



Антивирусный эффект нового конъюгата пурина LAS-131 в отношении вируса простого герпеса 1 типа (*Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1*) *in vitro*

Андропова В.Л.¹, Галегов Г.А.¹, Мусияк В.В.², Воздвиженская О.А.², Левит Г.Л.², Краснов В.П.^{2,3}

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия;

²ФГБУН «Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского» Уральского отделения Российской академии наук, 620108, Екатеринбург, Россия;

³ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», 620002, Екатеринбург, Россия

Введение. Вирусы простого герпеса типа 1 (ВПГ-1) чрезвычайно широко распространены во всем мире и, подобно другим герпесвирусам, устанавливают пожизненные инфекции в организме хозяина. Спорадически реактивируясь, ВПГ-1 вызывает рецидивы как у иммунокомпетентных лиц, так и у имеющих ослабленный иммунитет и может стать причиной тяжелых заболеваний (слепота, энцефалит, генерализованные инфекции). Современные противогерпетические лекарственные средства, нацеленные главным образом на ингибирование репликации вирусной ДНК, не всегда оказываются достаточно эффективными, например из-за развития лекарственной резистентности.

Как было показано нами ранее, новое оригинальное соединение LAS-131 высокоселективно ингибирует репродукцию ВПГ-1 (индекс селективности, SI = 63). В присутствии этого вещества в концентрации 20 мкг/мл титр ВПГ-1 (штамм L₂) в условиях одноциклового инфицирования *in vitro* снижается на 4 lg.

Материал и методы. Чтобы установить этап(ы) жизненного цикла вируса, чувствительный(ные) к действию LAS-131, мы применили обычно используемый в мировой практике подход (метод варьирования времени добавления препарата, time-of-addition assay), позволяющий установить временной период, на который можно отсрочить введение тестируемого соединения без потери его противовирусной активности, и сравнить этот показатель с переломным временем введения ингибиторов с хорошо известным механизмом действия (*in vitro*).

Результаты. Нами впервые показано, что LAS-131 сохраняет выраженное противовирусное действие при внесении в экспериментальную систему не позднее 9 ч после инфицирования (p.i.), но не влияет на выход ВПГ-1 из клетки.

Обсуждение. Полученные результаты, а также известные данные о том, что в клеточной культуре, инфицированной ВПГ с высокой множественностью (≥ 1 БОЕ/кл), синтез вирусной ДНК прекращается через 9–12 ч после адсорбции, в совокупности позволяют предположить, что рассматриваемое соединение вмешивается в жизненный цикл ВПГ-1 во время синтеза вирусной ДНК. Для точного установления биомеханизма, на которую действует LAS-131, необходимо проведение дальнейших исследований его механизма действия.

Ключевые слова: вирус простого герпеса; антивирусная активность *in vitro*; метод варьирования времени добавления препарата; механизм действия.

Для цитирования: Андропова В.Л., Галегов Г.А., Мусияк В.В., Воздвиженская О.А., Левит Г.Л., Краснов В.П. Антивирусный эффект нового конъюгата пурина LAS-131 в отношении вируса простого герпеса 1 типа (*Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1*) *in vitro*. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(6): 373–380. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-6-8>.

Для корреспонденции: Андропова Валерия Львовна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ, 123098, Москва, Россия. E-mail: andronova.vl@yandex.ru

Участие авторов: Андропова В.Л. – концепция и дизайн исследования, написание текста, экспериментальная часть, статистический анализ; Галегов Г.А. – концепция и дизайн исследования, написание текста; Мусияк В.В. – экспериментальная часть; Воздвиженская О.А. – экспериментальная часть; Левит Г.Л. – статистический анализ, редактирование текста; Краснов В.П. – написание и редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-13-00231).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 4.10.2020
Принята в печать 12.11.2020

Antiviral effect of novel purine conjugate LAS-131 against Herpes simplex virus type 1 (*Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1*) *in vitro*

Andronova V.L.¹, Galegov G.A.¹, Musiyak V.V.², Vozdvizhenskaya O.A.², Levit G.L.², Krasnov V.P.^{2,3}

¹FSBI «National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia;

²FSBIS I.Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 620108, Ekaterinburg, Russia;

³FSAEI HE «Ural Federal University named after the First President of Russia B.N. Yeltsin», 620002 Ekaterinburg, Russia

Introduction. Herpes simplex viruses type 1 (HSV-1) are extremely widespread throughout the world and, similar to other herpesviruses, establish lifelong persistent infection in the host. Reactivating sporadically, HSV-1 elicits recurrences in both immunocompetent and immunocompromised individuals and can cause serious diseases (blindness, encephalitis, generalized infections). The currently available antiherpetic drugs that aimed mainly at suppressing replication of viral DNA are not always effective enough, for example, due to the development of drug resistance.

As we showed earlier the newly discovered compound LAS-131 exhibits the strong and highly selective inhibitory activity against HSV-1, including strain resistant to acyclovir (selective index, SI = 63). The presence of LAS-131 at a concentration of 20 µg/ml leads to a decrease in the titer of HSV-1 (strain L₂) by 4 lg in a one round of HSV-1 replication.

