

В. Л. Андропова¹, С. Л. Гроховский², П. Г. Дерябин¹, Г. В. Гурский², Г. А. Галегов¹, Д. К. Львов¹

Противогерпетическая активность производных нетропсина в опытах на лабораторных животных

¹ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского Минздравсоцразвития России, Москва; ²Учреждение РАН Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Москва

В результате комплексных исследований противовирусной активности и токсичности двух димерных производных нетропсина (Lys-bis-Nt и 15Lys-bis-Nt) в культуре клеток и в опытах на лабораторных животных установлено, что оба соединения эффективно и селективно ингибируют репродукцию вируса герпеса простого 1-го типа как в культуре клеток Vero E6, так и в мозге инфицированных белых мышей, обеспечивая значительное увеличение выживаемости и средней продолжительности жизни животных по сравнению с контрольной нелеченой группой.

Ключевые слова: вирус герпеса простого, производные нетропсина, противовирусная активность

Antitherpetic Activity of Netropsin Derivatives as Tested in Experiments in Laboratory Animals

V. L. Andronova¹, S. L. Grokhovsky², P. G. Deryabin¹, G. V. Gursky², G. A. Galegov¹, and D. K. L'vov¹

¹ Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia;

² Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Two dimeric netropsin derivatives (Lys-bis-Nt and 15Lys-bis-Nt) were comprehensively tested for antiviral and toxic activity in cell cultures and laboratory animals. The two compounds were found to provide effective and selective inhibition of reproduction of herpes simplex I both in cell culture Vero E6 and in brain of infected white mice, thereby increasing the survival rate and mean life expectation of treated animals as compared to control.

Key words: herpes simplex virus, netropsin derivatives, antiviral activity in vivo

Герпесвирусная инфекция является одной из самых распространенных вирусных инфекций человека: по данным ВОЗ, антитела к вирусам герпеса имеет около 80% населения Земного шара. Современная химиотерапия инфекционных заболеваний, вызываемых вирусами герпеса, связана с использованием препаратов гуанинсодержащих модифицированных ациклических нуклеозидов ацикловира (АЦВ), пенцикловира и их предлекарств валцикловира и фамцикловира. Основным недостатком препаратов этой группы, несмотря на высокий противовирусный эффект, является формирование к ним лекарственной устойчивости. Среди иммунокомпетентных пациентов частота появления АЦВ/ПЦВ-резистентных штаммов вируса простого герпеса (ВПГ) составляет около 0,5% случаев [5, 7, 18], но среди больных с иммунодефицитными состояниями она может превышать 30% случаев [7, 16, 18, 19]. Резистентность к АЦВ и ПЦВ в 95% случаев обусловлена мутациями в гене тимидинкиназы (ТК), а также в гене ДНК-полимеразы, с которыми связан механизм действия этих препаратов [12, 15]. Таким образом, поиск новых соединений ненуклеозидной природы, эффективность которых не зависит от чувствительности ВПГ к препаратам АЦВ и родственных ему соединений, в настоящее время сохраняет актуальность и практическую значимость.

Нетропсин (Nt) и дистамицин (Dst), представляющие собой ДНК-тропные противоопухолевые антибиотики, обладают противовирусной активностью в отношении ВПГ. Связываясь в узкой бороздке ДНК с кластерами из 4–5 АТ-пар оснований в начале репли-

кации ВПГ OriS и OriL, Nt и Dst ингибируют процессы репликации и транскрипции [11, 14].

Синтез Nt-пептидных конъюгатов и димерных производных Nt (бис-Nt), в молекулах которых два мономера соединены друг с другом ковалентно с помощью различных соединительных цепей, позволяет повысить избирательность связывания этих соединений с вирусной ДНК и ингибировать активность ключевых вирусных ДНК-связывающих белков и транскрипционных факторов [9–11, 13, 20].

Ранее при исследовании ДНК-связывающей активности ряда бис-Nt и Nt-пептидных конъюгатов нами было установлено, что производные бис-Nt ингибируют процесс инициации репликации вирусной ДНК, т.е. действуют еще до начала синтеза вирусной ДНК. Эти соединения избирательно связываются с протяженными кластерами АТ-пар оснований в начале репликации ВПГ OriS и OriL [6, 11], в результате чего в участке OriS увеличивается температура плавления А+Т-кластера и уменьшается вероятность вызванного тепловыми флюктуациями «раскрытия» АТ-пар оснований, которое необходимо для инициации раскручивания вирусной ДНК хеликазой UL9 ВПГ [6].

