

Л.А. Белявская¹, О.Ю. Повница¹, Ю.Г. Шермолович²,
А.П. Гудзь², Н.В. Нестерова¹

¹Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины,
ул. Заболотного, 154, Киев, 03680, Украина, e-mail: bilyavskal@ukr.net;

²Институт органической химии НАН Украины, ул. Мурманская 5, Киев, 02660, Украина

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИАДЕНОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ФТОРСОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Цель работы: исследование цитотоксического действия и антивирусной активности новых фторсодержащих нуклеозидных соединений на модели аденовируса человека и определение роли отдельных фрагментов молекул в их активности. **Методы.** Цитотоксическое действие соединений определяли колориметрическим МТТ-методом. Антивирусную активность веществ изучали цито-морфологическим методом по наличию вирусспецифических внутриядерных включений, применяя краситель акридиновый оранжевый. **Результаты.** В данной работе исследована цитотоксичность 2N-замещенных-4-тозил-5-полифторалкил-1,2,3-триазолов для клеточных линий Her-2 и HeLa. Выявлена зависимость токсичности соединений от структуры заместителей в ароматических кольцах молекул. Сочетание остатков 3-хлор-тетрагидропирана, 3-хлор-тетрагидрофурана или дигидрофурана в гликозидной части молекулы с трифторметилом или перфторпропилом в триазольном кольце усиливало токсичность соединений. *In vitro* показана анти HAdV5 активность 3-х соединений (G7, G8 и G10). Эффективная антивирусная концентрация (EC₅₀) для них составляла 16, 70 и 186 мкг/мл, а индекс селективности был равен 91, 8 и 4, соответственно. **Выводы.** Высокие показатели антивирусной активности и незначительная цитотоксичность соединения G8 делают его перспективным в плане разработки антивирусного средства, направленного на преодоление инфекций, вызванных аденовирусами.

Ключевые слова: фторсодержащие нуклеозиды, аденовирус, антивирусная активность.

Аденовирусы человека (HAdV) занимают третье место по распространенности в группе острых респираторных вирусных инфекций. Особенностью аденовирусной инфекции является ее способность к различной тяжести поликлинических проявлений. Вирусы вызывают острые и хронические респираторные заболевания, пневмонии, конъюнктивиты, гастроэнтериты, геморрагические циститы. В некоторых случаях аденовирусы могут вызывать гепатиты, миокардиты, менингоэнцефалиты, лимфадениты, гаймориты [1]. Тяжелое течение заболеваний наблюдается у детей младшего возраста, иммунодефицитных лиц и пациентов после трансплантации [12, 14, 15]. HAdV могут длительное время



находиться в латентном состоянии в лимфоидных тканях, оказывать иммуно-депрессивное действие и активироваться под влиянием различных факторов.

В мире пока не создано высокоэффективных специфических лицензированных препаратов для лечения аденовирусной инфекции [7, 8], поэтому, актуальным остается поиск препаратов и схем терапии, которые были бы не только эффективны и безопасны даже при длительном применении, но и доступны по стоимости для широкого круга пациентов.

Целью работы было исследование цитотоксического действия и антивирусной активности новых фторсодержащих нуклеозидных соединений на модели аденовируса человека и определение роли отдельных фрагментов молекул в их активности.

Материалы и методы

В работе использовали культуры перевиваемых клеток Нер-2 – клетки карциномы гортани человека и HeLa – карциномы шейки матки. Клетки культивировали согласно общепринятой методике [3]. Эталонный штамм аденовируса человека 5 серотипа (HAdV5) получен из коллекции Института микробиологии Будапештского медицинского университета. Вирус накапливали на культуре клеток Нер-2, хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ [3].

Гетероциклические соединения, с различными заместителями в нуклеиновом основании 2*N*-замещенные-4-тозил-5-полифторалкил-1,2,3-триазолы (табл. 1): трифторметил (G14, G6, G8, G10, G12), перфторпропил (G7, G9, G11, G13), толилсульфонил (G6-G14) и гликозидным фрагментом: 3-хлортетрагидрофуран (G8, G9), 3-хлортетрагидропиран (G6, G7), дигидрофуран (G12, G13), дигидропиран (G10, G11). Соединения до концентрации 20 мг/мл растворяли диметилсульфоксидом (DMSO, Sigma, США) и хранили до использования при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Рабочие серийные двукратные разведения соединений от 1 мг/мл до 64 мкг/мл готовили на среде для культур клеток без сыворотки (RPMI-1640, Sigma, США) непосредственно перед использованием. Стерилизовали растворы фильтрованием через шприцевые мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (Sarstedt, Германия).

