

ДЕЙСТВИЕ ДИМЕРНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НЕТРОПСИНА И ИХ КОМБИНАЦИЙ С АЦИКЛОВИРОМ НА ГЕРПЕСВИРУСНУЮ ИНФЕКЦИЮ МЫШЕЙ

© 2007 г. В. Л. Андропова, С. Л. Гроховский, А. Н. Суровая,
член-корреспондент РАН Г. В. Гурский, Г.А. Галегов

Поступило 26.12.2006 г.

Современные способы лечения инфекций человека, вызываемых вирусами герпеса, основаны на использовании в качестве лекарственных средств модифицированных нуклеозидов (ацикловир, ганцикловир и др.). Эти соединения после трифосфорилирования служат субстратами вирусной ДНК-полимеразы. В процессе репликации вирусной ДНК они включаются в растущую полинуклеотидную цепь и ингибируют стадию элонгации. Однако эти лекарственные средства не избавляют пациентов от рецидивирующего характера течения болезни, а также от возможности возникновения вариантов вируса с лекарственной устойчивостью.

В настоящем сообщении мы приводим результаты изучения противовирусной активности аналогов антибиотика нетропсина при подавлении высоколетальной герпесвирусной инфекции в опытах на белых мышах BALB/c. Мы обнаружили, что по показателю острой токсичности все включенные в исследование ковалентно связанные димерные аналоги нетропсина имеют значительное преимущество по сравнению с нетропсином. Они могут значительно снижать смертность инфицированных животных и могут увеличивать среднюю продолжительность жизни по сравнению с контрольной инфицированной, но нелеченной группой животных. Их можно использовать для лечения вместе со стандартными лекарственными средствами – ацикловиром и его аналогами. При комбинированном применении биснетропсинов и ацикловира наблюдается существенно более эффективное подавление вирусной инфекции мышей.

Конструирование и синтез новых лекарственных соединений ненуклеотидной природы, способных эффективно подавлять репродукцию вируса герпеса, представляет значительный интерес для молекулярной биологии и медицины. Важные результаты были получены при использовании в качестве “строительных блоков” для синтеза новых противовирусных соединений аналогов пирролкарбоксамидных антибиотиков нетропсина (Nt) и дистамицина, связывающихся в узкой бороздке ДНК с кластерами АТ-пар оснований [1–4]. Наиболее простой путь для увеличения избирательности связывания этих соединений состоит в синтезе димерных (олигомерных) аналогов, в которых два или более мономеров соединены друг с другом ковалентно [2–4, 6–10]. Наши исследования показали, что некоторые из биснетропсинов имеют высокую антигерпетическую активность в культуре клеток и обладают на порядок меньшей цитотоксичностью, чем природный антибиотик Nt [8, 9]. Существенно, что эти соединения имеют высокую активность при подавлении репродукции вариантов вируса герпеса простого типа 1 (ВПГ-1), устойчивых к действию стандартных противогерпетических лекарственных препаратов [8–10]. Обнаружена также высокая эффективность действия комбинаций биснетропсинов с модифицированными нуклеотидами и аналогами пирофосфата при подавлении репродукции вируса герпеса в культуре клеток vero [9–12].

Целью исследований в настоящей работе является поиск новых производных Nt, обладающих высокой активностью и селективностью при подавлении вирусгерпесной инфекции в опытах на лабораторных животных. Представляется целесообразным изучить в этих экспериментах токсичность и противовирусную активность биснетропсинов, которые оказались наиболее эффективными при подавлении репродукции ВПГ-1 в культуре клеток vero.

*ГУ Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского
Российской Академии наук, Москва
Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта
Российской Академии наук, Москва
Университет Осло,
Центр медицинских исследований*