Material and methods. To establish the step(s) of the virus life cycle that is sensitive to the action of LAS-131, we have applied a widely used approach, that made it possible to determine how long the addition of a compound can be postponed before it loses its antiviral activity (time-of-addition assay), and to compare this indicator with the crucial time of application of inhibitors with a well-known mechanism of action (in cell culture).

Results. It has been shown for the first time that LAS-131 retains a pronounced antiviral effect when introduced into the experimental system no later than 9 hours post-infection (p.i.). However, LAS-131 does not affect the release of HSV-1 from the cell.

Discussion. Together with published data on the termination of the synthesis of viral DNA 9–12 h after the adsorption in a cell culture infected with HSV with a high multiplicity (≥1 PFU/cell), our results suggest that LAS-131 interferes the life cycle of HSV-1 during synthesis of viral DNA. Further studies of the mechanism of action are necessary to establish definitely the biological target for this compound.

Key words: *herpes simplex virus; in vitro antiviral activity; time-of-addition assay; mechanism of action*

For citation: Andronova V.L., Galegov G.A., Musiyak V.V., Vozdvizhenskaya O.A., Levit G.L., Krasnov V.P. Antiviral effect of novel purine conjugate LAS-131 against Herpes simplex virus type 1 (*Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1*) *in vitro*. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2020; 65(6): 373-380 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-6-8>

For correspondence: Valeriya L. Andronova, Ph.D., Leading Researcher of the Laboratory of Chemotherapy of Viral Infections, FSBI «National Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia. E-mail: andronova.vl@yandex.ru

Information about authors:

Andronova V.L., <http://orcid.org/0000-0002-2467-0282>

Galegov G.A., <http://orcid.org/0000-0001-6162-1650>

Musiyak V.V., <http://orcid.org/0000-0001-7177-5709>

Vozdvizhenskaya O.A., <http://orcid.org/0000-0001-8349-6061>

Levit G.L., <http://orcid.org/0000-0002-0964-9311>

Krasnov V.P., <http://orcid.org/0000-0003-1411-6218>

Contribution: Andronova V.L. – concept and design of the study, writing of the text; experimental part, statistical analysis; Galegov G.A. – concept and design of the study, writing of the text; Musiyak V.V. – experimental part; Vozdvizhenskaya O.A. – experimental part; Levit G.L. – statistical analysis, supervising of the text; Krasnov V.P. – writing and supervising of the text.

Acknowledgments. The work was financially supported by the Russian Science Foundation (project No. 19-13-00231).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 4 October 2020
Accepted 12 November 2020

Введение

Вирус простого герпеса 1 типа (ВПГ-1) чрезвычайно широко распространён – по последним данным, представленным ВОЗ, во всём мире инфицировано около 67% населения в возрасте до 50 лет [1]. После первичного инфицирования ВПГ устанавли-

вает пожизненную латентную инфекцию с периодическими рецидивами, тяжесть клинического течения которых напрямую зависит от функционального состояния иммунной системы: у иммунокомпromитированных пациентов герпес может поражать практически все органы и ткани организма и даже при-

водить к летальному исходу. Доступные в настоящее время этиотропные противогерпетические препараты 1 и 2 рядов (ингибиторы вирусной ДНК-полимеразы) снижают тяжесть симптомов, уменьшают продолжительность и частоту рецидивов, однако не способны элиминировать вирус из организма и устранить скрытые ВПГ-инфекции. Помимо этого, они могут оказаться недостаточно эффективными в случае развития лекарственной резистентности у вируса [2, 3], поэтому поиск новых противовирусных агентов сохраняет актуальность для практического здравоохранения.

Как было установлено нами ранее, LAS-131 высокоселективно ингибирует репродукцию ВПГ-1/L₂, включая резистентные к ацикловиру (АЦВ) и фосфономуравьиной кислоте (ФМК) варианты вируса с установленным молекулярным механизмом формирования лекарственной резистентности [4]: ИД₅₀ 1,93 мкг/мл, ЦД₅₀ 122 мкг/мл, индекс селективности (SI) 63 [5, 6]. Полученные результаты позволяют предположить, что это соединение ингибирует репродукцию вируса способом, отличным от такового у АЦВ и ФМК.

Целью данной работы было установление стадии вирусной репродукции, чувствительной к действию LAS-131.

Материал и методы

Препараты. LAS-131 ((3S)-4-[6-(пурин-6-ил-амино)гексаноил]-3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2H-[1,4]-бензоксазин) синтезирован в ФГБУН «Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского» Уральского отделения Российской академии наук (Екатеринбург, Россия). Ацикловир (9-[(2-гидроксизотокси)-метил]гуанин (АЦВ, регистрационный номер: 59277-89-3) и тринатриевой соли фосфономуравьиной кислоты гексагидрат (ФМК, регистрационный номер 34156-56-4) применяли в качестве референс-препаратов (Sigma Aldrich, США).

Клетки. Использовали 24-часовую культуру клеток почки зелёной мартышки (*Chlorocebus sabaues*) Vero E6. Ростовый средой для культур клеток служила питательная среда ИГЛА МЕМ (ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова» РАН (ФНЦИРИП), Москва, Россия), содержащая 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («ПанЭко», Москва, Россия) и 100 ЕД/мл бензилпенициллина.