Цитотоксическое действие соединений определяли с помощью МТТ-теста по стандартной методике [10]. Используя программу линейной регрессии Microsoft Excel10 для Pentium Pro, определяли концентрацию соединений, подавляющую жизнеспособность клеток на 50% по сравнению с контролем (CC_{50}).

Для выявления инфицированных аденовирусом клеток, содержащих вирусоспецифические включения [2], клетки Нер-2 или HeLa выращивали в пробирках с полосками покровных стекол. Через 24 часа среду удаляли и клетки инфицировали вирусом с множественностью 10–20 ВОЕ/клетку. После адсорбции вируса в течение 1,5 ч при комнатной температуре клетки отмывали раствором Хенкса и добавляли поддерживающую среду, содержащую исследуемые соединения в различных концентрациях. На каждую концентрацию использовали по 3 пробирки с клетками. В качестве контроля использовали клетки, инфицированные аденовирусом при отсутствии соединений в среде



(контроль вируса). Результаты учитывали через 48 ч. Клетки отмывали раствором Хенкса, фиксировали 96° этиловым спиртом и хранили при комнатной температуре до дальнейшего исследования. С целью выявления внутриядерных ДНК-содержащих вирусспецифических включений клетки отмывали раствором Хенкса, флюорохромировали 0,01% раствором акридинового оранжевого в течение 1–5 мин и исследовали в люминесцентном микроскопе МЛ- 2 (ЛОМО, Россия), используя объектив 40х. На каждом из 3-х стекол определяли количество клеток с включениями из 500 подсчитанных клеток монослоя. Ингибирующее влияние соединений на репродукцию вируса определяли по редукции числа инфицированных клеток в опыте по сравнению с контролем, этот показатель выражали в процентах и определяли по формуле [4]: Процент ингибирования = $100 - (O \cdot 100 / K)$, где K – количество клеток с включениями в контроле, O – количество клеток с включениями в опыте.

За эффективную концентрацию (EC_{50}) принимали ту, что вызывала уменьшение на 50% числа клеток с включениями. Для определения EC_{50} использовали программу линейной регрессии Microsoft Excel для Pentium Pro.

Результаты и их обсуждение

Критерием оценки специфической активности лекарственных соединений в культуре клеток является индекс селективности (SI), как отношение CC_{50} (цитотоксической концентрации, которая на 50% подавляет жизнеспособность клеток) к EC_{50} (эффективной концентрации, которая на 50% ингибирует репродукцию вируса) [4]. Малотоксичные препараты, значительно подавляющие репродукцию вируса, имеют высокий показатель SI, могут иметь и значительный лечебный эффект.

Было проведено исследование цитотоксического действия новых фтор-содержащих гетероциклических соединений в двух линиях перевиваемых клеток, чувствительных к аденовирусам человека: HeLa и Her-2. Результаты анализа цитотоксического действия соединений приведены в таблице. Большое количество соединений было плохо растворимо в среде для культур клеток, такие соединения были, преимущественно, токсичные для клеток HeLa. По цитотоксичности соединения условно поделили на токсичные (в концентрации до 300 мкг/мл) и малотоксичные (от 300 мкг/мл и выше).

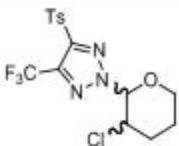
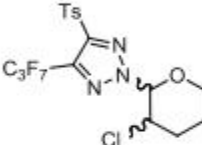
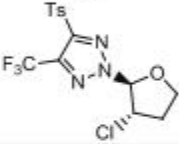
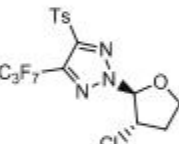
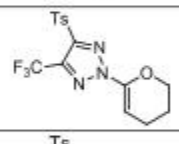
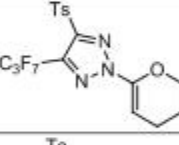
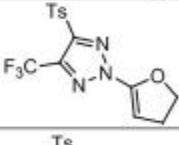
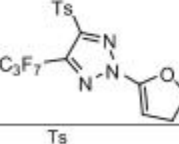
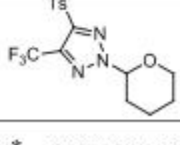
Токсическое действие соединений отличалось в зависимости от использованной линии клеток, что, возможно, связано с функциональными особенностями клеток. Так, соединения G6, G7, G12 были более токсичны для клеток HeLa, их CC_{50} составляла 194–298 мкг/мл, тогда как для линии клеток Her-2 показатель токсичности всех соединений был больше 500 мкг/мл.