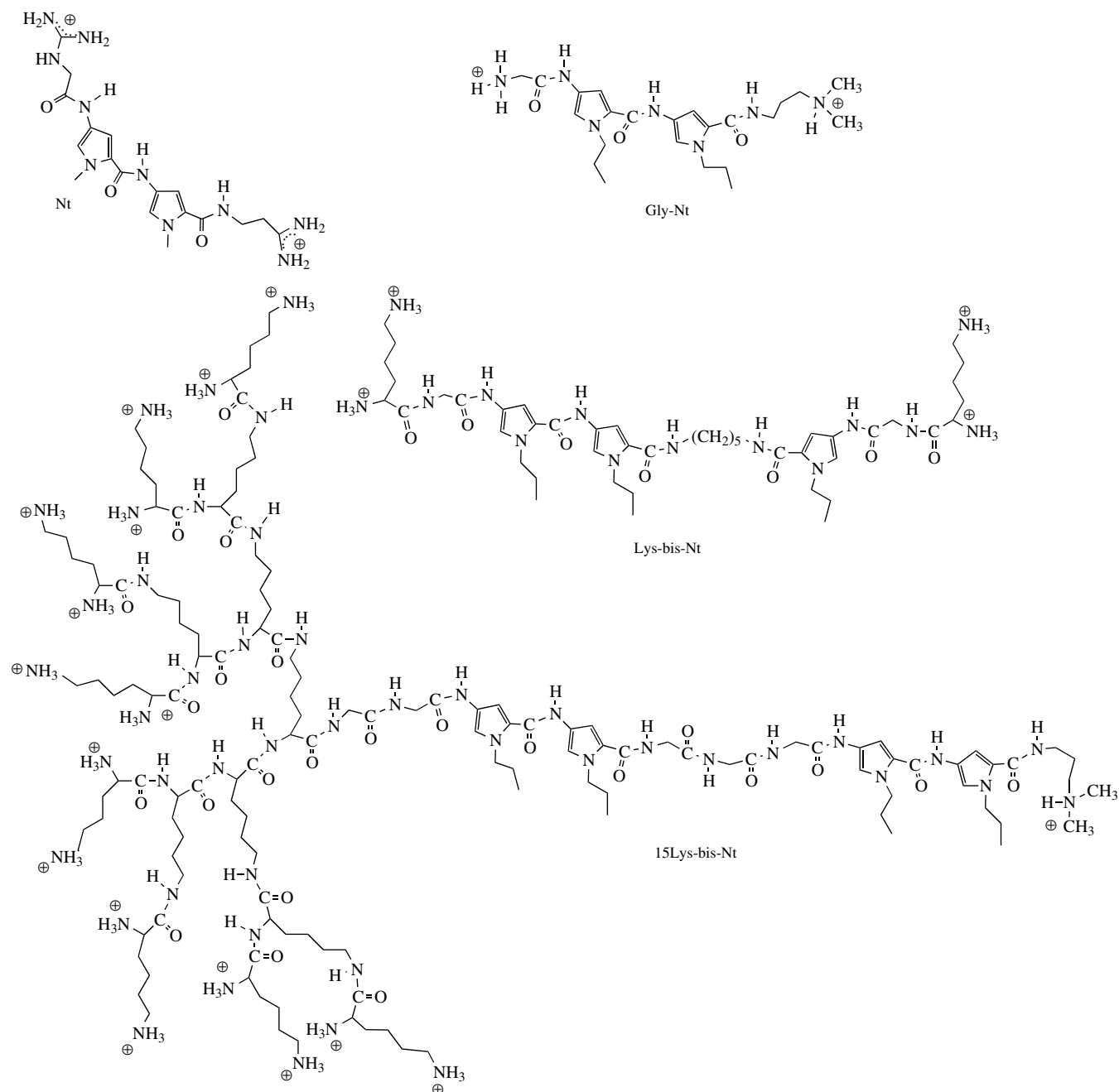


Рис. 1. Химическая структура нетропсина (Nt) и его производных.

В работе мы использовали адаптированный к мозгу мышей ВПГ-1 штамм L₂, животные – самцы белых линейных мышей BALB/c массой 8–10 г.

Структурные формулы производных Nt представлены на рис. 1. В работу взят ацикловир (9-гидроксиэтоксиметил)гуанин, ациклогуанозин, зовиракс) производства “GlaxoSmithKline”. При определении острой токсичности препараты вводили однократно внутривенно в объеме 0.2 мл по четыре животных в группе. Величину ЛД₅₀ (дозу

препарата, вызывающую гибель 50% животных) вычисляли в соответствии с общепринятым методом [13].

