

УДК 578.825.1:615.281.8

КОМБИНИРОВАННЫЙ ЭФФЕКТ БАЗОВЫХ ПРОТИВОГЕРПЕТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ С НОВЫМ ИНГИБИТОРОМ ТЕРМИНАЗНОГО КОМПЛЕКСА ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 1-ГО ТИПА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК VEROE6

© 2024 г. В. Л. Андропова¹, *, Г. А. Галегов¹, О. А. Воздвиженская²,
Г. Л. Левит², В. П. Краснов², академик РАН В. Н. Чарушин²

Поступило 01.03.2024 г.

После доработки 30.03.2024 г.

Принято к публикации 30.03.2024 г.

Более 90% населения Земли являются носителями вируса простого герпеса 1 типа (ВПГ-1). Инфекция проявляется образованием волдырей и язв на лице или половых органах и может вызывать слепоту, энцефалит, генерализацию инфекции. Все современные противовирусные препараты первого и второго рядов избирательно ингибируют вирусную ДНК-полимеразу. Описанный нами ранее конъюгат пурина и бензоксазина LAS-131 [(S)-4-[6-(пурин-6-ил)аминогексаноил]-7,8-дифторо-3,4-дигидро-3-метил-2H-[1,4]бензоксазин] использует в качестве биомишени большую субъединицу терминазного комплекса ВПГ-1 и селективно ингибирует репродукцию *in vitro*. Нами впервые получены принципиально новые результаты по комбинированному воздействию на герпесвирусную инфекцию человека LAS-131 с практически значимыми противовирусными соединениями – аналогами нуклеозидов (ацикловир [АЦВ], пенцикловир [ПЦВ], ганцикловир [ГЦВ], бривудин [БВДУ], иоддезоксисуридин [ИДУ], аденинарабинозид [Ара-А]), а также аналогом нуклеозидфосфоната (цидофовир [CDV]) и аналогом приофосфата (фоскарнет [ФОС]). С помощью метода ингибирования цитопатического эффекта (ЦПЭ), индуцированного вирусом, показано, что при сочетании с LAS-131 концентрации соединений в комбинации, обеспечивающие ингибирование индуцированного ВПГ-1 ЦПЭ на 50%, снижались в 2 раза (аддитивный эффект, ФОС) и более (синергический эффект, АЦВ, ПЦВ, ГЦВ, ИДУ, БВДУ, Ара-А, ЦДВ). В условиях существенного снижения концентраций агентов создаются непрямые условия для репродукции ВПГ-1 и открываются новые реальные возможности контроля герпесвирусной инфекции человека.

Ключевые слова: вирус герпеса простого типа 1, конъюгат пурина и бензоксазина, противовирусные препараты, устойчивость к противовирусным препаратам, комбинированная терапия

DOI: 10.31857/S2686738924040071

Инфекция вируса простого герпеса (ВПГ) – одна из наиболее распространенных во всем мире [1]. Зарегистрированные в настоящее время противовирусные препараты первой и второй линий,

способные контролировать эту тяжелую инфекцию, блокируют репликацию вируса, выступая в качестве конкурентных субстратов для вирусной ДНК-полимеразы (ДНК-pol) и ингибируя ее активность [2]. Ограниченность перечня лекарств первой линии (модифицированных нуклеозидов и их предлекарств – ацикловира (АЦВ), валацикловира (валтрекс), фамцикловира (фамвир), развитие у вируса лекарственной резистентности, а также тяжелые побочные эффекты у препаратов второй линии (фоскарнет (ФОС, фоскавир) и цидофовир (ЦДВ) [3, 4] обуславливают необходимость продолжения разработки новых противовирусных препаратов, поражающих биомишени, принципиально отличные от ДНК-pol, которые могли

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение “Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского” Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

*e-mail: andronova.vl@yandex.ru

бы расширить возможности контроля герпетических инфекций [5,6].

Стратегия комбинированной лекарственной противовирусной терапии состоит в воздействии на инфекционный процесс двумя и более препаратами с различными механизмами действия. При синергическом или аддитивном характере их взаимодействия становится возможным не только повысить эффективность проводимой терапии, использовать лекарства в более низких дозах, снижая вероятность развития нежелательных побочных эффектов лекарств, но и препятствовать развитию лекарственной резистентности. Поэтому комбинированная терапия – это “золотой стандарт” лечения ряда вирусных инфекций, включая ВИЧ-1 [7], вирус гепатита С [8] и вирус гриппа [9, 10]. Есть ограниченный клинический опыт сочетанного использования АЦВ и ФОС. Однако ввиду тяжелых побочных эффектов ФОС такая тактика может применяться только в особо тяжелых случаях, когда существует угроза жизни пациента [11].

