

И. Н. Фалынскова¹, К. С. Ионова², А. В. Дедова², И. А. Ленёва¹,
Н. Р. Махмудова¹, Л. Д. Раснецов³

ПРОТИВОВИРУСНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГИДРАТА ФУЛЛЕРЕН(ТРИС-АМИНОКАПРОНОВОЙ КИСЛОТЫ) В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК HEp-2 В ОТНОШЕНИИ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА

¹ ФГБУ "Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова"
РАМН, Россия, 105064, Москва, Малый Казенный пер., д. 5а, E-mail: falynskova@mail.ru;

² ФГБУ "НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского" Минздрава РФ, Россия, 123098, Москва,
ул. Гамалеи, д. 16;

³ ЗАО "ИНТЕЛФАРМ", Россия, 603000, Нижний Новгород, ул. Костина, д. 4, офис 500.

Описан синтез гидрата фуллерен(*трис*-аминокапроновой кислоты) (ФТАК гидрата). Изучение гидрата ФТАК в клетках HEp-2 показало, что соединение в нетоксичных концентрациях (до 100 мкг/мл) обладает противовирусной активностью в отношении респираторно-синцитиального вируса. Противовирусная активность возрастает с увеличением концентрации субстанции и уменьшается с увеличением дозы вируса, при этом ингибирующая концентрация (ИК₅₀) ФТАК гидрата составляла $5,376 \pm 1,39$ и $3,238 \pm 2,02$ мкг/мл при множественности заражения 0,1 и 0,02 MOI соответственно. Субстанция обладала противовирусной активностью при добавлении за 2 ч или одновременно с инфицированием вирусом, в то время как ее добавление через 2 ч после инфицирования не влияло на размножение РСВ.

Ключевые слова: респираторно-синцитиальный вирус; цитотоксичность; противовирусная активность; гидрат фуллерен(*трис*-аминокапроновой кислоты).

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) — вирус, вызывающий инфекционные патологии дыхательных путей. Наиболее опасна эта инфекция для детей младшего возраста, 70 % детей переносят респираторно-синцитиальную инфекцию (РСИ) в первый год жизни и почти каждый ребенок инфицируется в течение первых 3 лет. Смертность от осложнений заболевания, вызванных данным вирусом, у детей в возрасте от 6 недель до 6 мес — одна из самых высоких среди инфекционных заболеваний. Кроме того, осложненное течение инфекции возникает у лиц престарелого возраста, имеющих кардиопульмонологические заболевания, иммунодефицитные состояния и перенесших трансплантацию органов. Иммуитет, формирующийся в результате перенесенной РСИ, является краткосрочным и не обеспечивает полную противовирусную защиту, что является причиной повторных инфекций, наблюдаемых на протяжении всей жизни [1]. Материнские РСВ-специфические антитела, содержащиеся в крови новорожденных, также не гарантируют защиту от инфицирования. Механизмы противовирусной защиты различны при первичном и повторном инфицировании, что делает неэффективным использование инактивированной вакцины. Напротив, введение этой вакцины приводило к более тяжелому течению заболевания у привитых детей по сравнению с непривитыми детьми грудного возраста [2]. Для лечения легких форм заболевания, вызванного РСВ, применяют симптоматические средства. Применение интерферонов, а также препаратов, индуцирующих их синтез, вызывало усиление воспалительных процессов в респираторном тракте [3]. Применяемые для лечения РСВ инфекции препараты моноклональных антител дороги и не всегда эффективны. Рибавирин эффективно подавляет

вирусную репродукцию широкого спектра вирусов в культуре клеток, включая РСВ [4]. Однако данные клинических испытаний не позволяют однозначно ответить на вопрос об его эффективности в отношении РСВ, кроме того, данный препарат обладает серьезными побочными эффектами — мутагенным и тератогенным действием [5]. В связи с вышесказанным поиск новых средств, ингибирующих репродукцию РСВ, является, несомненно, актуальным.

В настоящее время на стадии доклинического изучения находится гидрат фуллерен(*трис*-аминокапроновой кислоты) (гидрат ФТАК), произведенный ЗАО "ИНТЕЛФАРМ" (рис. 1) [6].

