

УДК 619: 578.831

А. С. ТУРМАГАМБЕТОВА, А. П. БОГОЯВЛЕНСКИЙ, В. Э. БЕРЕЗИН

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ СРЕДСТВ ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

(РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г. Алматы)

Описаны основные классы химических соединений успешно используемых в противовирусной терапии. Показано, что действие антивирусных препаратов возможно на любой стадии репродукции вируса.

Введение. На сегодняшний день инфекционные заболевания входят в тройку основных причин гибели людей и животных. Ежегодно во всем мире заболевает около 2 млрд человек, из которых гибнет более 17 млн [1, 2].

Вирусные инфекции составляют не менее 60% случаев от всех инфекционных заболеваний человека и животных. Число вирусных инфекций, представляющих серьезную угрозу здоровью и жизни человека, а также наносящих значительный экономический ущерб, не сокращается, а в последние годы даже возросло. Наиболее яркими примерами последних лет являются эпи-

демия СПИДа, вируса гепатита С, появление новой смертельно опасной разновидности вируса гриппа [3]. Все это заставляет ученых всего мира усилить разработки в области создания эффективных средств профилактики и лечения вирусных инфекций, а также в изучении фундаментальных механизмов формирования резистентности организма к вирусным инфекциям [4-6].

Основой противовирусной терапии является воздействие на вирус или его составляющие компоненты на той или иной стадии репродукции. Весь процесс репродукции вирусов может быть условно разделен на три фазы (рис. 1) [4]. Первая