Нами впервые была выявлена группа соединений, конъюгатов пурина и бензоксазина, проявивших селективную активность *in vitro* на модели ВПГ-1, включая штаммы, резистентные к действию АЦВ [12]. Выбрано соединение-лидер LAS-131 [(S)-4-[6-(пурин-6-ил)аминогексаноил]-7,8-дифторо-3,4-дигидро-3-метил-2Н-[1,4]бензоксазин] и установлена значимая мутация в гене большой субъединицы терминального комплекса (UL15), с которой связано развитие резистентности у вируса к LAS-131, и таким образом определена биомишень этого соединения [13] – терминала ВПГ, фермент, абсолютно необходимый для репродукции вируса, осуществляющий нарезание и упаковку в капсид вирусной ДНК [14]. Насколько нам известно, LAS-131 является первым ингибитором моторной функции терминального комплекса ВПГ-1. С 2017 г. в клиническую практику (в России с 2022 г.) введен препарат Превимис (Previmis, действующее вещество летермовир, MerckSharp&Dohme B.V.) – ингибитор, нацеленный на малую субъединицу терминального комплекса цитомегаловируса (ЦМВ) и предназначенный для профилактики заболеваний, вызываемых ЦМВ после недавно перенесенной пересадки костного мозга у взрослых. Однако летермовир имеет очень узкий спектр действия и не влияет на репродукцию других герпесвирусов [15]. Что касается доступных для практической медицины препаратов, активных против ВПГ-инфекций, поражающих биомишень, отличную от ДНК-pol, то этот перечень пока ограничен препаратом Amenalief® (Maruho) на базе ингибитора хеликазо-праймазного комплекса ВПГ и вируса варицелла зостер (ВЗВ) аменамевира, разрешенного в 2017 г. лишь в Японии для лечения опоясывающего лишая (инфекция ВЗВ), а с 2023 г. и для лечения рецидивирующего ВПГ [16, 17].

Целью настоящего исследования была оценка *in vitro* сочетанного эффекта соединений, использующих различные биомишени – LAS-131 (ингибитора терминального комплекса) с известными противогерпетическими агентами, включая практически значимые (ингибиторы ДНК-pol).

Препараты. Соединение LAS-131, [(S)-4-[6-(пурин-6-ил)аминогексаноил]-7,8-дифторо-3,4-дигидро-3-метил-2Н-[1,4]бензоксазин] C₂₀H₂₂F₂N₆O₂, Mw 416.42) синтезировано в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрОРАН, как описано нами ранее [12].

Использовали следующие противовирусные агенты производства Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США): ацикловир (АЦВ, 9-[(2-гидроксиэтокси)метил]гуанин, C₈H₁₁N₅O₃; Mw 225.20 г/моль), пенцикловир (ПЦВ, 9-[4-гидрокси-3-(гидроксиметил)бутил]гуанин, C₁₀H₁₅N₅O₃, Mw 253.26), ганцикловир (ГЦВ, 9-[(1,3-дигидрокси-2-пропокси)метил]гуанин, C₉H₁₃N₅O₄; Mw 255.23), (Е)-5-(2-бромвинил)-2'-дезоксисуридин (БВДУ, бривудин, C₁₁H₁₃BrN₂O₅, Mw 333.14); 5-йод-2'-дезоксисуридин (ИДУ, C₉H₁₁IN₂O₅; Mw 354.10), 9-β-D-арабинофуранозиладенин (Ара-А, C₁₀H₁₃N₅O₄, Mw 267.24), цидофовир (ЦДВ, C₈H₁₄N₃O₆P, Mw 279.19) и фоскарнет (ФОС, CH₃O₅P × 6H₂O, Mw 300.04).

ВПГ-1, штамм L₂ (ВПГ-1/L₂) получен из Государственной коллекции вирусов ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России. Культура клеток Vero Е6 любезно предоставлена профессором А.М. Бутенко (ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России). Использовали комбинации соединений в нецитотоксичных концентрациях, контроль токсического эффекта отдельных соединений и их комбинаций осуществляли с помощью метода окрашивания клеток трипановым синим, позволяющим оценить количество живых и мертвых клеток в экспериментальной системе. Противовирусную активность соединений и их комбинаций оценивали методом ингибирования развития вирусиндуцированного цитопатического эффекта, а характер взаимодействия комбинируемых соединений – путем вычисления индекса FIC (fractional inhibitory concentration) по формуле:

$$FIC = \frac{ИД_{50} \text{ соединения А в комбинации}}{ИД_{50} \text{ соединения А}} + \frac{ИД_{50} \text{ соединения В в комбинации}}{ИД_{50} \text{ соединения В}}$$

как подробно описано нами ранее [18]. Необходимые для расчета величины ИД₅₀ индивидуальных веществ приведены в таблицах 1 и 2.