Мы установили, что ряд производных бис-Nt обладает противовирусной активностью в отношении ВПГ-1, включая штаммы, резистентные к АЦВ, в диапазоне концентраций, близких к таковым Nt, но характеризуется значительно меньшей токсичностью в культуре клеток Vero E6 и, следовательно, большей селективностью [1–4].

Контактная информация:

Андропова Валерия Львовна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр.; e-mail: andronova.vl@yandex.ru

При изучении противовирусной активности производных бис-Nt в опытах на белых мышах BALB/c было показано, что все исследованные нами производные Nt способны достоверно снижать смертность инфицированных животных, и по показателю острой токсичности имеют значительное преимущество перед Nt [2].

Целью настоящей работы было продолжение исследований противовирусной активности производных бис-Nt в опытах на белых линейных мышах.

Материалы и методы

Клетки. В работе использовали перевиваемую культуру клеток почек зеленой мартышки Vero E6.

Вирусы. Штамм вируса герпеса простого типа 1 L₂ (ВПГ-1/L₂) получен из Государственной коллекции вирусов ФГБУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздравсоцразвития России.

Препараты синтезированы в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта. Химические формулы производных бис-Nt:

H-Lys-Gly-Arc₂-CONH-(CH₂)₅-NHCO-Arc₂-Gly-Lys-H (Lys-bis-Nt)

(((H-Lys)₂-Lys)₂-Lys)₂-Lys-Gly-Gly₂-Arc₂-Gly₃-Arc₂-NH-(CH₂)₃-NMe₂

(15Lys-bis-Nt)

Здесь Arc — остаток 1-N-пропил-2-амино-пиррол-4-карбоновой кислоты.

Цитотоксичность соединений оценивали после 72 ч инкубации клеток в присутствии соединения в известной концентрации методом окрашивания клеток трипановым синим (trypan blue exclusion method). Количественно цитотоксичность выражали как ЦД₅₀ [1–5].

Противогерпесвирусную активность соединений in vitro изучали с использованием CPE inhibition assay [8] микрометодом, как подробно изложено ранее [1–5]. Множественность инфицирования (МИ) составляла 0,1 БОЕ/кл. Результаты оценивали через 48 ч, когда в контроле вируса развивался 95–100% цитопатический эффект (ЦПЭ). Активность выражали в величинах ИД₅₀ и ИД₉₅.

Животные - самцы белых линейных мышей BALB/c массой тела 8–10 г (по 20 особей в группе) получены из питомника лабораторных животных Филиал «Столбовая» НЦБМТ РАМН (Московская обл., Чеховский район).

При исследовании противовирусной активности соединений in vivo использовали методические приемы, описанные ранее [2]. Инфекционный материал (ВПГ-1/L₂) и производные бис-Nt вводили внутри-

брюшинно в объеме 0,2 мл. Заражающая доза 3,5 × 10⁵ БОЕ/0,2 мл обеспечивала 50% смертность животных в контроле. Соединения вводили 2 раза в день в течение 5 дней. Первое введение проводили через 1 ч после заражения. Срок наблюдения – 21 сут. Эффективность соединений оценивали по их способности защищать животных от гибели и увеличению средней продолжительности жизни (СПЖ).

Влияние соединений на накопление инфекционного вируса в мозге инфицированных животных. Мышей инфицировали и вводили им соединения, как указано выше. На 4-е сутки, когда в мозге зараженных животных инфекционный титр достигал максимального значения, мышей забивали. Извлеченный головной мозг гомогенизировали при 4°C. Готовили 10% суспензию в физиологическом растворе, центрифугировали ее при 5000 об/мин в течение 10 мин при 4°C. Инфекционный титр вируса в супернатанте определяли путем титрования в культуре клеток. Эффективность соединений оценивали по снижению величины инфекционного титра вируса в головном мозге животных в опытной группе, получавших препарат, по сравнению с контрольной группой. Инфекционный титр вируса в образцах определяли методом бляшкообразования [17] и выражали в Ig БОЕ/мл.

Результаты и обсуждение

Как свидетельствуют данные табл. 1, включенные в исследование соединения селективно ингибируют развитие вирусиндуцированного ЦПЭ в культуре клеток, на что указывает величина химиотерапевтического индекса (ХТИ).