Вирусы. Вирус простого герпеса 1 типа, штамм L₂ (ВПГ-1/L₂) получен в лаборатории Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского (подразделение ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ (ФНИЦЭМ, Москва, Россия)). Вирус поддерживали путём пассирования с использованием среды поддержки, состоящей из питательных сред ИГЛА oiusdfghqwe65МЕМ и 199 (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова» РАН, Москва, Россия), соединённых в соотношении 1 : 1.

Определение инфекционного титра вируса. Материалом для исследования служили клеточные культуры со средой поддержки, подвергшиеся 3-кратному замораживанию–оттаиванию. Полученную суспензию центрифугировали при 5000 об/мин в течение 5 мин при 4 °С и определяли инфекционный титр вируса в полученном супернатанте методом бляшкообразования в соответствии с протоколом, описанным Sarisky R.T. и соавт. [7]. Использовали 24-луночные планшеты (Corning, США) со сформировавшимся клеточным монослоем. Клетки инфицировали серийными разведениями ВПГ-1 с кратностью 10. Инфекционный титр определяли после 48 ч инкубации.

Построение ростовой кривой. Для построения ростовой кривой в чашки Петри (Nunc, Дания) со сформировавшимся монослоем культуры клеток Vero E6 вносили ВПГ-1/L₂ в разведении, обеспечивающем множественность инфицирования (m.o.i.) 10 БОЕ/кл. Для синхронизации процесса пенетрации после 1-часовой адсорбции при 4 °С клетки отмывали от не связавшихся с ними вирусных частиц холодным физиологическим раствором и вносили нагретую до 37 °С среду поддержки. Инфицированные клетки инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Через 0, 2, 5, 7, 9, 11, 13 и 23 ч после инфицирования (p.i.) клетки с культуральной средой подвергали 3-кратному замораживанию–оттаиванию и определяли инфекционный титр вируса.

Оценка влияния LAS-131 на связывание вируса с рецепторами на поверхности клетки. Монослойные культуры клеток Vero E6, выращенные в чашках Петри, предварительно инкубировали в течение 0, 1 и 2 ч при 4 °С с вирусной суспензией, содержащей (опыт) или не содержащей (контроль) тестируемое соединение. Величина m.o.i. составляла 10 БОЕ/кл, концентрация LAS-131 в вируссодержащей жидкости – 20 мкг/мл. Затем клетки отмывали от неадсорбированного вируса холодным физиологическим раствором, вносили среду поддержки без препарата и инкубировали при 37 °С. Через 23 ч p.i. клетки вместе со средой поддержки подвергали 3-кратному замораживанию–оттаиванию и определяли титр вируса [8].

Оценка влияния LAS-131 на проникновение ВПГ-1 в клетку. Монослой клеток Vero E6, выращенные в 24-луночных пластиковых планшетах (Corning, США), предварительно охлаждали до 4 °С и инокулировали с m.o.i. 10 БОЕ/кл в течение 2 ч при той же температуре. Не связанные с клеточной поверхностью вирусные частицы удаляли путём промывания клеточных культур холодным физиологическим раствором и, чтобы обеспечить проникновение вируса в клетку, вносили предварительно нагретую до 37 °С среду, содержащую (опыт) или не содержащую (контроль) LAS-131 (20 мкг/мл). После инкубации клеток при 37 °С в течение 0, 30, 60 или 90 минут среду удаляли и подвергали клетки воздействию цитратного буфера (pH 3,0) в течение 1 мин при комнатной температуре для инактивации вируса, не проникшего в клетки-мишени. Затем клетки отмывали тёплым

раствором Хенкса и вносили среду поддержки без препарата [8].

Оценка влияния LAS-131 на выход вируса из клетки проводилась в соответствии с протоколом, описанным MacLean С.А. [8]. Монослои клеток, выращенные в чашках Петри, заражали с *m.o.i.* 10 БОЕ/кл и инкубировали при 37 °С. LAS-131 вводили в экспериментальную систему сразу после адсорбции в составе среды поддержки (20 мкг/мл). Инфицированная необработанная культура клеток служила контролем. Через 23 ч титр вируса определяли методом бляшкообразования раздельно в культуральной среде и в клетках.

Статистическая обработка полученных в ходе исследования данных проводилась в соответствии с методами, описанными Glantz S.A. [9], с использованием следующих характеристик: среднее арифметическое значение m и среднее квадратическое отклонение σ . Уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез во всех случаях составлял 0,05.

Результаты

С целью установления этапа жизненного цикла ВПГ, на который направлено антивирусное действие

LAS-131, было проведено комплексное исследование, включающее построение ростовой кривой вируса, изучение зависимости выраженности антивирусной активности вещества от времени введения его в экспериментальную систему (методом варьирования времени добавления препарата; *time-of-addition assay*, ТАА), его влияния на адсорбцию вирусных частиц на клеточной поверхности, эффективности проникновения вируса в клетку (пенетрацию) и выхода из клетки.

Динамика накопления инфекционного вируса в культуре клеток в течение 1 цикла репродукции показана на **рис. 1** (ростовая кривая). Как видно из приведённых данных, после 5-часового латентного периода начинается экспоненциальный рост титра вируса, продолжающийся до 9 ч *p.i.*, после чего скорость накопления вируса в экспериментальной системе постепенно снижается. К 13 ч *p.i.* показатель титра достигает плато и существенно не изменяется в процессе дальнейшей инкубации на протяжении последующих 10 ч (до 23 ч *p.i.* включительно).