Выявлена зависимость токсичности соединений от структуры заместителей в ароматических кольцах молекул. Очевидно, токсичность вызвана сочетанием остатков 3-хлор-тетрагидропирана, 3-хлор-тетрагидрофурана или дигидрофурана в гликозидной части молекулы с трифторметилом или перфлуорпропилом в триазольном кольце.



Биологическая активность фторсодержащих соединений

Biological activity of fluorine-containing compounds

Шифр	Структурная формула	Растворимость*	Цитотоксичность веществ (CC ₅₀), мкг/мл		Антиаденовирусная активность (EC ₅₀), мкг/мл
			HeLa	Hep-2	
G6		плохая	194	941	Н.а
G7		плохая	218	665	186±5,9
G8		хорошая	473	1461	16±3,6
G9		плохая	310	640	Н.а
G10		хорошая	387	573	70±4,9
G11		плохая	536	2127	Н.а
G12		плохая	298	535	Н.а.
G13		хорошая	309	500	Н.а.
G14		плохая	339	650	Н.а.

Примечания: * – растворимость в питательной среде RPMI1640; Н.а – нет активности



Для изучения антивирусной активности соединений использовали не токсичные концентрации, ниже CC_{50} (от 250 мкг/мл). Схемы внесения были следующими: обработка клеток за 1–2 часа до заражения (1); присутствие во время адсорбции вируса (2); внесение соединений после адсорбции и отмытки клеток от не адсорбированного вируса, в составе поддерживающей среды (3); совместная инкубация вируса и соединений с последующим инфицированием этой смесью клеток – вирулицидная активность (4).

При использовании 1, 2 и 4 схем обработки клеток не выявлено какого-либо влияния соединений на репродукцию аденовируса (данные не приводятся). При внесении соединений G6, G9, G12, G13 после адсорбции вируса (схема 3) не наблюдалось снижения количества инфицированных клеток со специфическими внутриядерными ДНК-содержащими включениями в сравнении с контролем вируса, т.е. эти соединения не влияли на репродукцию вируса. Угнетение репродукции HAdV5 показано для соединений G7, G8 и G10 (табл.). В концентрации 20 мкг/мл соединение G8 ингибировало репродукцию HAdV5 на 62%, а в концентрации 4 мкг/мл – на 16%. Соединение G10 в концентрации 20 мкг/мл угнетало репродукцию HAdV5 на 43%, в концентрации 4 мкг/мл – на 10%. Соединение G7 ингибировало репродукцию HAdV5 на 61% в концентрации 250 мкг/мл, на 42% и 21% в концентрациях 125 и 62 мкг/мл, соответственно.

Эффективная антивирусная концентрация, вызывающая редукцию 50% вирусспецифических внутриядерных включений, (EC_{50}) для G8 и G10 составляла 16 и 70 мкг/мл, а индекс селективности был равен 91 и 8, соответственно. EC_{50} для G7 равнялась 186 мкг/мл. Возможно, антивирусная активность соединений вызвана наличием остатка трифторметила в триазольном кольце молекулы.

Наибольшее число антивирусных препаратов, внедренных в медицинскую практику – нуклеозиды, модифицированные в гетероциклическом, фосфатном или углеводном фрагментах молекул. Пиримидиновые и пуриновые основания входят в структуру молекулы нуклеиновых кислот как фосфорилированные N-гликозиды, их изменение, путем замены групп атомов или отдельных атомов, приводит к получению аномальных антиметаболитов, имитирующих природные, способных вступать в биохимические реакции и нарушать нормальный метаболический процесс [5].

