уделить повышению эффективности ингибирования интегразы.

Таким образом, среди исследованных производных 6-нитробензофураксана можно выделить соединения **1** и **6**, с одинаковой эффективностью подавляющие активность двух ферментов ВИЧ-1 – интегразы и РНКазу Н. Отметим, что способность этих соединений ингибировать интегразу существенно ниже способности ралтегравира [3], но, как ингибиторы двойного действия по своей активности они сравнимы с описанными в литературе [10, 11, 21, 22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые показано, что исследуемые производные 6-нитробензофураксана способны ингибировать два фермента, необходимые для успешной репликации ВИЧ-1: интегразу и домен РНКазы Н в составе ОТ. Все соединения (кроме соединения **4**) практически с одинаковой эффективностью ингибировали обе каталитические активности интегразы; соединение **4** оказалось более эффективным ингибитором переноса цепи, чем 3'-процессинга. Эффективность ингибирования РНКазы Н для большей части соединений была выше, чем ингибирования интегразы. В этом отличие исследованных нами производных 6-нитробензофураксана от большинства описанных в литературе ингибиторов двойного действия, которые являются более эффективными ингибиторами интегразы [10, 21, 22]. Наиболее эффективными ингибиторами двойного действия оказались соединения **1** и **6**, значения IC_{50} которых при ингибировании обоих ферментов

не превышают 20 мкМ. Необходимо ещё раз подчеркнуть, что механизм действия нитробензофуроксанов [3] отличается от механизма действия большинства ингибиторов двойного действия, ингибирующая активность которых в первую очередь обусловлена их способностью хелатировать ионы магния в активных центрах интегразы и РНКазы Н [5, 11, 12]. Возможно, что введение в 5 или 7 положение 6-нитробензофуроксана хелатирующих группировок дополнительно повысит эффективность действия этих ингибиторов.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда №16-15-10238.

ЛИТЕРАТУРА

1. Geronikaki A., Eleftheriou P., Poroikov V. (2016) Topics in Medicinal Chemistry, 1-59.
2. Veselovsky A.V., Zharkova M.S., Poroikov V.V., Nicklaus M.C. (2014) SAR QSAR Environ. Res., **25** (6), 457-471.
3. Королев С.П., Кондрашина О.В., Дружиловский Д.С., Старосотников А.М., Дутов М.Д., Бастрakov М.А., Далингер И.Л., Филимонов Д.А., Шевелев С.А., Поройков В.В., Агапкина Ю.Ю., Готтих М.Б. (2013) Acta Naturae, **5**(16), 65-75.
4. Cara A., Guarnaccia F., Reitz Jr. M.S., Gallo R.C., Lori F. (1995) Virology, **208**, 242-248.
5. Королев С.П., Агапкина Ю.Ю., Готтих М.Б. (2011) Acta Naturae, **3**(3), 13-30.
6. Davies J.F. II, Hostomska Z., Hostomsky Z., Jordan S.R., Matthews D.A. (1991) Science, **252**, 88-95.
7. Esposito D., Craigie R. (1999) Adv. Virus Res., **52**, 319-333.
8. Cirino N.M., Cameron C.E., Smith J.S., Rausch J.W., Roth M.J., Benkovic S.J., Le Grice S.F. (1995) Biochemistry, **34**, 9936-9943.
9. Leh H., Brodin P., Bischerour J., Deprez E., Tauc P., Brochon J.C., LeCam E., Coulaud D., Auclair C., Mouscadet J.F. (2000) Biochemistry, **39**, 9285-9294.
10. Corona A., Di Leva F.S., Thierry S., Pescatori L., Cuzzucoli Crucitti G., Subra F., Delelis O., Esposito F., Rigogliuso G., Costi R., Cosconati S., Novellino E., Di Santo R., Tramontano E. (2014) Antimicrob. Agents Chemother., **58** (10), 6101-6110.
11. Cuzzucoli Crucitti G., Métifiot M., Pescatori L., Messori A., Madia V.N., Pupo G., Saccoliti F., Scipione L., Tortorella S., Esposito F. et al. (2015) J. Med. Chem., **58**(4), 1915-1928.
12. Esposito F., Tramontano E. (2014) Antiviral Chem. Chemother., **23**, 129-144.
13. Ayyangar N.R., Madan Kumar S., Srinivasan K.V. (1987) Synthesis, **7**, 616-618.
14. Lowe-Ma C.K., Nissan R.A., Wilson W.S. (1990) J. Org. Chem., **55**, 3755-3761.
15. Бастрakov М.А., Старосотников А.М., Качала В.В., Глухов И.В., Шевелев С.А. (2009) Изв. АН. Сер. хим., **2**, 407-412.
16. Бастрakov М.А., Старосотников А.М., Глухов И.В., Шевелев С.А. (2009) Изв. АН Сер. хим., **2**, 418-421.
17. Starosotnikov A.M., Bastrakov M.A., Pavlov A.A., Fedyanin I.V., Dalinger I.L., Shevelev S.A. (2016) Mendelev Commun., **26**, 217-218.
18. Bastrakov M.A., Starosotnikov A.M., Kachala V.V., Fedyanin I.V., Shevelev S.A. (2015) Asian J. Org. Chem., **4**, 146-153.
19. Le Grice S.F., Grüninger-Leitch F.R. (1990) Eur. J. Biochem., **187**(2), 307-314.
20. Акимов Д.В., Филимонов Д.А., Приказчикова Т.А., Готтих М.Б., Поройков В.В. (2005) Биомед. химия, **51**(3), 335-340.
21. Billamboz M., Bailly F., Barreca M.L., De Luca L., Mouscadet J.F., Calmels C., Andreola M.L., Witvrouw M., Christ F., Debyser Z., Cotellet P. (2008) J. Med. Chem., **51**, 7717-7730.
22. Billamboz M., Bailly F., Lion C., Calmels C., Andréola M.L., Witvrouw M., Christ F., Debyser Z., De Luca L., Chimirri A., Cotellet P. (2011) Eur. J. Med. Chem. **46**(2), 535-546.

Поступила: 19. 10. 2016.
Принята к печати: 27. 10. 2016.

NITROBENZOFUROXANE DERIVATIVES AS DUAL ACTION HIV-1 INHIBITORS

**S.P. Korolev¹, M.A. Pustovarova¹, A.M. Starosotnikov², M.A. Bastrakov²,
Yu. Yu. Agapkina¹, S.A. Shevelev², M.B. Gottikh¹**

¹Department of Chemistry and Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia; e-mail: spkorolev@mail.ru

²Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Moscow, Russia

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is a main cause of one of the most dangerous diseases, AIDS. The search for new inhibitors of the virus still remains an urgent task. One approach to suppress the HIV infection is to use a double-acting inhibitors, i.e. inhibitors directed to two stages of the viral life cycle. The catalytic domain of HIV-1 integrase has a similar spatial organization with ribonuclease (RNase H) domain of HIV-1 reverse transcriptase, and approach aimed to create HIV-1 integrase and RNase H double-acting is very promising. In this work we synthesized a series of 6-nitrobenzofuroxane derivatives and studied their ability to inhibit two viral enzymes – integrase and RNase H HIV-1.

Key words: HIV-1, inhibitor, integrase, reverse transcriptase, RNase H