

Пошук інгібіторів ВІЛ та герпесу серед похідних каркасных сполук та піридинкарбонових кислот

Г. І. Даниленко, С. Л. Рибалко¹, Ю. М. Максимов², Н. І. Шарикіна²,
С. Т. Дядюн¹, В. Г. Аркадьєв², В. П. Даниленко², Н. В. Нестєрова³,
С. В. Гужова, Т. А. Бухтіарова², В. М. Овруцький², О. Ю. Захарцев¹,
Т. Ф. Грицак¹, О. В. Максименко¹, Н. О. Вринчану

Інститут органічної хімії та нафтохімії НАН України
Вул. Мурманська, 1, Київ, 253094, Україна

¹ Інститут епідеміології та інфекційних хвороб МОЗ України
Узвіз Протасів яр, 4, Київ, 252038, Україна

² Інститут фармакології і токсикології АМН України
Вул. Е. Потьє, 14, Київ, 252057, Україна

³ Інститут мікробіології та вірусології ім. акад. Д. К. Заболотного НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 252143, Україна

Показано, що адамантанове похідне (5) пригнічує реплікацію ВІЛ на рівні азидотиї людини та одночасно виявляє імуностимулюючі здібності. Похідним ізонікотинової кислоти (2) і норборнана (5) притаманна антигерпетична та імуностимулююча активність.

Вступ. Пошук нових хіміотерапевтичних препаратів, що могли б знайти застосування як вірусні інгібітори, здійснюється, в основному, серед похідних нуклеозидів та каркасных сполук. До недоліків першої групи сполук можна віднести імуносупресорну дію, порівняно високу токсичність, складність синтезу. Стосовно другої групи препаратів, то вивчався переважно її вплив на вірус грипу.

У літературі зустрічаються поодинокі згадки про дію каркасных сполук на репродукцію ВІЛ [1]. У той же час відомо, що похідним адамантану та споріднених з ним структур притаманний широкий спектр антивірусної дії (грип, герпес, гепатит, віспа, сказ, кір, пікорнавіруси, віруси лісів Семліки та тютюнової мозаїки). Можна зробити висновок, що мішенню для похідних поліедранів служать ферментні системи вірусів, тому слід очікувати, що серед каркасных сполук існують інгібітори ВІЛ. У

літературі немає чітких даних про дію вже досліджених похідних поліедранів на імунний статус організму, тому здавалося виправданим визчення впливу похідних каркасных сполук та піридинкарбонових кислот як на взаємодію вірусу з клітиною, так і на імунний статус організму.

Матеріали і методи. Як об'єкти досліджень було обрано антигрипозний препарат дейтифорин [2, 3] (сполука 1), протизапальний препарат карбобензпірид [4] (сполука 2). Відомо, що полікарбонові кислоти перешкоджають адсорбції вірусу імунодефіциту людини на оболонці клітин на різних стадіях циклу репродукції [5]. При цьому полімерні кислоти є неспецифічними індукторами інтерферону [6], що стало приводом для дослідження сополімеру N-вінілпіролідон — акрилова кислота (сполука 3) та цього ж сополімеру, модифікованого дейтифорином (сполука 4). Крім цього, вивчено антивірусну та імуотропну дію похідного адамантоїлгідразину (сполука 5).

Лікування ВІЛ-інфекції часто зводиться до боротьби з опортуністичними захворюваннями, зек-

© Г. І. ДАНИЛЕНКО, С. Л. РИБАЛКО, Ю. М. МАКСИМОВ,
Н. І. ШАРИКІНА, С. Т. ДЯДЮН, В. Г. АРКАДЬЄВ,
В. П. ДАНИЛЕНКО, Н. В. НЕСТЄРОВА, С. В. ГУЖОВА,
Т. А. БУХТІАРОВА, В. М. ОВРУЦЬКИЙ, О. Ю. ЗАХАРЦЕВ,
Т. Ф. ГРИЦАК, Н. П. ЧЕНЦОВА, Н. О. ВРИНЧАНУ, 1999

рема, з герпесом. Нами було досліджено вплив сполук (2) і (4) на реплікацію вірусу герпесу в дослідях *in vitro* та *in vivo*.