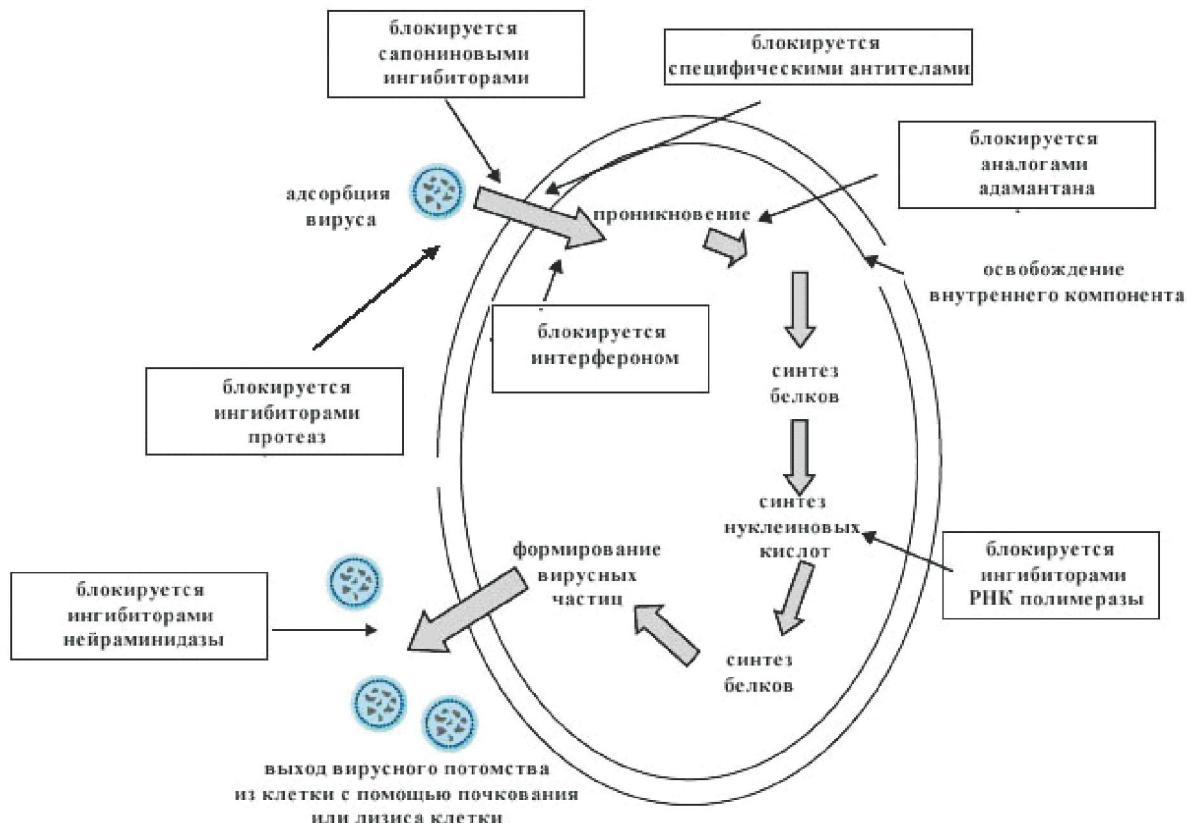


Рис. 1. Цикл репродукции вируса гриппа [4]

фаза охватывает события, которые ведут к адсорбции и проникновению вируса в клетку, освобождению его внутренних структурных компонентов и модификации его таким образом, что он способен вызвать инфекцию. Вторая фаза репродукции связана со сложными процессами, в течение которых происходит экспрессия вирусного генома. Заключительной стадией репродукции является выход вирусного потомства из клетки путем почкования, или за счет лизиса, причем, в последнем случае, клетка погибает [7]. Имеющийся на сегодняшний день арсенал противовирусных средств способен оказывать воздействие на любой из этапов репродукции вируса.

Адсорбция и проникновение вируса в клетку. Взаимодействие вируса с клеткой начинается с процесса адсорбции, т.е. прикрепления вирусных частиц к клеточной поверхности. Этот процесс протекает при наличии соответствующих рецепторов на поверхности клетки и «узнающих» их субстанций на поверхности вируса. Прикрепление вируса к клетке происходит в два этапа,

один из которых неспецифический, другой - специфический. Поэтому химиотерапия этого этапа инфекции может быть также разделена на специфическую и неспецифическую. Неспецифическая стадия блокирования адсорбции вируса в первую очередь связана с электростатическими взаимодействиями между вирусом и клеткой, поэтому использование полианионных соединений, таких как полисульфаты, полисульфонаты, поликарбоксилаты, полиоксаметалаты, полинуклеотиды, негативно заряженные альбумины или пептиды, эффективно ингибирует адсорбцию вирусов. Другой не менее интересной группой химических соединений, подавляющих адсорбцию вирусов, можно назвать тритерпеновые сапонины и стероидные соединения, которые в силу своих структурных особенностей, связываясь с холестерином мембранны, способны изменять пространственную структуру мембранны клетки [8]. Установлено, что наличие у подобных препаратов трех сахарных остатков 3-O-β-хакотриозила увеличивает противовирусную активность соединений (рис. 2).

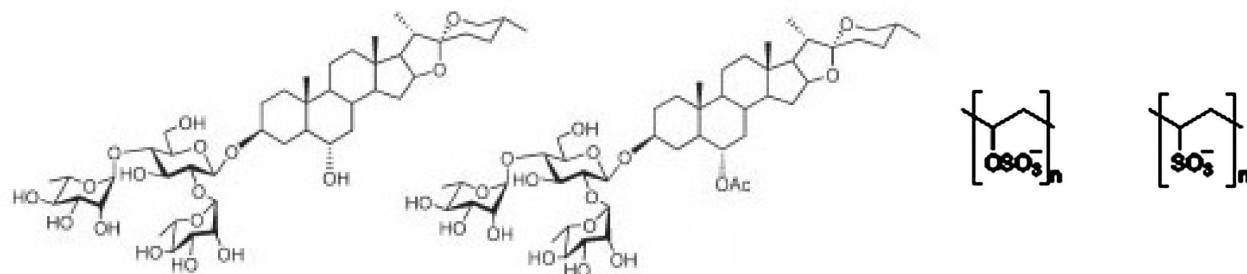


Рис. 2. Соединения, блокирующие стадию адсорбции вируса [8]

Другой важной группой неспецифических ингибиторов репликации вирусов являются интерфероны и их индукторы. Прикрепляясь к клеточным рецепторам интерфероны запускают многочисленные вторичные процессы, которые могут подавлять практически любой этап размножения вирусов. Основной механизм действия интерферонов заключается в индукции синтеза протеинкиназы, участвующей в инициации трансляции [9].