Ранее показано, что водорастворимые соединения фуллеренов и их аминокислотные производные ингибируют репликацию ВИЧ [7] и цитомегаловируса [8], а нерастворимые проявляют противовирусную активность в отношении вируса леса Семлики и вируса вецикулярного стоматита [9]. Целью нашего исследования являлось изучение противовирусной активности гидрата ФТАК в отношении РСВ в культуре клеток HEp-2. В соответствии с поставленной целью в задачи исследования входило определение цитотоксического и противовирусного действия в отношении РСВ гидрата ФТАК в культуре клеток HEp-2.

Экспериментальная химическая часть

В работе использованы: фуллерен C₆₀ (фирма "Фуллерен-центр", Нижний Новгород), *o*-дихлорбензол (фирма "Мерк"), метиловый эфир полиэтиленгликоля 500 (фирма "Мерк") без дополнительной очистки. Каллийная соль ϵ -аминокапроновой кислоты получена по реакции ϵ -аминокапроновой кислоты с КОН в спирто-

вом растворе. Электронные спектры N-фуллерен(*трис*-аминокапроновой кислоты) получены на спектрометре Perkin-Elmer Lambda 25 в водном 0,1N растворе трисамина. Инфракрасные спектры поглощения N-фуллерен(*трис*-аминокапроновой кислоты) получены на приборе ИК-Фурье-спектрометре ФСМ 1201 в области 400 – 4000 см⁻¹ в виде твердой дисперсии веществ в таблетках КВг. Термогравиметрический анализ выполнен на установке Pyris 6 TGA в атмосфере азота. Элементный С, Н, N анализ веществ проведен на микроанализаторе EurEA 300. Данные элементного анализа соответствуют вычисленным.

Синтез гидрата ФТАК. К раствору 60 г (0,08 моль) фуллерена C₆₀ в 3,5 л *o*-дихлорбензола прибавляют 270 г (1,6 моль) тонко измельченной безводной калийной соли ϵ -аминокапроновой кислоты. К полученной суспензии при перемешивании и нагревании не выше 60 °С прибавляют в течение 2 ч смесь 1 л *o*-дихлорбензола и 1,5 л метилового эфира полиэтиленгликоля 500. Реакционную смесь перемешивают при температуре 60 °С в течение 5 ч до полного обесцвечивания раствора и образования твердого осадка. Осадок фильтруют, промывают несколькими порциями гексана и сушат в вакууме при температуре 60 °С. Выделенную смесь калиевых солей N-фуллеренаминокапроновой кислоты и исходной аминокaproновой кислоты растворяют в 1 л дистиллированной воды. В раствор медленно при перемешивании прибавляют 0,1N раствор соляной кислоты до pH 5,1. Смесь отстаивают до полного осаждения продукта, осадок центрифугируют и промывают водой до pH 6. Осадок сушат при температуре 60 °С в вакуумном сушильном шкафу. Выделяют 115 г гидрата N-фуллерен(*трис*-аминокапроновой кислоты). Выход продукта — количественный по использованному в реакции фуллерену. Продукт охарактеризован методами термогравиметрии, элементного анализа, УФ- и ИК-спектроскопии. Данные элементного анализа соответствуют молекулярной формуле C₇₈H₃₉O₆N₃ · 10H₂O. Данные элементного анализа для Ag-соли гидрата ФТАК соответствуют молекулярной формуле C₇₈H₃₆O₆N₃Ag₃(10H₂O).

Подтверждением строения гидрата ФТАК, как трехосновной кислоты, явилось образование Ag-соли. Количество карбоксильных групп фрагментов аминокислот, присоединенных к фуллерену, определяли по реакции с солями металлов. По реакции с азотнокислым серебром выделены комплексы состава C₆₀(H)₃{NH(CH₂)₅COOAg}₃ · (10H₂O). Состав полученного соединения соответствует соотношению 1:3 фуллерена к присоединенной аминокислоте. Соединение содержит молекулы воды, координирующиеся на фуллереновой сфере и карбоксильных группах аминокислотных лигандов. Количество гидратной воды определяли термогравиметрически. Субстанцию растворяли в смеси ДМСО — вода (1:10), ДМФА — вода, этаноламина. Поскольку полученное производное фуллерена представляет сильно ассоциированную систему, электронные спектры не имеют ярко выраженных полос поглощения и представляют монотонно спадающие кривые с ярко выраженными перегиба-

ми в области 260 нм ($\epsilon = 5,310^4$), что можно считать полосой поглощения фуллереновой составляющей, как полиена. ИК-спектр гидрата ФТАК содержал полосы поглощения, позволяющие сделать вывод о кислотной ассоциированной форме N-замещенной аминокaproновой кислоты.