Вплив на репродукцію ВІЛ. Сполуки (3) та (5) вивчені як інгібітори вірусу імунодефіциту людини на моделях гострої і хронічної інфекції.

Інтактні клітини культури МТ-4 обробляли розчинами сполук (3) та (5). Масові частки цих сполук складали 100 мкг/мл. Через 15 хв інфікували ВІЛ-1 та після інкубації протягом 5 діб при температурі 37 °С в атмосфері 5 % CO₂ визначали рівень експресії антигена р24 та інфекційний титр вірусу. Для порівняння використовували азидотимідин (АЗТ) у вигляді розчину з концентрацією 100 мкг/мл.

На моделі хронічної інфекції дослідження проводили *in vitro* в культурі МТ-4 з вірусом ВІЛ-1, що продукується культурою МТ-4/В III, з подальшим визначенням антигена р24 в тест-системі Еб-бот — антиген. До хронічно інфікованих культур МТ-4/В III додавали сполуки (3) або (5) у дозах 100 мкг/мл. Інкубували протягом 24 год при 37 °С в атмосфері 5% CO₂, а потім в культуральному середовищі визначали концентрацію експресованого антигена р24 ВІЛ-1 та його інфекційний титр (табл. 1).

Як видно з табл. 1, сполуки (3) та (5) знижують титр антигена р24 більше, ніж АЗТ, а інфекційний титр вірусу лишається на рівні останнього.

Вплив на репродукцію вірусу герпесу. Антигерпетичну активність модифікованого сополімеру (4) вивчали в перещеплюваній культурі Нер-2. Репродукцію вірусу тестували за допомогою моноклонального антитілу до вірусу герпесу та модифікованого імуноферментного аналізу (ІФА). Якщо в контролі інфекційний титр вірусу (Ig ID₅₀) дорівнював 7,0, то під впливом сполуки (4) в дозі 50 мкг/мл титр знижувався до величини 1,0. Сполука

(4) майже повністю пригнічує активність вірусу герпесу в досліді *in vitro*.

Антигерпетичну дію карбобензпіриду (2) визначали в дослідях *in vivo*.

Використовували ліофілізований вірус герпесу простого (1-й антигенний тип, штам VC, інфекційний титр по ЦПД на культурі клітин Vero дорівнює 5,0—5,5 Ig ТЦД₅₀/0,1 мл, а при інтрацеребральному введенні тварин — 4,0—4,5 Ig ЛД₅₀/0,03 мл).

Препарат (2) у дозі 100 мг/кг вводили одноразово. Знайдено, що при введенні за 24 год до інфікування летальність становить 50 %. При введенні під час або через 24 год після інфікування летальність дорівнювала відповідно 25 та 15 %, тоді як в контрольній групі — 40 %.

Як критерії розвитку інфекційного процесу використовували: клінічні ознаки захворювання; зміни, які було знайдено при гістологічному дослідженні мозку, печінки, селезінки; наявність антигена ВПГ у внутрішніх органах тварин при дослідженні їх методом імунофлюоресценції; наявність специфічних антигерпетичних антитіл у сироватках крові експериментальних тварин, які визначали ІФА з використанням ПАП-наборів (набір пероксидаза — антипероксидаза на основі мишачих моноклональних антитіл та сироватки проти IgG мишей).

Наведені дані свідчать про ефективність вживання карбобензпіриду при герпетичній інфекції, однієї з головних опортуністичних інфекцій при ВІЛ.

Інтерферогенна активність синтезованих сполук. З даних літератури відомо, що спроби відновлення імунної системи при СНІД не принесли очікуваних наслідків [7, 8]. У зв'язку з цим ми намагалися визначити можливість існування сполук з комбінованою, антивірусною та імунотроп-

Таблиця 1
Вплив сполук (3) та (5) на експресію ВІЛ-1 на моделях гострої та хронічної інфекції

Сполука	Рівень експресії ВІЛ-1			
	Гостра інфекція		Хронічна інфекція	
	Титр р24	Ig ID ₅₀	Титр р24	Ig ID ₅₀
(3)	100	1,0	12800	3,0
(5)	100	1,0	12800	3,0
АЗТ	200	1,0	—	—
Контроль	400	4,0	51200	6,0

ною дією. Для цього досліджували вплив деяких із синтезованих сполук на рівень інтерферону.