К специфическим факторам блокирования адсорбции вируса на клетке можно отнести многочисленные варианты использования аналогов рецепторов, позволяющих «увести» вирусную частицу от поверхности клетки и специфические антивирусные антитела, связывающиеся с вирусными рецепторами.

Освобождение внутреннего компонента вируса. После проникновения вириона в клетку происходит целый комплекс превращений вируса, смысл которых заключается в удалении вирусных защитных оболочек, препятствующих экспрессии вирусного генома. Этот процесс сопровождается рядом характерных особенностей: исчезает инфекционность вируса, появляется чувствительность к нуклеазам, возникает устойчивость к нейтрализующему действию антител. Основной группой химических соединений способных подавлять репродукцию вирусов на этой стадии являются аналоги адамантана [10].

Адамантан – трициклический углеводород состава $C_{10}H_{16}$, молекула которого состоит из трех циклогексановых колец [11]. Перспективность применения производных адамантана

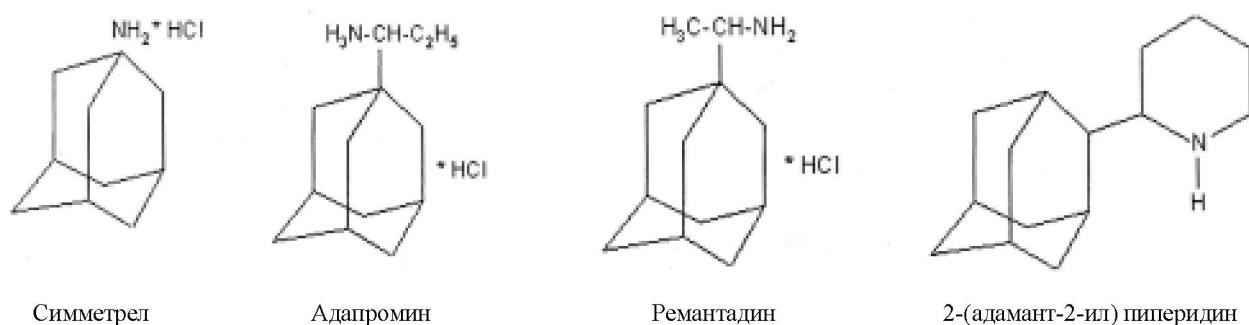


Рис. 3. Аналоги адамантана, используемые в противовирусной терапии

обуславливается набором специфических свойств: относительно большой размер адамантинового радикала (его диаметр составляет 5 E), высокая липофильность (растворимость в неполярных растворителях), конформационная жесткость. Сейчас сам адамантан не используется, но возможность введения в положение 1 или 3 различных заместителей сделало его перспективным для противовирусной терапии (рис. 3) [12].

Еще в 1966 г. в медицинскую практику был введен гидрохлорид 1-аминоадамантана в качестве антивирусного средства. В медицине это соединение часто называют мидантаном или амантадином, но фирменное название симметрел. Механизм действия симметрела состоит в том, что аминоадамантан и его производные “вмешиваются” в ранние этапы репродукции вирусов, а их ингибирующее действие связано с латентным периодом – началом репликации и синтеза вирусспецифических РНК [10]. Этот процесс происходит за счет блокирования М2 каналов оболочки вируса на этапе раздевания вирусных частиц, что препятствует изменению pH среды внутри эндосом и дальнейшему инфекционному процессу гриппа.

Экспрессия вирусного генома и сборка вирусных частиц. Этот этап репродукции вирусов является самым сложным и состоит из транскрипции нуклеиновых кислот, трансляции белков, посттрансляционных модификаций вирусных белков, репликации нуклеиновых кислот, сборки вирусных частиц. Этот этап репродукции вирусов успешно блокируется 3 основными группами соединений: аналогами нуклеотидов, ингибиторами РНК полимераз и ингибиторами посттрансляционных модификаций белков.