С целью определения этапа репродукции ВПГ-1, чувствительного к LAS-131, мы изучили изменение биологической активности соединения в зависи-

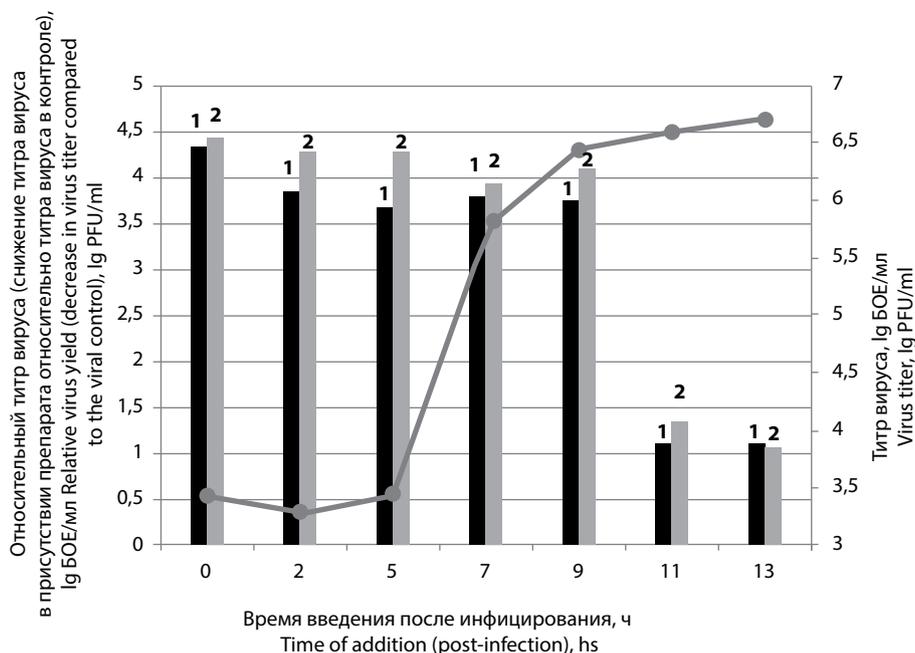


Рис. 1. Влияние времени введения LAS-131 и фосфономуравьиной кислоты (ФМК) на репродукцию вируса простого герпеса 1 типа (*m.o.i.* 10 БОЕ/кл).

Кривая демонстрирует динамику изменения титра вируса при инкубации инфицированных клеток без препарата. Гистограмма представляет среднее значение снижения титра вируса LAS-131 (1) или ФМК (2) по сравнению с контрольной (необработанной инфицированной) культурой клеток. LAS-131 (20 мкг/мл) или ФМК (100 мкг/мл) добавляли в указанные моменты времени. Инфицированная в тех же условиях, но без препарата культура клеток служила контролем. За временную точку «0» принималось время после завершения адсорбции. Продолжительность инкубации – 23 ч. Титр вируса в контроле составил $6,36 \pm 0,21$ lg БОЕ/мл. Приведены результаты 2 независимых опытов.

Fig. 1. Influence of the time of addition of LAS-131 and phosphonoformic acid (PFA) on the reproduction of herpes simplex virus type 1 (*m.o.i.* 10 PFU/cell).

The single-cycle growth curve represents the dynamics of the change in the titer of the virus during incubation of infected cells without the drug. The bar graph demonstrates the mean decrease in LAS-131 virus titer (1) or PFA (2) compared to the control (untreated infected) cell culture. LAS-131 (20 $\mu\text{g/ml}$) or PFA (100 $\mu\text{g/ml}$) were added at the indicated time points. The cell culture infected under the same conditions, but without the preparation, served as a control. The time point «0» was taken as the time after the completion of adsorption. The incubation time was 23 hours. The virus titer in the control was 6.36 ± 0.21 lg PFU/ml. The results of 2 independent experiments are presented.

мости от времени его введения в экспериментальную систему в условиях одноциклового опыта при *m.o.i.* 10 БОЕ/кл, для чего исследуемое вещество в нецитотоксической концентрации 20 мкг/мл (10 ИД₅₀) добавляли во временные точки, соответствующие различным этапам вирусного цикла (ТАА). Инфицированная необработанная клеточная культура служила контролем. В качестве препаратов сравнения использовали ФМК в концентрации 100 мкг/мл (6,4 ИД₅₀) и АЦВ в концентрации 100 мкг/мл (250 ИД₅₀). Все препараты добавляли в точно определённые моменты времени. Титр вируса в контроле через 23 ч *p.i.* составил $6,36 \pm 0,21$ lg БОЕ/мл.

Как следует из гистограммы, представленной на **рис. 1**, ингибирующая активность как LAS-131, так и ФМК сохранялась при введении через 0, 3, 5, 7 и 9 ч *p.i.*, а при добавлении их после 9 ч *p.i.* значительно снижалась.