Экспериментальная биологическая часть

Субстанции препаратов и приготовление растворов. К 5 мг субстанции гидрата ФТАК и 5 мг трисамина (необходим для растворения гидрата ФТАК) добавляли 5 мл стерильной воды и оставляли при 37 °С на 30 мин до полного растворения. К 5 мг субстанции рибавирина (1- β -D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид, Sigma-Aldrich, каталожный номер R9644) добавляли 5 мл стерильной воды. Из полученных растворов концентрации 1 мг/мл готовили для исследований необходимые концентрации препаратов на используемой культуральной среде.

Вирусы и клетки. В опытах использовали однослойные перевиваемые эпителиальные клетки аденокарциномы гортани человека НЕР-2, выращенные на среде ДМЕМ (Панэко, РФ) с добавлением сыворотки телят и антибиотиков. Респираторно-синициальный вирус (РСВ), штамм Long, приобретен в Американской коллекции тканевых культур (АТТС).

Цитотоксическое действие гидрата ФТАК в культуре клеток. Клетки НЕР-2 сеяли в 96-луночные планшеты со средней плотностью 3000 клеток на лунку и выращивали в среде ДМЕМ в присутствии 10 % сыворотки телят и антибиотиков в течение 1 сут до полного монослоя. Затем ростовую среду удаляли и в планшеты вносили по 200 мкл предоставленных образцов в различных концентрациях (от 1 до 100 мкг/мл) в рабочей среде (РС) (ДМЕМ F12 в соотношении 1:1) с 2 % сыворотки телят. Клетки инкубировали с препаратом в течение 3 сут при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂, после чего визуально, используя инвертированный микроскоп, оценивали состояние клеточного монослоя. Затем содержимое всех лунок удаляли и добавляли в каждую по 160 мкл среды ДМЕМ без фенолового красного с 2 % сыворотки телят, а также 40 мкл раствора тетразолиевого красителя МТТ (тиазолила голубого) с концентрацией 4 мг/мл, интенсивность окраски которым отражает жизнеспособность клеток [10]. Клетки инкубировали с красителем в течение 3 ч при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. После инкубации содержимое лунок удаляли и вносили в каждую 200 мкл ДМСО (диметилсульфоксид). Результаты учитывали на автоматическом колориметре при длинах волн 540 и 670 нм. Концентрация соединений, уменьшающая значение ОП₅₄₀ на 50 % по сравнению с контролем клеток, принималась за 50 % цитотоксическую дозу (ЦТД₅₀).

Противовирусная активность субстанций ФТАК гидрата в культуре клеток. В клетки, подготовленные, как описано выше, вносили разведения гидрата ФТАК от 1 до 20 мкг/мл, а в качестве препарата сравнения использовали рибавирин в тех же концентраци-

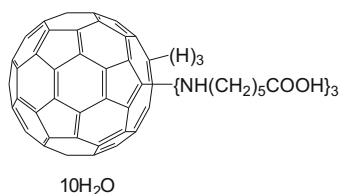


Рис. 1. N-фуллерен(*malic*-аминокапроновой кислоты) гидрат.