Механизм действия аналогов нуклеотидов

леиновых кислот по принципу антиметаболизма. Антиметаболическое действие большинства этих соединений в клетке начинается на стадии фосфорилирования вирусспецифической тимидинкиназой (вирусы герпеса и оспы), которая обладает большим сродством к аналогам нуклеотидов, чем к тимидину. К классу аналогов нуклеозидов относятся как тимидиновые, так и пуриновые аналоги: – видарабин (Ара А), ацикловир (АЦВ), бромвинилдезоксиуридин (БВДУ), идоксуридин (ИДУ), трифлуоротимидин (ТФТ) и некоторые другие (рис. 4).

Установлено, что антивирусный препарат ацикловир наиболее эффективен при лечении вируса простого герпеса типа 1 и 2, а также в случае цитомегаловирусной инфекции [13]. Препарат является аналогом 2'-дезоксигуанозина, антивирусный эффект после метаболического превращения вещества определяет соединение ацикловиртрифосфат, ингибирующее синтез вирусной ДНК при конкуренции с 2'-дезоксигуанозином за субстрат для вирусной ДНК-полимеразы. На этой стадии АЦВ включается в репликацию и синтез вирусной ДНК останавливается.

В настоящее время для терапевтического применения одобрен целый ряд препаратов, являющихся производными АЦВ (рис. 5). Так, препарат валацикловир является производным АЦВ и назначается в случае профилактики цитомегаловирусной инфекции и лечения вируса простого герпеса. Ганцикловир – это также ацикллический гуанинсодержащий нуклеозид, отличающийся от АЦВ добавлением гидроксиметильной группы в 3'-позиции с ациклической стороны цепи. Препарат используется для лечения как генерализованной, так и локальной инфекции, например, в случае цитомегаловирусных ринитов [13, 14]. Пенцикловир по структуре сходен с ганцикловиром,