Сполуки (1) або (4) в дозі 200 мкг/мл додають до 1 млн лейкоцитів донорів та культивують при 37 °С протягом 24 год. Зливають рідину над осадом, доводять величину рН до 2,0 та залишають на 48—72 год при температурі 4 °С. Рівень інтерферону в культуральному середовищі визначають за загальноприйнятою методикою пригнічення ЦПД вірусу везикулярного стоматиту в культурі перешеплюваних клітин Л41 (лімфоїдні клітини людини). Результати наведено в табл. 2.

Дані табл. 2 свідчать про виразну інтерферонпродукуючу дію сполук (1) та (4).

Інтерферонпродукуючу дію препарату карбобензіпїриду (2) досліджували *in vivo*. Білим нелінійним мишам препарат вводили внутрішньочеревинно (в дозах 10000, 1000 та 100 мкг/мл) або перорально (в дозах 25, 50 або 100 мг/кг маси). Через 6 та 18 год після введення тварин деканітували та визначали рівень інтерферону в сироватці крові за методикою пригнічення ЦПД вірусу везикулярного стоматиту. Дані наведено в табл. 3.

Дані табл. 3 свідчать, що при внутрішньочеревинному введенні препарату (2) максимальний титр інтерферону реєструється через 18 год. При пероральному введенні високий рівень інтерферону відмічено через 6 та 18 год при дозі 50 мг/кг.

Вплив на імунну систему. Враховуючи те, що препарати противірусної дії, які зараз застосовуються в клініці, в своїй більшості виявляють імунодепресивний вплив на організм, для вибору перспективних сполук серед низки поліедранів необхідно вивчити їхні імунотропні властивості. Для цього ми дослідили дію сполук (2), (3), (4) та (5) на імунну систему.

На першому етапі ми зупинилися на трьох експериментальних моделях: первинної гуморальної відповіді на тимусзалежний антиген, реакції гіперчутливості сповільненого типу та реакції бла-

Таблиця 3

Рівень інтерферону в сироватці крові мишей, які отримували карбобензіпїрид

Спосіб введення Доза препарату	Час дослідження, год	Титр інтерферону, од. акт./мл	
Внутрішньочеревинно	10000 мкг/мл	6	8
		18	16—32
	1000 мкг/мл	6	8
		18	128
	100 мкг/мл	6	3—16
		18	128
Перорально	25 мг/кг	6	8
		18	16
	50 мг/кг	6	256
		18	256
	100 мг/кг	6	64
		18	64
Інтактні тварини	—	4	

сттрансформації лімфоцитів на мітогени. На наш погляд, вказані методи оцінки імунотропності досліджуваних сполук дають можливість встановити наявність їхнього імуномодулюючого впливу та при необхідності спланувати наступне цілеспрямоване вивчення по детальнішій схемі.

Імунні показники вивчали по затверджених методах [9—11], які модулюють класичну імунну реакцію та на її фоні дозволяють встановити позитивну чи негативну дію сполуки, що аналізується. Всі матеріали оброблені статистично [12].

Первинна гуморальна імунна відповідь є найінтегрованішим показником, що віддзеркалює участь усіх клітинних структур імунної системи та їхню взаємодію у процесі реалізації відповідної імунної реакції організму на антигенне подразнення.

Досліди проведені на 260 білих мишах, які знаходилися на звичайному раціоні живлення віварію.

Еритроцити барана (ЕБ) використовували як тимусзалежний антиген. Імунізацію здійснювали внутрішньочеревинним введенням оптимальної дози ЕБ (до 10^8 клітин) в об'ємі 0,2 мл на 20 г маси тіла. Реакцію оцінювали по титрах циркулюючих антитіл (гемолізину та гемаглютиніну) на 7-й день

Таблиця 2

Вплив сполук (1) та (4) на рівень інтерферону *in vitro*

Сполука	Титр інтерферону, од. акт./мл	
	Дослід 1	Дослід 2
(1)	640	640
(4)	1280	1280
Контроль	200	200

після імунізації. Поряд з цим у тварин реєстрували масу тіла та лімфоїдних органів (селезінка, тимус), обчислюючи відповідні індекси.