ях. Использовали 2 множественности заражения вирусом (multiplicity of infection, MOI): 0,1 и 0,02 MOI на лунку; и 3 схемы введения препарата: за 2 ч до инфицирования (профилактическая схема введения), одновременно с инфицированием (лечебно-профилактическая схема) и через 2 ч (лечебная схема) после инфицирования вирусом. Клеточную культуру, инфицированную вирусом, инкубировали с препаратами в течение 3 сут при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂, после чего визуально при помощи инвертированного микроскопа оценивали состояние клеточного монослоя. При наличии признаков ЦПД содержимое всех лунок удаляли, окрашивали МТТ и учитывали результаты на автоматическом колориметре, как описано выше. В качестве положительного клеточного контроля использовали лунки, не зараженные вирусом, а отрицательного — лунки, зараженные вирусом без добавления препаратов. Для одной точки опыта использовали 4 лунки планшета, после вычисления средних значений рассчитывали стандартное отклонение. Ингибирующую концентрацию препарата (ИК₅₀) — концентрацию препарата, уменьшающую значение оптической плотности на 50 %, рассчитывали, используя программу GraphPadPrism.

Для изучения цитотоксического действия субстанций гидрата ФТАК в культуре клеток HEp-2 выбраны следующие концентрации препарата: 1, 3, 5, 7,5, 10, 20, 50 и 100 мкг/мл. После инкубации в течение 72 ч визуальная оценка показала, что значительных изменений клеточного монослоя не наблюдалось при всех исследуемых концентрациях до 100 мкг/мл для гидрата ФТАК, в то время как в клетках в присутствии рибавирина в концентрации 100 мкг/мл наблюдалось поражение около 50 % монослоя. Результаты окрашивания красителем МТТ подтвердили данные, полученные при визуальном изучении состояния клеток. Таким образом, ЦТД₅₀ для субстанции гидрата ФТАК в культуре клеток оказалась выше концентрации 100 мкг/мл, что свидетельствует об его низкой токсичности и позволяет продолжить дальнейшее изучение в культуре клеток. Для рибавирина это значение составляло 100 мкг/мл.

В первой серии экспериментов проведено изучение противовирусной активности различных концентраций гидрата ФТАК при 2 множественностях заражения.

Для изучения противовирусного действия гидрата ФТАК в культуре клеток HEp-2 выбраны следующие концентрации препарата: 1; 2,5; 4; 5, 7,5; 10; 12,5 и 20 мкг/мл. Проведенные эксперименты показали, что соединение эффективно и специфически подавляет вирусную репродукцию РСВ в культуре клеток HEp-2,

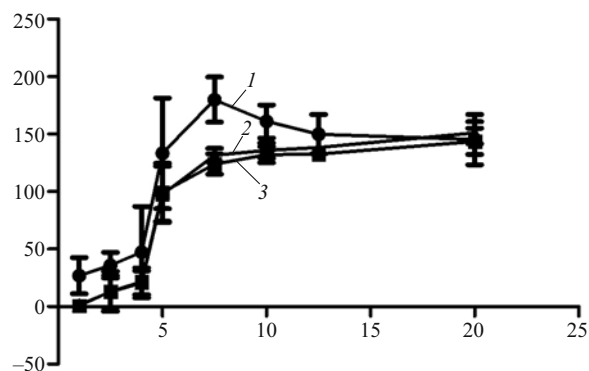


Рис. 2. Противовирусная активность ФТАК гидрата в отношении РСВ в культуре клеток HEp-2 при 2 множественностях заражения при добавлении за 2 ч до инфицирования: 1 – ФТАК гидрат, доза вируса 0,02 MOI; 2 – ФТАК гидрат, доза вируса 0,1 MOI; 3 – рибавирин, доза вируса 0,1 MOI. Здесь и на рис. 3, 4 по оси ординат – процентное отношение значения оптической плотности в данной концентрации к среднему значению оптической плотности в клеточном контроле; по оси абсцисс — концентрация, мкг/мл.

поскольку противовирусная активность гидрата ФТАК увеличивалась с увеличением его концентрации и уменьшалась с увеличением множественности заражения. Ингибирование было наибольшим при более высокой концентрации препаратов и при меньшей множественности заражения. ИК₅₀ гидрата ФТАК при схеме введения за 2 ч до инфицирования при множественности заражения 0,1 и 0,02 MOI составила и 5,376 ± 1,39 и 3,238 ± 2,02 мкг/мл соответственно. ИК₅₀ рибавирина при таких же условиях была сходной и составила 5 ± 1,6 мкг/мл (рис. 2).