При введении второго референс-препарата – АЦВ (100 мкг/мл или 250 ИД₅₀) через 0, 3, 5, 7 или 9 ч *p.i.* в тех же экспериментальных условиях (*m.o.i.* 10 БОЕ/кл) репродукция вируса супрессировалась до титров ниже чувствительности метода, т.е. снижение титра вируса по сравнению с контрольной инфицированной культурой составило не менее 6 lg (**рис. 2**). Однако ингибирующий эффект АЦВ был значительно снижен при его добавлении через 11 ч *p.i.*: разница титров вируса в опыте и контроле составила лишь 1,6 lg БОЕ/мл. Подобным образом противовирусная активность LAS-131 также существенно снижалась при его внесении в культуральную среду спустя 11 ч *p.i.*

На следующем этапе изучалось влияние LAS-131 на связывание вируса с рецепторами на поверхно-

сти клетки и на проникновение ВПГ-1 в клетку, как подробно описано в разделе «*Материал и методы*». Результаты (см. **таблицу**) указывают на то, что LAS-131 не влияет на эффективность адсорбции ВПГ-1: инфекционные титры в контрольной и опытной культурах существенно не отличались, даже если продолжительность адсорбции составляла 2 ч – 6,23 и 6,20 lg БОЕ/мл соответственно. Кроме того, согласно данным таблицы, эффективность проникновения вируса в клетки в присутствии LAS-131 не снижалась по сравнению с контрольной инфицированной клеточной культурой.

Оценка влияния LAS-131 на выход вирусных частиц из клетки описана в разделе «*Материал и методы*» [9]. Как показывают представленные на **рис. 3** результаты, по сравнению с контрольной культурой инфекционный титр внеклеточного вируса был снижен на 2,93 lg БОЕ/мл в присутствии LAS-131, так же как и внутриклеточного (3,01 lg). Число внеклеточных инфекционных вирусных частиц в контрольной культуре было в 7,76 раз меньше, чем внутри клетки. В присутствии LAS-131 это соотношение было равно 6,46. Отсюда можно сделать вывод, что LAS-131 существенно не влияет на эффективность последнего этапа жизненного цикла вируса – выход из клетки.

Обсуждение

Обобщая вышеизложенное, можно заключить, что в условиях одноциклового инфицирования LAS-131 сохраняет способность эффективно ингибировать репродукцию ВПГ-1 при внесении в экспериментальную

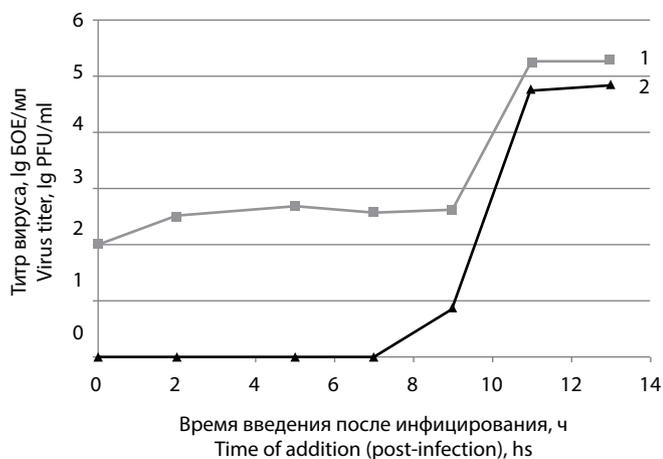


Рис. 2. Влияние времени введения LAS-131 и ацикловира (АЦВ) на репродукцию вируса простого герпеса 1 типа (*m.o.i.* 10 БОЕ/кл).

1 – LAS-131 (100 мкг/мл)
2 – АЦВ (20 мкг/мл)

Fig. 2. Influence of the time of addition of LAS-131 and acyclovir (ACV) on the reproduction of herpes simplex virus type 1 (*m.o.i.* 10 PFU/cell).

1 – LAS-131 (100 µg/ml)
2 – ACV (20 µg/ml)

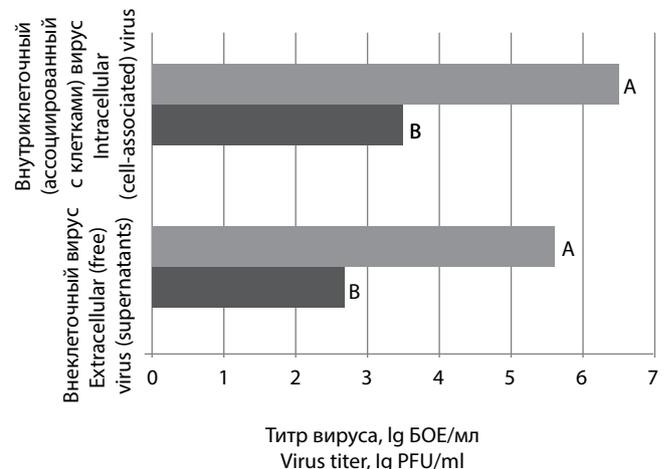


Рис. 3. Влияние LAS-131 на выход вируса простого герпеса 1 типа из клетки в условиях одноциклового инфицирования (*m.o.i.* 10 БОЕ/кл).

Соединение вводили сразу после адсорбции. Учитывали результаты 2 независимых опытов.

A – титр вируса в контроле; B – титр вируса в присутствии LAS-131.

Fig. 3. Effect of LAS-131 on the infectivity of intracellular and extracellular herpes simplex virus type 1 progeny under conditions of single-cycle infection (*m.o.i.* 10 PFU/cell).

The compound was introduced immediately after adsorption. The results of 2 independent experiments were considered.