Сполуку (2) досліджували в дозах 50, 100 та 200 мг/кг при одноразовому або триразовому вживанні протягом 5 днів після імунізації, внутрішньоплунково, використовуючи як розчинник дистильовану воду.

Сполуку (4) вивчали в дозах 50, 75 та 100 мг/кг по двох схемах її застосування: одноразово (разом з антигеном) та протягом 5 днів (1 раз на добу) після імунізації, *per os*.

Сполуки (3) та (5) вводили в дозах 150 та 75 мг/кг маси тіла протягом 5 днів після імунізації (1 раз на добу, внутрішньочеревинно).

Усі наведені вище дози були визначені, виходячи з їхньої гострої токсичності, а використання кількох доз мало на меті встановлення ефекту дозозалежності.

До кожної дослідної групи тварин були поставлені відповідні контролю. Отримані результати наведено в табл. 4.

Сполука (2) виявила чіткий дозозалежний вплив на процес антитілоутворення, а саме: доза 200 мг/кг пригнічувала, а доза 50 мг/кг стимулювала утворення як гемолізину, так і гемоглютинінів.

Щодо сполук (3) та (5) отримані результати свідчать, що при вибраних схемі та дозах вони не виявляють імунодепресивного впливу на розвиток гуморальної відповіді на Т-залежний антиген.

Сполука (4) в дозах 75 та 100 мг/кг продемонструвала імуностимулюючі властивості. Найвиразніше вони спостерігаються при дозі 75 мг/кг і одноразовому застосуванні. При цьому титри обох видів циркулюючих антитіл були достовірно вищі, ніж у контролі. В дозі 100 мг/кг при одноразовому введенні також виявлено стимулюючу дію на процес утворення антитіл, а також збільшення маси селезінки.

Таким чином, проведені дослідження дають змогу констатувати, що сполуки (2) і (4) у вивчених дозах виявляють стимулюючу дію на процес утворення антитіл до Т-залежного антигена.

Вплив сполук (4) та (5) на реакцію гіперчутливості сповільненого типу. Вивчено вплив сполук на клітинний імунітет по реакції гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ), яка дає уявлення про функціональну активність Т-лімфоцитів та дозволяє дослідити вплив сполуки на продукцію сенсибілізованих лімфоцитами медіаторів, які залучають клітини мононуклеарних фагоцитів до імунної відповіді і таким чином дають змогу оцінити функціональну активність Т-системи імунітету.

При виконанні реакції ГСТ білих мишей імунізували одноразовим внутрішньочеревинним введенням ЕБ в дозі $2 \cdot 10^5$ клітин в об'ємі 0,5 мл на 20 г маси тіла. Через 5 днів тваринам у підшву задньої лівої лапи (дослід) вводили 10^8 ЕБ в об'ємі 0,05 мл, а в праву (контроль) — ізотонічний розчин натрію хлориду в такому ж об'ємі. Через 24 год у тварин виміряли вагу підколінних лімфатичних вузлів і наслідки реакції оцінювали по індексу реакції — відношення маси дослідного вузла до маси контрольного.

Досліди проведено на 40 білих мишах. Для кожної дослідної групи (по 10 тварин) ставили свій контроль. Дослідним групам сполуки вводили протягом 5 днів (одноразово на добу) після внутрішньочеревинної імунізації в дозах 75 мг/кг для сполуки (4) та 70 мг/кг для сполуки (5). Отримані результати наведено у табл. 5.

Як свідчать дані табл. 5, сполуки (4) та (5) сприяли посиленню реакції ГСР, що видно із збільшення індексів реакції.

Дію сполуки (4) на клітинний імунітет вивчали за показником проліферативної активності лімфоцитів, який оцінювали по спроможності В- та Т-лімфоцитів трансформуватися у бластні клітини під впливом мітогенів (ліпополісахарид — В-клітинний мітоген, фітогемоглютинін — Т-клітинний мітоген).

Реакцію бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) проводили в досліді *in vivo* [13] з використанням підколінних лімфовузлів, оцінку здійснювали по коефіцієнту гіпертрофії. Мишам у підшву задньої лівої лапи (дослід) вводили 100 мкг мітогена в 20 мкл фізіологічного розчину. У контрольну лапу (контроль) вводили тільки фізіологічний розчин у такому ж об'ємі. Дослідним тваринам сполуку (4) вводили в дозі 75 мг/кг протягом 5 днів (один раз на добу) до введення мітогенів (як В-, так і Т-залежних). Як видно з табл. 6, у таких умовах досліді сполука (4) не впливає на РБТЛ, про що свідчить відсутність статистично достовірних змін показників коефіцієнту гіпертрофії.