Сравнение эффективности ингибирования размножения вируса (доза 0,1 MOI) рибавирином и гидратом ФТАК проводили методом двухфакторного дисперсионного анализа с последующим введением поправки Бонферрони. Статистически значимых различий не найдено ни при одной концентрации.

В следующей серии экспериментов нами изучено действие субстанции на репликацию РСВ в зависимости от времени добавления ее к инфицированной клеточной культуре при различных множественностях заражения. При добавлении препарата через 2 ч после инфицирования при высокой множественности заражения вирусом (0,1 MOI) его действие оказалось неэффективным и не влияло значительно на размножение вируса (рис. 3). ИК₅₀ в этих условиях эксперимента не попала в диапазон исследуемых концентраций. Однако при уменьшении дозы вируса до 0,02 MOI при добавлении препарата с такой же задержкой на 2 ч ИК₅₀ составила 11,68 ± 3,0 мкг/мл. ИК₅₀ рибавирина при этих же условиях составила 6,1 ± 1,3 мкг/мл.

Изучение различных схем добавления гидрата ФТАК показало, что наиболее эффективным оказалось профилактическое (за 2 ч до инфицирования) и лечебно-профилактическое (одновременно с инфицированием) применение гидрата ФТАК.

ИК₅₀ при дозе вируса 0,02 MOI составила: при схеме введения препарата за 2 ч до инфицирования 3,238 ± 2,02 мкг/мл, при одновременном введении

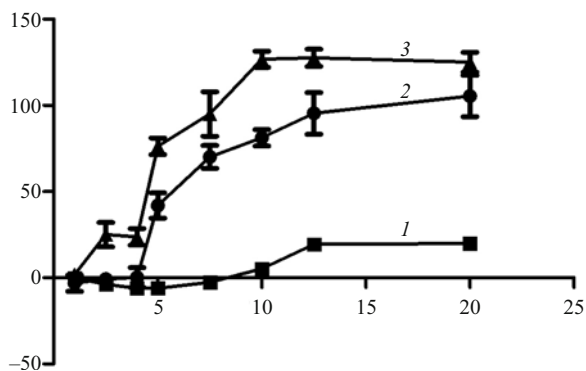


Рис. 3. Противовирусная активность гидрата ФТАК в отношении РСВ в культуре клеток Нер-2 при 2 множественностях заражения при добавлении через 2 ч после инфицирования: 1 — гидрат ФТАК, доза вируса 0,1 MOI; 2 — гидрат ФТАК, доза вируса 0,02 MOI; 3 — рибавирин, доза вируса 0,1 MOI.

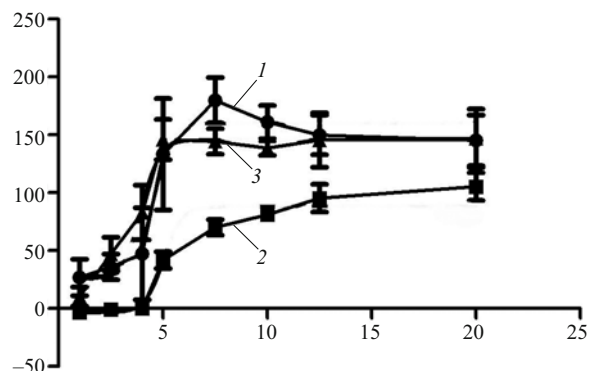


Рис. 4. Противовирусная активность ФТАК гидрата в отношении РСВ в культуре клеток Нер-2 при различных схемах добавления препарата и дозе вируса 0,02 MOI: 1 — за 2 ч до инфицирования; 2 — через 2 ч после инфицирования; 3 — одновременно с инфицированием.

препарата с инфицированием $1,575 \pm 1,19$ мкг/мл (рис. 4).