A – virus titer in control; B – virus titer in the presence of LAS-131.

систему не позднее 9 ч p.i. и не влияет на выход вируса из клетки. В соответствии с данными литературы [10, 11] синтез ДНК ВПГ-1 начинается через 2 ч p.i., достигает максимальной скорости к 4 ч и сохраняется до 8 ч p.i., после чего продукция её снижается на 30%. Спустя 12 ч p.i. репликация ДНК практически прекращается. Таким образом, наиболее вероятно, что LAS-131 ингибирует репродукцию ВПГ главным образом путём супрессии репликации вирусной ДНК. Действительно, профиль ТАА ФМК, хорошо известного ингибитора вирусной ДНК-полимеразы, соответствует таковому для LAS-131 (см. **рис. 1**). Как известно, ФМК имитирует структуру пирофосфата (PP_i), высвобождение которого из дезокси-нуклеотидов (dNTP) в процессе элонгации репликации запускает последнюю стадию репликационного процесса – транслокацию (перемещение ДНК-полимеразы на 1 нуклеотид вперёд по матрице ДНК), после чего может произойти присоединение очередного нуклеотида. Взаимодействуя с PP_i-связывающим центром фермента, ФМК образует неактивный комплекс и ингибирует активность ДНК-полимеразы вируса [12].

Результаты, полученные нами при изучении влияния времени введения LAS-131 на его противовирусную активность (**рис. 2**), согласуются с данными литературы: описана подобная зависимость уровня инактивации ВПГ-1 и ВПГ-2 от времени добавления в экспериментальную систему АЦВ в условиях одноциклового инфицирования [13, 14]. В частности, АЦВ в концентрации 50 мкг/мл при добавлении через 0, 2, 4 и 8 ч p.i. эффективно (на 90%) ингибирует репродукцию ВПГ, но при его введении через 12 ч p.i. противовирусная активность препарата резко снижается.

В наших экспериментах был использован АЦВ в более высокой концентрации – 100 мкг/мл (**рис. 2**), что также привело к глубокой супрессии репродукции вируса при введении препарата спустя 9 ч p.i., но при добавлении вещества через 11 ч p.i. его противовирусная активность значительно снизилась. Известно, что механизм действия АЦВ на герпесвирусную инфекцию отличается от такового ФМК. Оба соединения ингибируют активность ДНК-полимера-

зы ВПГ. Однако, в отличие от ФМК, после внутриклеточного кинирования до активной трифосфатной формы (1-й этап кинирования до монофосфата катализируется вирусной тимидинкиназой, 2-й и 3-й – клеточными ферментами) АЦВ как структурный аналог дезоксигуанозина трифосфата (dGTP) встраивается в синтезирующуюся цепь ДНК вируса, в результате чего синтез терминируется, а также связывается с нуклеотид-связывающим центром ДНК-полимеразы и ингибирует активность фермента [2, 15].

Таким образом, 2 соединения с различными механизмами противогерпетического действия, но использующие одну и ту же биомшень (ДНК-полимеразу ВПГ) и супрессирующие синтез ДНК ВПГ-1, имеют профиль ТАА, близкий к полученному для LAS-131. Учитывая, что окончание чувствительного к действию LAS-131 периода совпадает со временем снижения эффективности синтеза вирусной ДНК, представляется наиболее вероятным, что данное соединение, подобно АЦВ и ФМК, ингибирует репликацию вирусного генома.

ДНК-полимераза ВПГ сформирована 2 вирусными белками, pU_L30 и pU_L42, каждый из которых может быть мишенью для действия противогерпетических агентов. Однако в репликации ДНК ВПГ участвуют ещё 5 кодируемых вирусом белков: pU_L9 – инициаторный белок (связывается с точками начала репликации, ori); pU_L29 (SSB/ICP8) – белок, связывающийся с одноцепочечной ДНК (стимулирует активность хеликазо-праймазного комплекса и полимеразную активность, негативно регулирует транскрипцию β-белков после репликации вирусной ДНК), а также гетеротримерный хеликазо-праймазный комплекс (pU_L5/pU_L8/pU_L52) [16]. Каждый из них потенциально способен выступать в качестве биомшени для LAS-131.

Кроме того, нельзя исключить возможность супрессии рассматриваемым агентом процесса репродукции ВПГ-1 в результате ингибирования активности ферментов, участвующих в метаболизме нуклеотидов, например рибонуклеотидредуктазы (pU_L39/pU_L40) [17], или на этапах сборки капсида и упаковки в него вирусной ДНК, происходящих параллельно с репликацией. Так, для нарезания и упаковки ДНК в капсид

Влияние LAS-131 на ранние стадии репродукции ВПГ-1 в условиях одноциклового инфицирования

Influence of LAS-131 on early stages of HSV-1 reproduction under conditions of single-cycle infection

Условия эксперимента Experimental conditions	Влияние LAS-131 на адсорбцию вируса Effect of LAS-131 on virus adsorption			Влияние LAS-131 на пенетрацию вируса Effect of LAS-131 on virus penetration			
	0	1	2	0	0,5	1	1,5
Продолжительность контакта вируса с препаратом, ч The duration of contact of the virus with the drug, hr	0	1	2	0	0,5	1	1,5
Инфекционный титр вируса, Ig БОЕ/мл Virus infectious titer, Ig PFU/ml							
Контроль вируса Virus control	4,55±0,15	6,24±0,06	6,23±0,13	6,27±0,03	6,09±0,21	6,21±0,33	6,27±0,03
LAS-131, 20 мкг/мл	4,79±0,09	6,12±0,12	6,20±0,10	6,27±0,09	6,27±0,03	6,38±0,14	6,24±0,14
LAS-131, 20 µg/ml	4,79±0,09	6,12±0,12	6,20±0,10	6,27±0,09	6,27±0,03	6,38±0,14	6,24±0,14

Примечание. Приведены результаты 2 независимых экспериментов.