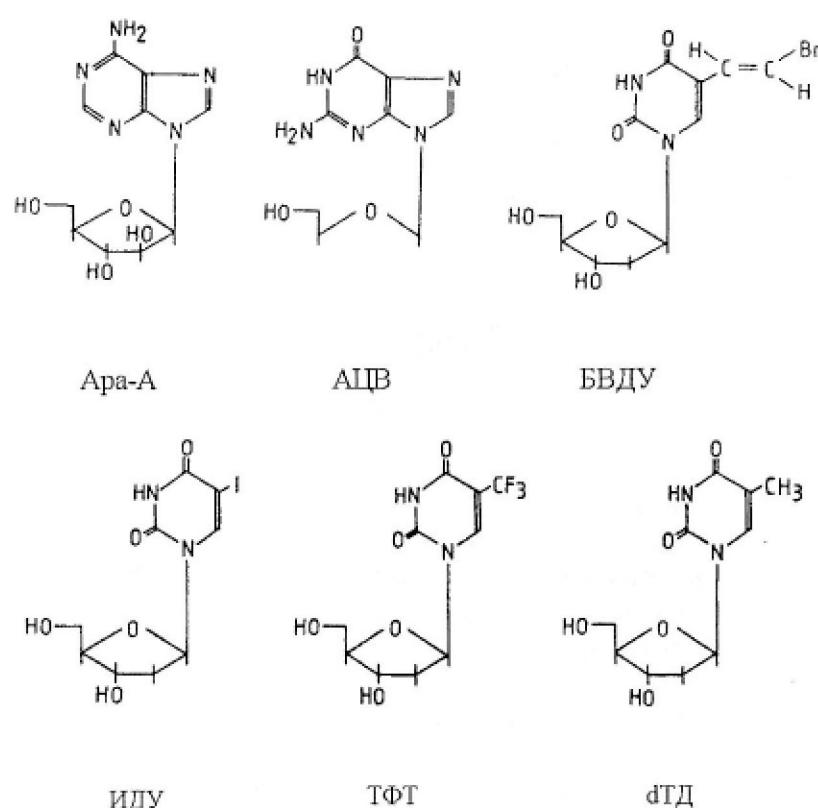


Рис. 4. Формулы основных аналогов нуклеозидов

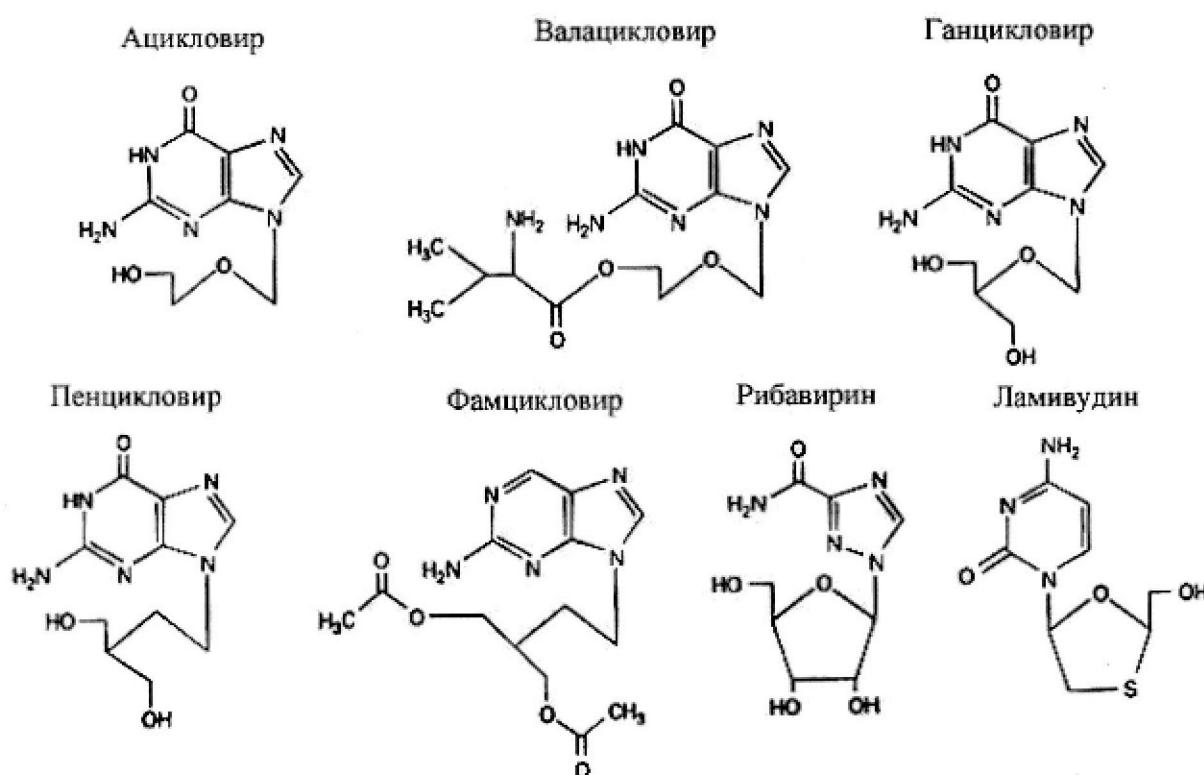


Рис. 5. Химическая структура АЦВ и его производных

отличается только заменой метиленового моста для эфира кислорода в ациклической части молекулы рибозы. Его метаболизм и механизм действия сходны с АЦВ.

Препарат фамцикловир представляет собой диацетил-6-дезокси аналог пенцикловира. При пероральном применении наблюдается высокий уровень абсорбции и быстрый метаболизм в пенцикловир в процессе диацетилирования в гастроэнтеральном тракте. Пенцикловир обладает высоким уровнем биодоступности ($> 77\%$). Немаловажным обстоятельством является способность Фамцикловира в 33% случаев подавлять репродукцию штаммов, резистентных к АЦВ.