Как следует из данных, приведенных в табл. 1 и 2, сочетанное использование LAS-131 с ФОС (пирофосфатный аналог, нарушающий функционирование вирусной ДНК-pol, ингибируя отщепление пирофосфата от нуклеозидтрифосфата [2, 19]) обеспечивает аддитивный эффект взаимодействия

Таблица 1. Противогерпетическая активность ряда соединений на модели ВПГ-1 в культуре клеток Vero E6

Соединение	ЦД ₅₀ , мкг/мл	ИД ₅₀ , мкг/мл	ИД ₉₅ , мкг/мл	ИС
LAS-131	122.22 ± 6.48	1.95	7.8	62.68
АЦВ	>250	0.39	1.56	>1026
ГЦВ	>100	0.56	11.25	>179
ПЦВ	>100	1.95	7.8	> 51
БВДУ	>250	0.096	0.19	>4167
ИДУ	>250	3.9	31.25	>64
ФОС	>62.5	31.2	62.5	>2
Ара-А	80.0 ± 4.12	15.6	62.5	5.12
ЦДВ	>62.5	3.9	15.6	>52

Примечание. Множественность инфицирования 0.1 БОЕ/кл, продолжительность инкубации 48 ч. ЦД₅₀ – концентрация соединения, в присутствии которой выживает 50% клеток (метод окрашивания клеток трипановым синим). Величину ЦД₅₀ определяли методом интерполяции по графику зависимости количества мертвых клеток (%) от концентрации соединения. “>” – эффект не достигается. ИД₅₀ и ИД₉₅ – концентрации соединений, в присутствии которых ингибируется развитие вирусиндуцированного цитопатического эффекта (ЦПЭ) при 95–100% ЦПЭ в контроле вируса. Величину индекса селективности (ИС) вычисляли как отношение ЦД₅₀ к ИД₅₀. Приведены результаты двух независимых опытов.

Таблица 2. Эффективность LAS-131 в комбинации с известными противогерпетическими агентами на модели ВПГ-1 в культуре клеток Vero E6

Соединение	ЦД ₅₀ , мкг/мл	ИД ₅₀ , мкг/мл	ИД ₉₅ , мкг/мл	FIC	Эффект
LAS-131 + АЦВ	>15.6 + 0.05	0.39 + 0.15	3.9 + 0.05	0.59	Синергический
LAS-131 + ГЦВ	>6.25 + 0.35	0.78 + 0.18	0.78 + 0.35	0.72	Синергический
LAS-131 + ПЦВ	>3.9 + 3.9	0.49 + 0.49	0.24 + 0.98	0.50	Синергический
LAS-131 + БВДУ	>15.6 + 0.018	0.49 + 0.023	1.95 + 0.094	0.50	Синергический
LAS-131 + ИДУ	>3.9 + 1.95	0.49 + 0.49	0.98 + 1.95	0.38	Выраженный синергический
LAS-131 + ФОС	>62.5 + 7.8	7.8 + 0.98	1.56 + 12.5	1.0	Аддитивный
LAS-131 + Ара-А	>3.9 + 62.5	0.49 + 3.9	0.49 + 15.6	0.5	Синергический
LAS-131 + ЦДВ	>15.6 + 31.25	0.25 + 1.95	0.25 + 7.8	0.63	Синергический

Примечание. Множественность инфицирования 0.1 БОЕ/кл, продолжительность инкубации 48 ч. См. примечание к таблице 1. Индекс FIC (fractional inhibitory concentration) – индекс фракционной ингибирующей концентрации. Приведены результаты двух независимых опытов.

(FIC=1), иными словами минимальная активная концентрация (ИД₅₀) каждого из соединений, установленная при их раздельном использовании, в комбинации может быть снижена в два раза.