При исследовании противовирусной активности производных Nt *in vivo* мы использовали методические приемы, описанные в литературе [14, 15]. Инфекционный материал и препараты вводили внутривенно в объеме 0.2 мл. Заражающая доза и разовая доза препаратов, количество животных в группе указаны для каждого эксперимента отдельно. Препараты вводили по схеме:

Таблица 1. Острая токсичность и противовирусная активность производных нетропсина (Nt) в опытах на мышах BALB/c

Соединение	ЛД ₅₀ , мг/кг	Разовая доза, мг/кг	Курсовая доза, мг/кг	Смертность, %		Защита, %	СПЖ, сут
				N/N_0	%		
Контроль	—	—	—	16/30	56.7	—	11.7 ± 2.5
Nt	136.9	—	—	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.
Gly-Nt	260.0	10	100	14/30	46.7	10.0	14.7 ± 2.0
Lys-bis-Nt	252.6	10	100	10/20	50.0	6.7	12.6 ± 2.8
15Lys-bis-Nt	307.2	10	100	6/20	30.0	26.7	16.1 ± 2.5

Примечание. Множественность заражения составляла 10 ЛД₅₀/мышь; н.и. – не исследовали. Здесь и в табл. 2 N/N_0 – отношение числа погибших животных (N) к общему числу животных в группе (N_0). Представлены результаты двух независимых опытов.

два раза в день в течение пяти дней. Первое введение проводили через час после заражения. Срок наблюдения составлял 21 сут. Эффективность препаратов оценивали по способности препаратов защищать животных от гибели (процент выживаемости относительно контрольной инфицированной, но нелеченной группы), а также по увеличению средней продолжительности жизни (СПЖ). Максимальное значение продолжительности жизни составляло 21 сут.

Исследование острой токсичности новых производных Nt для мышей показало, что все препа-

раты были менее токсичны (в 1.8–2.2 раза), чем исходный Nt (табл. 1).

Для изучения противовирусной активности производных Nt использовали летальную герпесвирусную инфекцию мышей. Результаты изучения представлены на рис. 2, 3, а также в табл. 1.

В первой серии экспериментов мы исследовали влияние препаратов на течение инфекции при 50%-ной смертности в контроле. Как видно из представленных в табл. 1 данных, все исследованные препараты обладали достоверной способностью защищать животных от гибели и были спо-

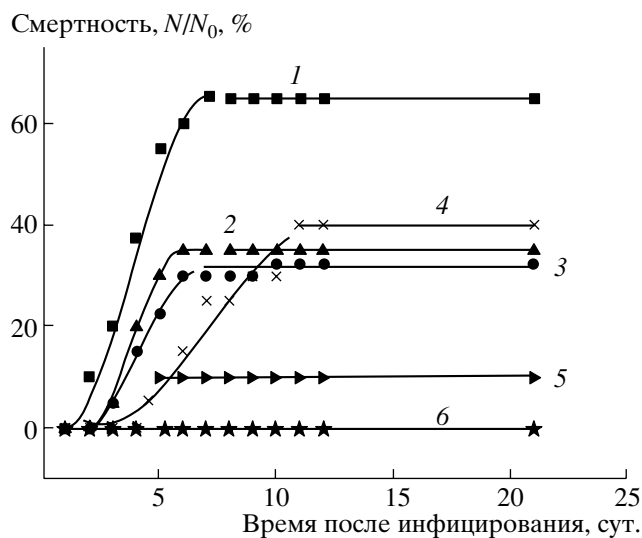


Рис. 2. Комбинированное действие 15Lys-bis-Nt и ACV на вирусную инфекцию в опытах на мышах BALB/c, инфицированных вирусом герпеса простого типа 1 (смертность в контроле 65%). 1 – контроль – развитие инфекции в нелеченной группе животных; 2–6 – группы животных, получавших лекарственные препараты: 2 – 15Lys-bis-Nt, разовая доза 20 мг/кг; 3 – ACV, разовая доза 25 мг/кг; 4 – 15Lys-bis-Nt, разовая доза 10 мг/кг; 5 – комбинация 15Lys-bis-Nt (разовая доза 10 мг/кг) и ACV (разовая доза 25 мг/кг); 6 – комбинация 15Lys-bis-Nt (разовая доза 20 мг/кг) и ACV (разовая доза 25 мг/кг).