Антивирусный препарат рибавирин (рис. 5) является аналогом гуанозина и имеет незавершенное пуриновое кольцо. После этапа внутриклеточной фосфорилиации, рибавирин-трифосфат препятствует ранним этапам вирусной транскрипции (кэппинг и элонгация) и-РНК и таким образом ингибитирует синтез рибонуклеопротеина. Рибавирин в форме 5'-трифосфата подавляет активность фермента, синтезирующего вирусную РНК-полимеразу. Рибавирин имеет широкий спектр активности *in vitro* [15]. Эффективно подавляет такие инфекционные заболевания, как Лихорадка Ласса, Хантавирус, вирус гепатита С, вирусы гриппа А и В, парагриппа, респираторный синцитиальный вирус, корь [16]. Рибавирин является пока единственным противовирусным препаратом для лечения респираторно-синцитиальных вирусных бронхитов и пневмоний [17]. Также препарат оказался эффективным в лечении ряда геморрагических лихорадок, вызываемых буньявирусами [17]. Имеются сообщения о применении рибавирина в терапии вирусного клещевого энцефалита. По данным, полученным американскими вирусологами, он эффективно ингибитирует формирование специфической структуры и-РНК семейства поксивирусов. Область применения рибавирина, как противовирусного препарата широкого спектра действия, была неожиданно расширена в связи с появлением в 2003 году новой инфекции – тяжелого острого респираторного синдрома. В основе лечения этого вида тяжелой патологии лежит пероральное применение массивных ежедневных доз рибавирина в комбинации с б-2-интерфероном [14, 17]. Другим аналогом нуклеотидов является пирамидиновый нуклеозид ламивудин (рис. 5), который

эффективен в отношении ретровирусных инфекций. Ламивудин показан для монотерапии при лечении хронического гепатита В и в комбинации с другими препаратами при лечении ВИЧ.

Многие белки вирусов требуют посттрансляционных модификаций, одним из которых является процессинг -протеолитическое расщепление, в том числе, за счет протеаз хозяина. Во время этого процесса вирусные белки (в частности, гликопротеиды), приобретают функциональную активность лишь после того, как произойдет их нарезание в специфических сайтах. В результате такого нарезания, формируются активные белки прикрепления и слияния, в результате чего вирусная частица приобретает инфекционную активность. В настоящее время в опытах *in vivo* были исследованы несколько эффективных ингибиторов протеаз ретровирусов: саквинавир, ритонавир, индинавир, нельфинавир (рис. 6). Механизм действия подобных препаратов связан с образованием ацил-ферментных производных и основан на блокировании одной из трех основных областей, критичных для активности аспарагиновой протеазы вируса: каталитическое ядро фермента, содержащее пару Asp-Thr/Ser-Gly триад, мобильная flap-область и домен димеризации на N- и C-концах протеазы.

Протеаза других РНК и ДНК-содержащих вирусов также является важным ферментом и потенциальной целью для противовирусных препаратов. Сложность получения ингибиторов этого фермента обусловлена геометрией каталитического сайта и расширенной площадью взаимодействия с субстратом, однако появились сообщения о некоторых группах химических соединений, способных блокировать фермент. Так, группа моноциклических в-лактамных ингибиторов, оксазолины, имидазолины действуют путем ацилирования активного сайта серина с образованием стабильного ацил-ферментного продукта, блокируя протеазу вируса. [18].

Выход вирусного потомства. Завершающим этапом репродукции вируса является выход вирионов из инфицированной клетки. Этот процесс может протекать с помощью почкования вируса и лизиса клетки. Лизис клетки, как правило, сопровождается гибеллю клетки. Блокировать такой механизм выхода вируса практически невозможно.

Выход из клетки путем почкования осуществляют вирусы с липопротеиновой оболочкой.