Десятилетние исследования в области химии фтор-сахаров и нуклеозидов послужили основой для разработки ряда перспективных химиотерапевтических препаратов с противоопухолевыми и антивирусными активностями. А усовершенствование методов синтеза соединений позволило создать на их основе известные лекарственные препараты. Известно, что введение атома фтора в гетероциклические системы значительно влияет на физические, химические и биологические свойства молекулы. Дальнейший прогресс в этом направлении исследований связан с синтезом новых фторированных нуклеозидов, а также более глубоким пониманием механизмов их действия. [6, 9, 11, 13].

Поскольку соединения G8 и G10 не обладали вирулицидной активностью и не влияли на адсорбцию вируса, а их действие показано только в случае присутствия соединений непосредственно во время репродукции аденовиру-



са, то можно предположить, что аномальные нуклеозиды G8 и G10 влияли на репликацию вирусной ДНК.

Таким образом, изучена цитотоксическая и антиаденовирусная активность 9-ти новых фторированных нуклеозидов. Выявлена зависимость цитотоксичности соединений от структуры заместителей в ароматических кольцах молекул. Показана антиаденовирусная активность для соединений G8 и G10, которая, возможно, вызвана наличием остатка трифторметила в триазольном кольце молекулы. Высокие показатели антивирусной активности и незначительная цитотоксичность соединения G8 делают его перспективным в плане разработки антивирусного средства, направленного на преодоление инфекций, вызванных аденовирусами.

Л.О. Білявська¹, О.Ю. Повниця¹, Ю.Г. Шермолович², Г.П. Гудзь²,
Н.В. Нестерова¹

¹ Інститут мікробіології і вірусології НАН України, вул. Заболотного, 154, Київ, 03680, Україна,
e-mail: bilyavskal@ukr.net,

² Інститут органічної хімії НАН України, вул. Мурманська 5, Київ, 02660, Україна

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИАДЕНОВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ НОВИХ ФТОРОВМІСНИХ ГЕТЕРОЦИКЛІЧНИХ СПОЛУК

Реферат

Мета роботи: дослідження цитотоксичної дії і антивірусної активності нових фторовмісних нуклеозидних сполук на моделі аденовірусу людини і визначення ролі окремих фрагментів молекул в їх активності. **Методи.** Цитотоксичну дію сполук визначали колориметричним МТТ-методом. Антивірусну активність речовин вивчали цито-морфологічним методом за наявності вірусспецифічних внутрішньоядерних включень, застосовуючи барвник акридинової оранжевий. **Результати.** У даній роботі досліджено цитотоксичність 2N-заміщених-4-тозил-5-поліфторалкіл-1,2,3-триазолов для клітинних ліній Hep-2 і Hela. Виявлено залежність токсичності сполук від структури замісників в ароматичних кільцях молекул. Посадження залишків 3-хлор-тетрагідропірану, 3-хлор-тетрагідрофурану або дигідрофурану в глікозидній частині молекули з трифторметилом або перфторпропілом в триазольному кільці посилювало токсичність сполук. *In vitro* показано антиHAdV5 активність 3-х сполук (G7, G8 і G10). Ефективна антивірусна концентрація (EC50) для них складала 16, 70 і 186 мкг/мл, а індекс селективності дорівнював 91, 8 і 4, відповідно. **Висновки.** Високі показники антивірусної активності і незначна цитотоксичність сполуки G8 роблять її перспективною в плані розробки антивірусного засобу, спрямованого на подолання інфекцій, викликаних аденовирусами.

Ключові слова: фторовмісні нуклеозиди, аденовірус, антивірусна активність.



L.O. Biliavska¹, O.Yu. Povnitsia¹, Yu.G. Shermolovich², G.P. Gudz²,
N.V. Nesterova¹

¹D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine,
154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, 03680, Ukraine, e-mail: bilyavskal@ukr.net

²Institute of Organic Chemistry NAS of Ukraine, 5, Murmanska str., Kyiv, 02660, Ukraine