Note. Results of 2 independent experiments are shown.

необходимы рU_L6 (портальный белок), рU_L15, рU_L17, рU_L25, рU_L28, рU_L32 и рU_L33 [18]. рU_L14 вовлечен в транспорт рU_L17, рU_L26, рU_L35, рU_L33 в ядро клетки. Наконец, ещё 8 кодируемых вирусом белков, формирующих капсид (основной белок капсида рU_L19 (MCP/ICP5/VP5), малый капсидный белок рU_L35 (VP26), портальный белок рU_L6, а также рU_L38 (VP19C), рU_L18 (VP23), рU_L17, рU_L25 и рU_L36) [19] также могут быть вовлечены в механизм противовирусного действия LAS-131.

Представленные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. LAS-131 не оказывает значительного влияния на проникновение ВПГ-1 в клетку (адсорбция и пенетрация) и выход вируса из клетки.

2. В условиях одноциклового опыта зафиксирован временной период (до 9 ч р.и. включительно), в течение которого репродукция ВПГ-1 сохраняет чувствительность к LAS-131, из чего можно предположить его воздействие на процесс репликации. В пользу этого свидетельствуют данные, полученные для АЦВ и ФМК.

ЛИТЕРАТУРА

- ВОЗ. Вирус простого герпеса. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>. (дата доступа 1 мая 2020 г.).
- De Clercq E., Li G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016; 29(3): 695–747. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15>.
- Андропова В.Л. Современная этиотропная химиотерапия герпесвирусных инфекций: достижения, новые тенденции и перспективы. Альфагерпесвирусы (часть I). *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(3): 106–14. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-106-114>.
- Коровина А.Н., Гуськова А.А., Скоблов М.Ю., Андропова В.Л., Галегов Г.А., Кочетков С.Н. и др. Анализ мутаций в генах ДНК-полимераз и тимидинкиназ клинических изолятов вируса простого герпеса, резистентных к антигерпетическим препаратам. *Молекулярная биология*. 2010; 44(3): 488–96. <https://doi.org/10.1134/s0026893310030192>.
- Мусияк В.В., Галегов Г.А., Андропова В.Л., Краснов В.П., Левит Г.Л., Груздев Д.А. и др. (3S)-4-[6-(пурин-6-иламино)гексаноил]-3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2H-[1,4]-бензоксазин и (3R)-4-[6-(пурин-6-иламино)гексаноил]-3,4-дигидро-3-метил-7,8-дифтор-2H-[1,4]бензоксазин, обладающие противовирусной активностью. Патент РФ №2644351; 2018.
- Krasnov V.P., Musiyak V.V., Vozdvizhenskaya O.A., Galegov G.A., Andronova V.L., Gruzdev D.A. et al. N-[ω-(Purin-6-yl)aminoalkanoil] derivatives of chiral heterocyclic amines as promising anti-herpesvirus agents. *Eur. J. Org. Chem.* 2019; 2019: 4811–21. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201900727>.
- Sarisky R.T., Nguyen T.T., Duffy K.E., Wittrock R.J., Leary J.J. Difference in incidence of spontaneous mutations between herpes simplex virus types 1 and 2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44(6): 1524–9. <https://doi.org/10.1128/aac.44.6.1524-1529.2000>.
- MacLean C.A. HSV entry and spread. In: Brown S.M., MacLean A.R., eds. *Herpes Simplex Virus Protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 1998: 9–18.
- Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. Пер. с англ. М.: Практика; 1999.
- Aranda-Anzaldo A. Evidence for an altered kinetics of DNA excision-repair in cells infected by herpes simplex virus type 1. *Acta Virol.* 1992; 36(5): 417–27. PMID: 1364017.

- Dremela S.E., DeLuca N.A. Genome replication affects transcription factor binding mediating the cascade of herpes simplex virus transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019; 116(9): 3734–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818463116>.
- Crumpacker C.S. Mechanism of action of Foscarnet against viral polymerases. *Am. J. Med.* 1992; 92(2A): 3S–7S. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(92\)90329-a](https://doi.org/10.1016/0002-9343(92)90329-a).
- Callegaro S., Perrone R., Scalabrin M., Doria F., Palù G., Richter S.N. A core extended naphthalene diimide G-quadruplex ligand potentially inhibits herpes simplex virus 1 replication. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 2341. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02667-3>.
- Song S., Qiu M., Chu Y., Chen D., Wang X., Su A., et al. Down-regulation of cellular c-Jun N-terminal protein kinase and NF-κB activation by berberine may result in inhibition of herpes simplex virus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(9): 5068–78. <https://doi.org/10.1128/AAC.02427-14>.
- Elion G.B. Mechanism of action and selectivity of acyclovir. *Am. J. Med.* 1982; 73(1A): 7–13. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(82\)90055-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(82)90055-9).
- Stengel G., Kuchta R.D. Coordinated leading and lagging strand DNA synthesis by using the Herpes Simplex Virus 1 replication complex and minicircle DNA templates. *J. Virol.* 2011; 85(2): 957–67. <https://doi.org/10.1128/JVI.01688-10>.
- Loret S., Guay G., Lippe R. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J. Virol.* 2008; 82(17): 8605–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00904-08>.
- Weller S.K., Coen D.M. Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2012; 4(9): a013011. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013011>.
- Heming J.D., Conway J.F., Homa F.L. Herpesvirus capsid assembly and DNA packaging. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 2017; 223: 119–42. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53168-7_6.