Результаты изучения противовирусной активности исследуемых соединений на модели летальной герпесвирусной инфекции у белых линейных мышей приведены в табл. 2.

Таблица 1

Эффект производных нетропсина на модели герпетической инфекции в культуре клеток Vero E6

Препарат	ЦД ₅₀ , мкг/мл	ИД ₅₀ , мкг/мл	ИД ₉₅ , мкг/мл	ХТИ
Lys-bis-Nt	355,0 ± 1,9	12,5	50	28,4
15Lys-bis-Nt	162,6 ± 3,4	3,1	18,7 ± 6,2	52,1

Примечание. ЦД₅₀ – концентрация соединения, в присутствии которой погибает 50% неинфицированных клеток; ИД₅₀ – концентрации соединения, ингибирующие развитие вирусиндуцированного ЦПЭ по сравнению с контролем на 50%; ИД₉₅ – концентрации соединения, ингибирующие развитие вирусиндуцированного ЦПЭ по сравнению с контролем на 95–100%; ХТИ – химиотерапевтический индекс, вычисляемый как отношение ЦД₅₀ к ИД₅₀. Представлены результаты двух независимых опытов.

Таблица 2

Влияние производных нетропсина на выживаемость белых мышей BALB/c, инфицированных ВПГ-1 штамм L₂, и репродукцию вируса в их мозге

Соединение	Схема инфицирования	Число выживших животных	Смертность, %	Защита, %	СПЖ, сут	Инфекционный титр вируса, Лг БОЕ/мл	
						опыт 1*	опыт 2*
Контроль вируса	–	17/40	57,5	–	11,6 ± 1,3	3,76 ± 0,03	3,68 ± 0,08
Lys-bis-Nt	20 мг/кг 2 раза в сутки/5 сут	28/40	30	27,5	16,2 ± 1,2	1,59 ± 0,06	1,72 ± 0,04
15Lys-bis-Nt	30 мг/кг 2 раза в сутки/5 сут	17/20	15	42,5	18,5 ± 1,3	1,00 ± 0,08	0,80 ± 0,10

Примечание. Приведены результаты двух независимых опытов; * – приведены результаты трех независимых определений.

Смертность в контрольной группе инфицированных животных, не получавших препарат, составила 57,5% (23/40) в двух независимых экспериментах. Таким образом, Lys-bis-Nt в этих условиях обеспечивал существенную статистически значимую защиту животных от гибели (27,5% в двух независимых экспериментах) и увеличивал СПЖ животных на 4,6 сут по сравнению с контрольной инфицированной, но не леченой группой.

При увеличении разовой дозы 15Lys-bis-Nt до 30 мг/кг в тех же экспериментальных условиях выживаемость животных по сравнению с контрольной группой увеличилась на 45% (снижение смертности с 57,5 до 15%), а СПЖ – более чем на 7 сут.

Из данных, приведенных в табл. 2, также следует, что Lys-bis-Nt и 15Lys-bis-Nt эффективно ингибируют репродукцию ВПГ в головном мозге животных, на что указывает значительное снижение инфекционного титра вируса в опытных группах по сравнению с контролем.

Таким образом, установлено, что исследованные производные нетропсина Lys-bis-Nt и 15Lys-bis-Nt в данных экспериментальных условиях эффективно подавляют репродукцию ВПГ в мозге инфицированных животных, что обеспечивает защиту мышей, инфицированных ВПГ-1, от гибели и приводит к увеличению СПЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного контракта № 02.512.12.2055, Программы РАН по молекулярной и клеточной биологии и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 11-04-02001).

ЛИТЕРАТУРА

1. Андропова В. Л., Гроховский С. Л., Суrowая А. Н. и др. ДНК-связывающая и антивирусная активности бис-нетропсинов, содержащих кластеры остатков лизина на N-конце молекулы // ДАН. — 2004. — Т. 396, № 6. — С. 548–551.
2. Андропова В. Л., Гроховский С. Л., Суrowая А. Н. и др. Действие димерных производных нетропсина и их комбинаций с ацикловиром на герпесвирусную инфекцию мышей // ДАН. — 2007. — Т. 413, № 6. — С. 830–834.
3. Андропова В. Л., Гроховский С. Л., Суrowая А. Н. и др. Антивирусная и цитотоксическая активности производных нетропсина в культуре клеток Vero, инфицированных вирусами осповакцины и герпеса простого первого типа // ДАН. — 2008. — Т. 420, № 3. — С. 688–693.
4. Андропова В. Л., Гроховский С. Л., Дерябин П. Г. и др. Изучение противовирусных свойств ДНК-связывающих соединений производных нетропсина и дистамицина на моделях вирусов герпеса простого типа 1 и осповакцины *in vitro* // Вопр. вирусол. 2010. — № 6. — С. 24–27.