При более низких значениях FIC (FIC<1), являющегося критерием эффективности сочетанного действия препаратов, эффект комбинации соединений может быть отнесен к синергическому или взаимоусиливающему. При использовании LAS-131 в комбинации с любым из включенных в исследование модифицированным нуклеозидом наблюдали взаимоусиливающий эффект с FIC в диапазоне от 0.72 и ниже. Таким образом, при сочетанном использовании LAS-131 с антивирусными агентами этой группы комбинируемые соединения можно использовать в меньших концентрациях и при этом получить более выраженный противовирусный эффект, чем при индивидуальном использовании.

Выраженное синергическое взаимодействие соединений определяется как минимум 4-кратным снижением ИД₅₀ каждого соединения в паре, таким образом, величина FIC в этом случае будет равна или ниже 0,5 (FIC < 0.5). Наиболее выраженный взаимоусиливающий эффект наблюдался при использовании LAS-131 в комбинации с ИДУ (FIC = 0.38).

Изучение взаимодействия между лекарствами важно потому, что в ряде случаев комбинированное использование препаратов может привести к нежелательным последствиям [20].

На основании полученных нами результатов можно заключить, что комбинация LAS-131 с модифицированными нуклеозидами может служить полезным подходом для лечения герпетических инфекций и может быть более эффективным терапевтическим вариантом, чем монотерапия. Полученные результаты согласуются с нашим заключением,

что LAS-131 имеет механизм действия и биомишень, отличные от модифицированных нуклеозидов [13]. Как известно, в функции рUL15 в составе терминального комплекса входит упаковка синтезируемой ДНК-роI ВПГ-1 конкатемерной ДНК в капсид с последующим ее нарезанием на единичные геномы и обеспечение этих процессов необходимой энергией [14]. В соответствии с предложенной нами моделью механизма действия LAS-131 этот препарат нарушает упаковку ДНК, ингибируя активность упаковочного биомотора, формируемого рUL15 в составе терминального комплекса [13]. Логично предположить, что снижение эффективности ингибирования синтеза ДНК при снижении концентрации исследованных модифицированных нуклеозидов или ФОС в комбинации компенсируется снижением эффективности упаковки ДНК в вирусный капсид и наоборот, снижение эффективности упаковки ДНК при снижении в комбинации концентрации LAS-131 нивелируется более эффективной супрессией синтеза ДНК ингибиторами ДНК-роI.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета института (учреждения, организации). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. James C., Harfouche M., Turner K.M., et al. Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016 // *Bulletin of the World Health Organ.* 2020, Vol. 98, № 5, P. 315–329.
2. Das D., Hong J. Chapter 12. *Herpesvirus Polymerase Inhibitors*. In: Gupta, S.P., editor. *Viral Polymerases: Structures, Functions and Roles as Antiviral Drug Targets* London: Academic Press; 2019. P. 333–356.
3. Garikapati S., Nguyen M. Foscarnet [Internet]. *Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing*; 2023.
4. Drug Monograph Cidofovir [Internet]. Elsevier: Content from Elsevier's drug information, 2023.
5. Андропова В.Л. Современная этиотропная химиотерапия герпесвирусных инфекций: достижения, новые тенденции и перспективы. Альфа-герпесвирусы (часть II) // *Вопросы вирусологии*. 2018. Т. 63, № 4. С. 149–159.
6. Birkmann A., Zimmermann H. HSV antivirals – current and future treatment options // *Current Opinion in Virology* // 2016. Vol. 18. P. 9–13.
7. Menéndez-Arias L., Delgado R. Update and latest advances in antiretroviral therapy // *Trends in Pharmacological Sciences*. 2022, Vol. 43, № 1. P. 16–29.
8. Sarrazin C. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice // *Journal of Hepatology*. 2016. Vol. 64, № 2. P. 486–504.
9. Jones J.C., Yen H.-L., Adams P., et al. Influenza antivirals and their role in pandemic preparedness // *Antiviral Research*. 2023. Vol. 210. P. 105499.
10. Beigel J.H., Bao Y., Beeler J., et al. Oseltamivir, amantadine, and ribavirin combination antiviral therapy versus oseltamivir monotherapy for the treatment of influenza: a multicentre, double-blind, randomised phase 2 trial // *The Lancet Infectious Diseases*. 2017. Vol. 17, № 12. P. 1255–1265.
11. Sagnier S., Poli M., Debruxelles S., et al. High-dose acyclovir combined with foscarnet (foscarnet) in the management of severe herpes simplex virus meningoencephalitis // *Revue Neurologique (Paris)*. 2017. Vol. 173, № 4. P. 240–242.
12. Krasnov V.P., Musiyak V.V., Vozdvizhenskaya O.A., et al. N-[ω-(Purin-6-yl)aminoalkanoyl] derivatives of chiral heterocyclic amines as promising anti-herpesvirus agents // *European Journal of Organic Chemistry*. 2019. Vol. 2019. Issue 30. P. 4811–4821.
13. Krasnov V.P., Andronova V.L., Belyavsky A.V., et al. Large Subunit of the Human Herpes Simplex Virus Terminase as a Promising Target in Design of Anti-Herpesvirus Agents // *Molecules*. 2023. Vol. 28, № 21. P. 7375.
14. Yang Y., Yang P., Wang N., et al. Architecture of the herpesvirus genome-packaging complex and implications for DNA translocation // *Protein & Cell*. 2020. Vol. 11. № 5. P. 339–351.
15. Превимис (Previmis) [Internet]. Справочник лекарственных средств Vidal.
16. Maruhoreceives manufacturing and marketing approval for a partial change of the indication and dosage/administration for anti-herpes virus agent “Amenalief Tab. 200 mg” for the treatment of recurrent Herpes Simplex in Japan [Internet]. Maruho: News Release 2023.02.24.
17. Shiraki K., Yasumoto S., Toyama N., et al. Amenamevir, a Helicase-Primase Inhibitor, for the Optimal Treatment of Herpes Zoster // *Viruses*. 2021. Vol. 13. № 8. P. 1547.
18. Андропова В.Л., Ясько М.В., Куханова М.К., и др. Исследование подавления репродукции вируса простого герпеса с лекарственной устойчивостью сочетанием фосфита ациклогуанозина с некоторыми противогерпетическими препаратами // *Вопросы вирусологии*. 2014. Т. 59, № 6. С. 32–35.