Результати і обговорення. Проведені дослідження свідчать про досить високу антигерпетичну активність сполук (2) та (4), що є підставою для подальшого вивчення вірусологічних та фармакологічних властивостей цих сполук для створення нових лікарських препаратів.

Заміна бензильного залишку в сполуці (2) на адамантильний (сполука 5) призводить до збільшення дії на ВІЛ. Речовини з такою структурою не досліджувалися як інгібітори ВІЛ, тому здається перспективним вивчення аналогів сполуки (5).

Таблиця 4
Показники гуморальної імунної відповіді ($M \pm m$) білих мишей, які одержували сполуки (2), (3), (4), (5)

Умови досліду	Маса тіла, г	Селезінковий індекс	Тимічний індекс	Циркулюючі антитіла, Ig2	
				Гемолізину	Гемаглютинину
Контроль	28,4	0,332	0,075	8,9	8,32
	1,29	0,02	0,011	0,41	0,40
Сполука (2)					
200 мг/кг	27,0	0,29	0,061	4,7*	5,9*
	0,65	0,017	0,01	1,16	0,80
100 мг/кг	27,3	0,333	0,059	9,12	7,9
	0,56	0,012	0,006	0,42	0,39
50 мг/кг	26,0	0,369	0,065	10,5	9,6
	0,96	0,026	0,008	0,22	0,2
Контроль	22,0	0,6	0,011	10,4	7,2
	1,16	0,04	0,003	0,1	0,5
Сполука (3)					
150 мг/кг	24,0	0,6	0,013	10,8	6,8
	2,0	0,08	0,002	0,2	0,2
Контроль	22,0	0,6	0,014	10,7	7,8
	0,3	0,04	0,002	0,3	0,3
Сполука (4)					
50 мг/кг, одноразово	22,5	0,48	0,012	11,5	8,4
	0,3	0,09	0,002	0,2	0,2
50 мг/кг, 5 діб	22,0	0,39	0,014	11,25	6,9
	1,1	0,03	0,002	0,2	0,2
75 мг/кг, одноразово	23,6	0,59	0,01	12,0*	7,2
	0,6	0,03	0,002	0,01	0,2
75 мг/кг, 5 діб	21,8	0,63	0,01	12,0*	7,2
	0,68	0,02	0,001	0,01	0,3
100 мг/кг, одноразово	19,5	1,42*	0,015	10,7	9,0*
	0,75	0,09	0,02	0,3	0,1
100 мг/кг, 5 діб	22,5	0,60	0,024*	11,5	8,7
	1,0	0,03	0,0025	0,4	0,5
Контроль	22,1	0,6	0,011	10,5	8,7
	1,1	0,05	0,003	0,1	0,4
Сполука (5)					
75 мг/кг, одноразово	21,7	0,74	0,012	11,2	6,7
	1,0	0,11	0,003	0,01	0,6
100 мг/кг, 5 діб	22,5	0,60	0,024*	11,5	8,7
	1,0	0,03	0,0025	0,4	0,5

*У цій таблиці та в табл. 5 $p < 0,05$ по відношенню до контролю.

Таблиця 5
Реакція гіперчутливості сповільненого типу ($M \pm m$) у білих мишей, які отримували сполуки (4) та (5)

Умови досліду	Індекс реакції
Контроль (інтактні тварини)	1,61
	0,2
Сполука (4), 75 мг/кг, 5 діб	2,8 ⁿ
	0,22
Контроль	1,35
	0,1
Сполука (5), 70 мг/кг, 5 діб	1,93*
	0,1

Таблиця 6
Реакція бласттрансформації лімфоцитів на В- та Т-залежні мітогени у білих мишей, які отримували сполуку (4)

Умови досліду	Коефіцієнт інверсії, $M \pm m$
<i>Ліпополісахарид</i>	
Контроль (інтактні тварини)	2,26
	0,18
Сполука (4), 75 мг/кг, 5 діб	1,58
	0,3
<i>Фітогемаглютинін</i>	
Контроль	2,06
	0,2
Сполука (4), 75 мг/кг, 5 діб	2,13
	0,41

Привертає увагу помітна інтерферогенна та імуностимулююча активність одержаних нами вірусних інгібіторів, що може стати основою для створення препаратів комплексної дії.