5. Львов Н.Д., Андропова В.Л., Леонтьева Н.А., Галегов Г. А. Изоляция из клинического материала штаммов вируса герпеса простого, обладающих резистентностью к ацикловиру // Вопр. вирусол. — 1999. — Т. 44, № 6. — С. 247–249.
6. Суrowая А. Н., Гроховский С. Л., Гурский Я. Г. и др. Комплекс инициаторного белка UL9 вируса герпеса с ДНК как платформа для создания противовирусных лекарственных агентов нового типа // Биофизика. — 2010. — Т. 55. — С. 239–251.
7. Danve-Szatanec C., Aymard M., Thouvenot D. et al. Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up // J. Clin. Microbiol. — 2004. — Vol. 42. — P. 242–249.
8. De Clerck E., Descamps J., Verheist G et al. Comparative efficacy of antiherpes drugs against different strains of herpes simplex virus // J. Infect. Dis. — 1980. — Vol. 141. — P. 563–573.
9. Dickinson L. A., Gulizia R. J., Trauger J. W. et al. Anti-repression of RNA polymerase II transcription by pyrrole-imidazole polyamides // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1998. — Vol. 95. — P. 12890–12895.
10. Gursky G. V., Zasedatelev A. S., Zhuze A. L. et al. Synthetic sequence-specific ligands // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. — 1983. — Vol. 47. — P. 367–378.
11. Gursky G., Nikitin A., Surowaya A. et al. Isohelical DNA-binding oligomers: antiviral activity and application for the design of nanostructured devices // Nanomaterials for application in medicine and biology / Eds M. Giersig, G. B. Khomutov. 2008. — 17–28.
12. Hill E. L., Hunter G. A., Ellis M. N. *In vitro* and *in vivo* characterization of herpes simplex virus clinical isolates recovered from patients infected with human immunodeficiency virus // Antimicrob. Agents Chemother. — 1991. — Vol. 35. — P. 2322–2328.
13. Khorlin A. A., Krylov A. S., Grokhovsky S. L. et al. A new type of AT-specific ligand constructed of two netropsin-like molecules // FEBS Lett. — 1980. — Vol. 118. — P. 311–314.
14. Kopka M.L., Yoon D., Goodsell D. et al. The molecular origin of DNA drug specificity in netropsin and distamycin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1985. — Vol. 82. — P. 1376–1380.
15. Morfin F., Bilger K., Ooka T. et al. Genetic characterization of thymidine kinase from acyclovir-resistant and susceptible herpes simplex virus type 1 isolated from bone marrow transplant recipients // J. Infect. Dis. — 2000. — Vol. 182. — P. 290–293.
16. Morfin F., Bilger K., Boucher A., et al. HSV excretion after bone marrow transplantation: a 4-year survey // J. Clin. Virol. — 2004. — Vol. 30. — P. 341–345.
17. Sarisky R. T., Nguyen T. T., Duffy K. E. et al. Difference in incidence of spontaneous mutations between herpes simplex virus types 1 and 2 // Antimicrob. Agents Chemother. — 2000. — V. 44. № 6. — P. 1524–1529.
18. Sarisky R. T., Bacon T. H., Boon R. J. et al. Profiling penciclovir susceptibility and prevalence of resistance of herpes simplex virus isolates across eleven clinical trials // Arch Virol. — 2003. — Vol. 148, № 9. — P. 1757–1769.
19. Stranska R., Schuurman R., Nienhuis E. et al. Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the Netherlands: prevalence and characterization // J. Clin. Virol. — 2005. — Vol. 32. — P. 7–18.
20. White S., Szewczyk J. W., Turner J. M. et al. Recognition of the four Watson-Crick base pairs in the DNA minor groove by synthetic ligands // Nature. — 1998. — Vol. 391. — P. 468–471.

Поступила 24.11.11