19. Poole C.L., James S.H. Antiviral Therapies for Herpesviruses: Current Agents and New Directions // *Clinical Therapeutics*. 2018. Vol. 40, № 8. P. 1282–1298.
20. Van Roon E.N., Flikweert S., Le Comte M., et al. Clinical Relevance of Drug-Drug Interactions: A structured assessment procedure // *Drug Safety Journal*. 2005. Vol. 28, № 12. P. 1131–1139.

COMBINED EFFECT OF BASIC ANTIHERPETIC DRUGS WITH A NEW INHIBITOR OF THE TERMINASE COMPLEX OF HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1 IN VERO CELL CULTURE

V. L. Andronova^{a, #}, G. A. Galegov^a, O. A. Vozdvizhenskaya^b,
G. L. Levit^b, V. P. Krasnov^b, Academician of the RAS V. N. Charushin^b

^aFSBI “National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya” of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russian Federation

^bFSBIN “I.Ya. Postovky Institute of Organic Synthesis”, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation

[#]e-mail: andronova.vl@yandex.ru

More than 90% of the world's population are carriers of herpes simplex virus type 1 (HSV-1). The infection manifests itself in the formation of blisters and ulcers on the face or genitals, and can cause blindness, encephalitis, and generalized infection. All modern first- and second-line antiherpetic drugs selectively inhibit viral DNA-polymerase. The purine-benzoxazine conjugate LAS-131 [(S)-4-[6-(purin-6-yl)aminohexanoyl]-7,8-difluoro-3,4-dihydro-3-methyl-2H-[1,4]benzoxazine], which we described earlier, uses the large subunit of the HSV-1 terminase complex as a biotarget and selectively inhibits its reproduction in vitro. For the first time, we have obtained fundamentally new results on the combined effect of LAS-131 on human herpesvirus infection with practically significant antiviral compounds – nucleoside analogues (acyclovir [ACV], penciclovir [PCV], ganciclovir [GCV], brivudine [BVDU], iododeoxyuridine [IDU], adenine arabinoside [Ara-A], as well as a nucleoside phosphonate analogue (cidofovir [CDV]) and a pyrophosphate analogue (foscarnet [FOS]). Using an inhibition assay of cytopathic effect (CPE) induced by a virus, it was shown that when combined with LAS-131, the concentrations of the compounds in combinations providing inhibition of HSV-1-induced CPE by 50%, decreased by 2 times (additive effect, FOS) or more (synergistic effect, ACV, PCV, GCV, IDU, BVDU, Ara-A, CDV). Reducing the concentrations of agents creates non-permissive conditions for the reproduction of HSV-1 and opens up new real possibilities for controlling human herpesvirus infection.

Keywords: herpes simplex virus type 1, purine-benzoxazine conjugate, antiviral drugs, antiviral drug resistance, combined therapy