Висновки. Препарат протизапальної дії карбо-бензпірид (2) виявляє виразну антигерпетичну та інтерферогенну активність. Похідне адамантил-гідразину (5) за рівнем активності не поступається АЗГ, пригнічує реплікацію ВІЛ на моделях як гострої, так і хронічної інфекцій.

Г. І. Даниленко, С. Л. Рыбалко, Ю. М. Максимов, Н. І. Шарыкина, С. Т. Дядюн, В. Г. Аркадьев, В. П. Даниленко, Н. В. Нестерова, С. В. Гужова, Т. А. Бухтиарова, В. М. Овруцкий, О. Ю. Захарцев, Т. Ф. Грицак, Е. В. Максименко, Н. О. Вринчану

Поиск ингибиторов ВИЧ и герпеса среди производных каркасных соединений и пиридинкарбоновых кислот

Резюме

Показано, что адамантановое производное (5) ингибирует репликацию ВИЧ на уровне азидотимидина и одновременно проявляет иммуностимулирующие свойства. Производные изоникотиновой кислоты (2) и норборнана (5) обладают антигерпетической и иммуностимулирующей активностью.

G. I. Danilenko, S. L. Rybalko, Ju. M. Maximov, N. I. Sharykina, S. T. Diadiun, V. G. Arkadiev, V. P. Danilenko, N. V. Nesterova, S. V. Guzhova, T. A. Bukhtiarova, V. M. Ovrutsky, O. Yu. Zakhartsev, T. F. Gritsak, E. V. Maksimenok, N. O. Vrinchanu

Search for HIV and herpes inhibitors among the derivatives of polyhedrane and pyridinecarboxylic acid

Summary

It was found that an adamantane derivative (5) inhibits HIV replication as azidothymidin but has immunostimulative properties. The derivatives of isonicotinic acid (2) and norbornane (4) manifest both antiherpes and immunostimulative activity.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Usova E., Blinov V., Goltzov V. et al. Inhibition of HIV reproduction by membranotropic compounds // IX Int. Conf. on AIDS: Abstr.—Brussee, 1993.—P. 29.
2. А. с. СРСР 563796.—1976.
3. А. с. СРСР 686296.—1978.
4. А. с. СРСР 582663.—1978.
5. Clercq E. De. Chemotherapy of acute HIV-infection // X Int. Conf. on AIDS: Abstr.—Nizza, 1994.—P. 3.
6. Кондо Т., Сиба М. Полимеры фармакологического назначения.—М.: Медицина, 1981.—С. 144—189.
7. Lotze M. AIDS. Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention.—Philadelphia: Lipincott Comp., 1985.—P. 235.
8. Азбука СПИДа / Под. ред. М. Адлера.—М.: Мир, 1991.—С. 69.
9. Методические материалы по экспериментальному (фармакологическому) и клиническому испытанию иммуномодулирующего действия фармакологических средств: Издание официальное.—М., 1984.—С. 9—10.
10. Зигль Э. Реакция гематоглотинации. Иммунологические методы.—М.: Мир, 1979.—С. 108—112.
11. Гюлинг Э. В., Самбур М. Б. О воспроизведении и оценке реакции гиперчувствительности замедленного типа *in vivo* // Физиол. журн.—1981.—27, № 2.—С. 237—240.
12. Автоматизированные методы обработки экспериментальных и клинических данных с использованием микрокалькуляторов: Метод. рекомендации.—Киев, 1985.—С. 25.
13. Chaudhuri T. K., Chakrabarty A. K. Activation of murine thymocytes *in vivo*. Pt II: Study of blastogenesis, the synthesis of macromolecules and the cytotoxic response after stimulation with phytohemagglutinin // Lymphology.—1986.—19, N 3.—P. 124.

УДК 616.002+547.412.298.1+576 858

Надійшла до редакції 26.06.96