STUDY OF ANTIADENOVIRAL ACTIVITY OF NEW FLUORINE-CONTAINING HETEROCYCLIC COMPOUNDS

Summary

Purpose: To study the cytotoxic action and antiviral activity of new fluorinated nucleoside compounds on human adenovirus model and the role of individual molecular fragments in their activity. **Methods.** Cytotoxic activity of the compounds was determined by the MTT method. Antiviral activity of substances was studied using cyto-morphological method with acridine orange dye. The virus-specific intranuclear inclusions were determined. **Results.** In present study the cytotoxicity of 2N-substituted-4-tosyl-5-polyfluoroalkyl-1,2,3-triazoles for Hep-2 and Hela cell lines were studied. The dependence of cytotoxicity on the compounds in the structure of substituents in the aromatic rings of the molecules was defined. Combination of residues of 3-chlorotetrahydropyran, 3-chloro-dihydrofuran tetrahydrofuran in a glycosidic moiety with trifluoromethyl or perfluoropropyl in a triazole ring were more toxic. Antiviral activity of 3 compounds (G7, G8 and G10) against HAdV5 in vitro was revealed. The effective antiviral concentrations (EC_{50}) for them were 16, 70 and 186 mg/ml, and the selectivity indexes were equal to 91, 8 and 4, respectively. **Conclusions.** High rates of antiviral activity and low cytotoxicity of G8 compound make it perspective for development antiviral agents.

Key words: fluoro-containing nucleosides, adenovirus, antiviral activity.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дяченко Н.С., Нас И., Беренчи Д., Носач Л.Н. и др. Аденовирус, клетка, организм / Киев: Наук. думка, 1988. – 232 с.
2. Носач Л.Н., Дяченко Н.С. Цитопатология аденовирусной инфекции. – К.: Наукова думка. – 1982. – 124 с.
3. Носач Л.Н., Дяченко Н.С., Тарасишин Л.А. и др. Влияние рибамидила на экспрессию аденовирусного генома // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. – 1984. – № 11. – С. 41–45.
4. Носач Л.Н., Повниця О.Ю. Доклиническое исследование специфического антиаденовирусного действия лекарственных средств в культуре клеток на модели аденовируса. Методические рекомендации // Вестник фармакологии и фармации. – 2007, № 9. – С. 52–64.
5. Посібник з хіміотерапії вірусних інфекцій: Навчально-методичний посібник для лікарів/за ред. Дзюблік І.В. – К., 2004. – 176 с.



6. *Filler R, Saha R.* Fluorine in medicinal chemistry: a century of progress and a 60-year retrospective of selected highlights // *Future Med.Chem.* – 2009. – Vol. 1. – P. 777–791.
7. *Hovarth J., Kulcsar G., Ugryumov I. et al.* Effect of adenovirus infection on human peripheral lymphocytes // *Acta Microbiologica.* – 1983. – Vol. 30. – № 3. – P. 203–209.
8. *Kinchington P., Romanowski E., Gordon G.* Prospects for adenovirus antivirals // *J of Antimicrobial Chemotherapy.* – 2005. – Vol. 55. – P. 424–429.
9. *Liu P., Sharon A., Chu C.K.* Fluorinated nucleosides: synthesis and biological implication // *J.Fluor.Chem.* – 2008. – Vol. 129. – P. 743–766.
10. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J Immunol. Methods.* – 1983. – 65. – P. 55–63.
11. *Qiu X.L., Xu X.H., Qing F.L.* Recent advances in the synthesis of fluorinated nucleosides // *Tetrahedron.* – 2010. – Vol. 66. – P. 789–843.
12. *Runde V., Ross S., Trensche R. et al.* Adenoviral infection after allogenic stem cell transplantation (SCT) report on 130 patients from a single SCT unit involved in a prospective multi centre surveillance study // *Bone Marrow Transplantation.* – 2001. – 28 – P. 51–57.
13. *Strunecka A., Patocka J., Connett P.* Fluorine in medicine // *J.Applied Biomedicine.* – 2004. – Vol. 2. – P. 141–150.
14. *Walls T., Shankar A.G., Shingadia D.* Adenovirus: an increasingly important pathogen in pediatric bone marrow transplant patients // *Lancet.Infect. Dis.* – 2003. – 3. – P. 79–86.
15. *Wang W.H., Wang H.L.* Fulminant adenovirus hepatitis following bone marrow transplantation. A case report and brief review of the literature // *Arch. Pathol. Lab.Med.* – 2003. – 127. – P. 246–248.

Стаття надійшла до редакції 12.02.2014 р.