Проведенные нами исследования показывают, что гидрат ФТАК в культуре клеток Нер-2 обладает специфической противовирусной активностью в отношении респираторно-синцитиального вируса, которая повышается с увеличением концентрации вещества и понижается с увеличением дозы вируса. Наибольший эффект субстанция оказывает при введении препарата одновременно с инфицированием и за 2 ч до него, в последних условиях его активность сравнима с активностью рибавирина. Вычисленный с использованием полученных нами данных по цитотоксичности субстанции в этой же культуре клеток селективный индекс превышает 20, в то время как для рибавирина он составляет 20. Важно отметить, что полученные нами данные были подтверждены в исследованиях, проведенных в рамках программы Национального института здоровья (Antiviral Research Institute, Uta, USA) (персональные данные компании ЗАО «Интелфарма»). В исследованиях, проведенных в культуре клеток Нер-2 с другим штаммом РСВ (штамм А), значения IC_{50} и селективный индекс для ФТАК гидрата составляли 2,04 и 48 мкг/мл соответственно. Для выявления эффекта ЦПД в американских исследованиях использовали отличное от нашего окрашивание жизнеспособных клеток с помощью набора Cell Titer-Glo (Promega) (файлы компании ЗАО «ИНТЕЛФАРМ»).

Учитывая совокупность наших исследований, а также принимая во внимание полученные ранее данные о противовирусной активности гидрата ФТАК в отношении других вирусов, представляются перспективными дальнейшие исследования по изучению ФТАК гидрата с целью разработки и создания нового противовирусного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. R. Murry, S. F. Dowell, *Hosp. Pract.*, **32**(7), 87 – 88, 91 – 94 (1997).
2. H. W. Kim, J. G. Canchola, C. D. Brandt, et al., *Am. J. Epidemiol.*, **89**(4), 442 – 434 (1969).
3. M. S. Boukhalova, G. A. Prince, J. C. Blanco, *Virol. J.*, **7**, 7 – 20 (2010).
4. J. F. Hruska, J. M. Bernstein, R. G. Douglas, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **17**(5), 770 – 775 (1980).
5. P. R. Wyde, *Antiviral. Res.*, **39**(2), 63 – 79 (1998).
6. Л. Д. Раснецов, Я. Ю. Шварцман, О. Н. Суворова, *Гидратированные n-фуллерен-аминокислоты, способ их получения и фармацевтические композиции на их основе*, Патент РФ № RU2458046C1, *Бюл. изобрет.*, № 22 (2012).
7. R. F. Schinazi, R. Sijbesma, G. Srdanov, et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **8**, 1707 – 1710 (1993).
8. R. A. Kotelnikova, G. N. Bogdanov, E. C. Frog, et al., *J. Nanoparticle Res.*, **5**, 561 – 566 (2003).
9. F. Kaesermann, C. Kempf, *Antiviral Res.*, **34**, 65 – 70 (1997).
10. T. Mosmann, *J. Immunol. Methods*, **65**(1 – 2), 55 – 63 (1983).

Поступила 12.10.13

ANTIVIRAL ACTIVITY OF FULLERENE-(TRIS-AMINOCAPROIC ACID) HYDRATE AGAINST RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS IN HEp-2 CELL CULTURE

I. N. Falynskova¹, K. S. Ionova², A. V. Dedova³, I. A. Leneva¹, N. R. Makhmudova¹, and L. D. Rasnetsov³

¹ Mechnikov Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105054 Russia.

² Ivanovskii Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 123098 Russia.

³ INTELFARM Company, Moscow, Russia.

The synthesis of fullerene-(tris-aminocaproic acid) hydrate (FTACAH) is described. The study of FTACAH in HEp-2 cell culture showed that this compound in not-toxic concentrations (up to 100 µg/mL) inhibited the reproduction of respiratory syncytial virus (RSV). The inhibitory effect of FTACAH increased with the drug concentration and decreased with increasing virus dose (multiplicity of infection, MOI). The IC_{50} (50% inhibitory concentration) ranged from 5.376 ± 1.39 µg/mL to 3.238 ± 2.02 µg/mL at MOI = 0.1 and 0.02, respectively. The study of drug administration regimes showed that the maximum inhibiting effect was observed when FTACAH was added 2 h before infection or simultaneously with infection. No any inhibitory effect on RSV replication in HEp-2 cell culture was observed when FTACAH was added 2 h after infection.

Keywords: respiratory syncytial virus (RSV); cytotoxicity; antiviral activity; fullerene-(tris-aminocaproic acid) hydrate