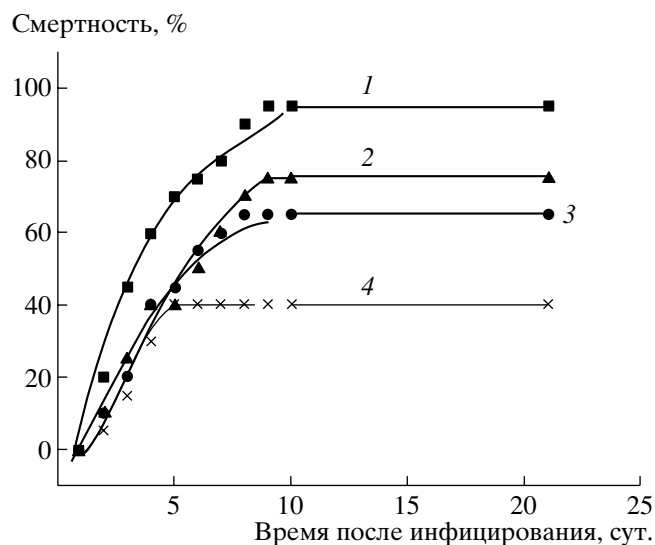


Рис. 3. Комбинированное действие 15Lys-bis-Nt и ACV на вирусную инфекцию в опытах на мышах BALB/c, инфицированных вирусом герпеса простого типа 1 (смертность в контроле 95%). 1 – контроль – развитие инфекции в нелеченной группе животных; 2–4 – группы животных, получавших лекарственные препараты: 2 – 15Lys-bis-Nt, разовая доза 20 мг/кг; 3 – ACV, разовая доза 25 мг/кг; 4 – комбинация 15Lys-bis-Nt (разовая доза 20 мг/кг) и ACV (разовая доза 25 мг/кг).

Таблица 2. Противовирусная активность 15Lys-bis-Nt и комбинаций 15Lys-bis-Nt с ACV в опытах на мышах BALB/c

Соединение	Разовая доза, мг/кг	Курсовая доза, мг/кг	Смертность, %		Защита, %	СПЖ, сут
			N/N_0	%		
I. Контроль	–	–	13/20	65	–	10.1 ± 1.4
ACV	25	250	7/20	35	30	15.3 ± 1.5
15Lys-bis-Nt	10	100	8/20	40	25	13.9 ± 1.6
15Lys-bis-Nt	20	200	7/20	35	30	15.0 ± 2.5
15Lys-bis-Nt + ACV (a)	10 + 25	100 + 250	2/20	10	55	19.3 ± 1.1
15Lys-bis-Nt + ACV (b)	20 + 25	200 + 250	0/20	0	65	21
II. Контроль	–	–	19/20	95	–	5.0 ± 1.2
ACV	25	250	13/20	65	30	10.2 ± 3.3
15Lys-bis-Nt	20	200	15/20	75	20	10.3 ± 1.7
15Lys-bis-Nt + ACV (b)	20 + 25	200 + 250	8/20	40	55	12.6 ± 2.0

Примечание. Множественность заражения 10 и 100 ЛД₅₀/мышь для опытов со смертностью в контроле 65% (I) и 95% (II) соответственно. Комбинации 15Lys-bis-Nt и ACV содержали в разовой дозе 10 мг/кг 15Lys-bis-Nt и 25 мг/кг ACV (a) или 20 мг/кг 15Lys-bis-Nt и 25 мг/кг ACV (b). Курсовые дозы содержали 100 мг/кг +15Lys-bis-Nt и 250 мг/кг ACV (a) или 200 мг/кг 15Lys-bis-Nt и 250 мг/кг ACV (b). В таблице приведены результаты двух независимых опытов.

способны увеличивать СПЖ по сравнению с контрольной группой животных.

В дальнейших экспериментах мы использовали один из наиболее активных биснетропсинов (15Lys-bis-Nt), обеспечивающий по нашим данным максимальное снижение смертности животных (27%) и увеличение СПЖ (4.4 сут). Ранее в опытах в культуре клеток *vego* нами было показано, что антивирусная активность 15Lys-bis-Nt находится на уровне лучших известных противовирусных лекарственных препаратов (IC₅₀ = 1.3 мкМ, в то время как ингибирующие концентрации IC₅₀ для ацикловира и ганцикловира равны 1.6 и 2.1 мкМ соответственно) [9, 10]. В культуре клеток противовирусная активность 15Lys-bis-Nt обнаруживает синергизм с действием стандартных лекарственных препаратов, включая модифицированные нуклеозиды и аналоги пиррофосфата [10].