REFERENCES

- WHO. Herpes simplex virus. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>. (accessed May 1, 2020).
- De Clercq E., Li G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016; 29(3): 695–747. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15>.
- Andronova V.L. Modern ethiotropic chemotherapy of herpesvirus infections: advances, new trends and perspectives. *Alpha-herpesvirinae (part I). Voprosy virusologii*. 2018; 63(3): 106–14. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-3-106-114> (in Russian).
- Korovina A.H., Gus'kova A.A., Skoblov M.Yu., Andronova V.L., Galegov G.A., Kochetkov S.N., et al. Mutations in the DNA polymerase and thymidine kinase genes of herpes simplex virus clinical isolates resistant to antiherpetic drugs. *Moekulyarnaya biologiya*. 2010; 44(3): 488–96. <https://doi.org/10.1134/s0026893310030192> (in Russian).
- Musiyak V.V., Galegov G.A., Andronova V.L., Krasnov V.P., Levit G.L., Gruzdev D.A., et al. (3S)-4-[6-(Purine-6-ylamino)hexanoil]-3,4-dihydro-3-methyl-7,8-difluor-2H-[1,4]benzoxazine and (3R)-4-[6-(purine-6-ylamino)hexanoil]-3,4-dihydro-3-methyl-7,8-difluor-2H-[1,4]benzoxazine with antiviral activity. Patent RF No. 2644351; 2018 (in Russian).
- Krasnov V.P., Musiyak V.V., Vozdvizhenskaya O.A., Galegov G.A., Andronova V.L., Gruzdev D.A., et al. N-[ω-(Purin-6-yl)aminoalkanoil] derivatives of chiral heterocyclic amines as promising anti-herpesvirus agents. *Eur. J. Org. Chem.* 2019; 2019: 4811–21. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201900727>.
- Sarisky R.T., Nguyen T.T., Duffy K.E., Wittrock R.J., Leary J.J. Difference in incidence of spontaneous mutations between herpes simplex virus types 1 and 2. *Antimicrob. Agents Chemother.*

- 2000; 44(6): 1524–9. <https://doi.org/10.1128/aac.44.6.1524-1529.2000>.
8. MacLean C.A. HSV entry and spread. In: Brown S.M., MacLean A.R., eds. *Herpes Simplex Virus Protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 1998: 9–18.
 9. Glantz S.A. *Primer of Biostatistics*. New-York: McGraw-Hill; 1994.
 10. Aranda-Anzaldo A. Evidence for an altered kinetics of DNA excision-repair in cells infected by herpes simplex virus type 1. *Acta Virol*. 1992; 36(5): 417–27. PMID: 1364017.
 11. Dremela S.E., DeLuca N.A. Genome replication affects transcription factor binding mediating the cascade of herpes simplex virus transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019; 116(9): 3734–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818463116>.
 12. Crumpacker C.S. Mechanism of action of Foscarnet against viral polymerases. *Am. J. Med.* 1992; 92(2A): 3S-7S. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(92\)90329-a](https://doi.org/10.1016/0002-9343(92)90329-a).
 13. Callegaro S., Perrone R., Scalabrin M., Doria F., Palù G., Richter S.N. A core extended naphthalene diimide G-quadruplex ligand potently inhibits herpes simplex virus 1 replication. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 2341. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02667-3>.
 14. Song S., Qiu M., Chu Y., Chen D., Wang X., Su A., et al. Down-regulation of cellular c-Jun N-terminal protein kinase and NF- κ B activation by berberine may result in inhibition of herpes simplex virus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(9): 5068–78. <https://doi.org/10.1128/AAC.02427-14>.
 15. Elion G.B. Mechanism of action and selectivity of acyclovir. *Am. J. Med.* 1982; 73(1A): 7–13. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(82\)90055-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(82)90055-9).
 16. Stengel G., Kuchta R.D. Coordinated leading and lagging strand DNA synthesis by using the Herpes Simplex Virus 1 replication complex and minicircle DNA templates. *J. Virol.* 2011; 85(2): 957–67. <https://doi.org/10.1128/JVI.01688-10>.
 17. Loret S., Guay G., Lippe R. Comprehensive characterization of extracellular herpes simplex virus type 1 virions. *J. Virol.* 2008; 82(17): 8605–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00904-08>.
 18. Weller S.K., Coen D.M. Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2012; 4(9): a013011. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013011>.
 19. Heming J.D., Conway J.F., Homa F.L. Herpesvirus capsid assembly and DNA packaging. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 2017; 223: 119–42. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53168-7_6.