В настоящей работе мы исследовали эффективность действия 15Lys-bis-Nt на вирусную инфекцию в опытах на животных при различных разовых дозах, а также эффективность действия комбинаций 15Lys-bis-Nt и ACV при 65 и 95%-ной смертности животных в контроле (заражающие дозы составляют 10 и 100 ЛД₅₀ соответственно).

Как видно из данных, приведенных на рис. 2, при смертности в контрольной группе 65% 15Lys-bis-Nt снижал смертность животных как при использовании в дозе 20 мг/кг массы животного, так и при снижении дозы до 10 мг/кг. СПЖ увеличивалась по сравнению с контролем на пять и трие суток соответственно. Однако наилучшие результаты были получены при изучении комбинации 15Lys-bis-Nt и ACV. При использовании 15Lys-

bis-Nt в комбинации с ACV в разовых дозах 20 и 25 мг/кг соответственно удается полностью предотвратить гибель животных (рис. 2). При снижении дозы 15Lys-bis-Nt в комбинации до 10 мг/кг смертность составила 10%, т.е. комбинация обеспечивала 55%-ную защиту животных, а СПЖ увеличивалась на 9 сут.

При увеличении дозы заражения (смертность в контроле 95%) 15Lys-bis-Nt также обеспечивал достоверную защиту животных от гибели (20%). При использовании комбинации 15Lys-bis-Nt с ACV (разовые дозы равны 20 и 25 мг/кг для 15Lys-bis-Nt и ACV соответственно) защитный эффект составил 55%, наблюдалось увеличение СПЖ на 7 сут по сравнению с контрольной нелеченной группой животных (табл. 2).

Таким образом, 15Lys-bis-Nt при реализации данной схемы лечения обладает достоверным противовирусным действием, которое выразилось в увеличении выживаемости животных и увеличении СПЖ в условиях летальной герпесвирусной инфекции. При использовании 15Lys-bis-Nt в комбинации с ACV *in vivo* наблюдается суммирование величин лечебных эффектов, характерных для обоих препаратов.

Авторы благодарят за финансовую поддержку Программу Президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии и Российский фонд фундаментальных исследований (гранты 03–04–48903 и 04–04–49364).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kopka M.L., Yoon D., Goodsell D. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 1376–1380.

2. Gursky G.V., Zasedatelev A.S., Zhuze A.L. et al. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1983. V. 47. P. 367–378.
3. Lown J.W., Krowicki K., Balzarini J. et al. // J. Med. Chem. 1989. V. 32. P. 2368–2375.
4. Grokhovsky S.L., Surovaya A.N., Burkhardt G. et al. // FEBS Lett. 1998. V. 439. P. 346–350.
5. Gotesfeld J.M., Turner J.M., Dervan P.B. // Gene Expression. 2000. V. 9. P. 77.
6. Nikolaev V.A., Grokhovsky S.L., Surovaya A.N. et al. // J. Biomol. Struct. Dyn. 1996. V. 14. P. 31–47.
7. Belikov S.V., Grokhovsky S.L., Isaguliants M.V. et al. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2005. V. 23. P. 193–202.
8. Андропова В.Л., Гроховский С.Л., Суровая А.Н. и др. // ДАН. 2001. Т. 380. № 4. С. 548–551.
9. Андропова В.Л., Гроховский С.Л., Суровая А.Н. и др. // ДАН. 2004. Т. 399. № 6. С. 829–834.
10. Андропова В.Л., Суровая А.Н., Гурский Г.В. и др. // ДАН. 2005. Т. 400. № 6. С. 822–826.
11. Галегов Г.А., Андропова В.Л., Гурский Г.В. и др. Димерное производное нетропсина – 15-Лиз-бис-нетропсин и комбинации на его основе, обладающие антигерпетической активностью. Пат. № 2265610 РФ // Бюл. № 34. 2005.
12. Галегов Г.А., Андропова В.Л., Гурский Г.В. и др. Комбинации на основе нетропсина и его бис-производного, обладающие антигерпетической активностью. Пат. 2240792 РФ // Бюл. 2004. № 33.
13. Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Березовская И.В. и др. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Редмедиум, 2000. С. 18–20.
14. Гуськова Т.А., Николаева И.С., Петерс В.В. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Редмедиум, 2000. С. 274–280.
15. Sutton D., Kern E.R. // Antivir. Chemother. 1993. №4. Suppl. 1. P. 37–46.