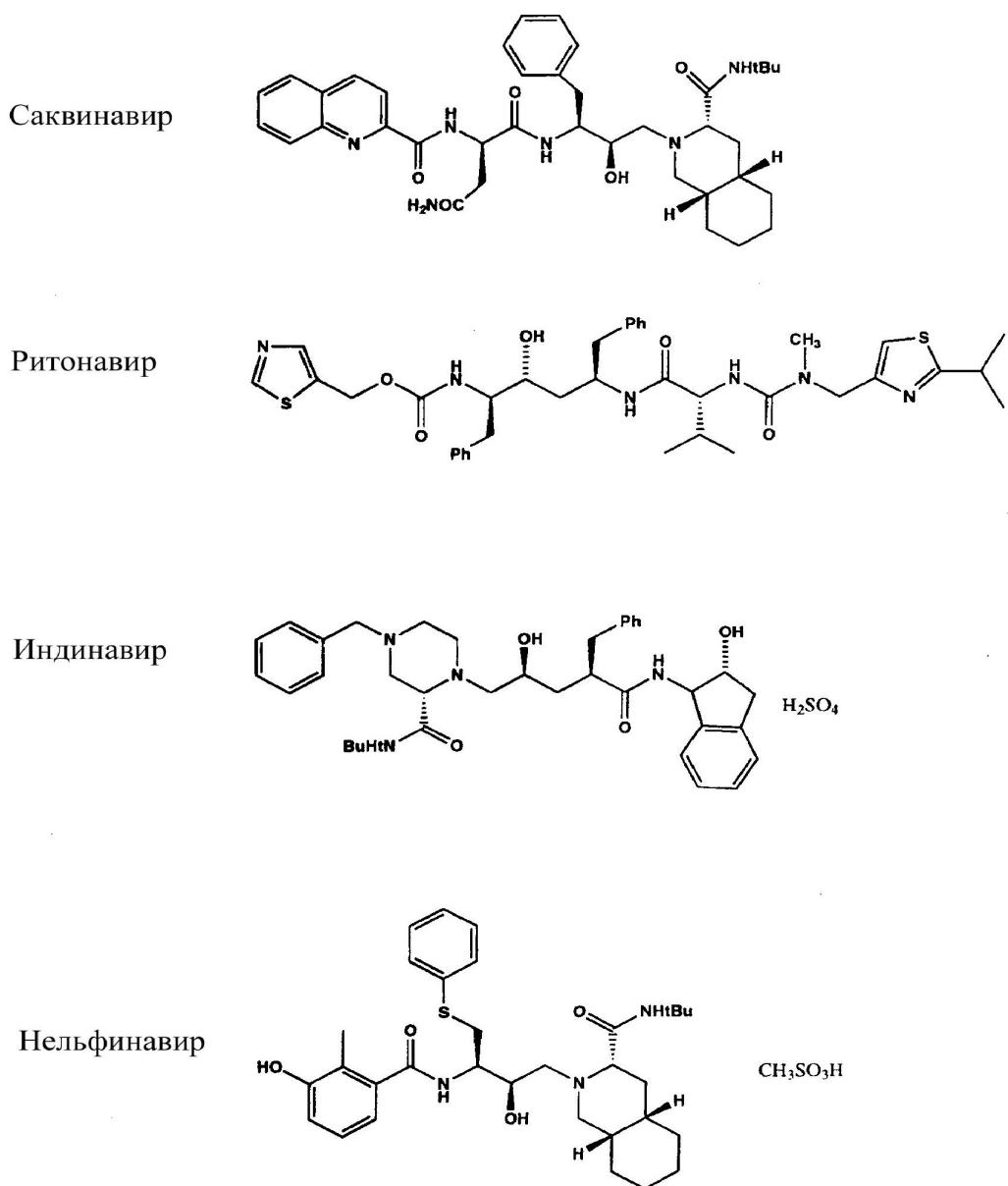


Рис. 6. Строение основных ингибиторов протеаз

При этом способе клетка может длительное время сохранять жизнеспособность и продуцировать вирусное потомство, пока не произойдет полное истощение ее ресурсов. Одним из механизмов блокирования этого этапа репродукции вируса является использование ингибиторов ферментативной активности вируса, участвующей в почковании вируса. Разработка препаратов группы ингибиторов вирусного фермента нейраминидазы (NA) является успешным целевым достижением современной науки последних лет – «национального лекарственного дизайна», так как при синтезе были использованы современные знания

третичной структуры NA как антигена и фермента [19].

Препараты с антинейраминидазным действием «имитируют» структуру натуральных субстратов каталитического сайта NA (рис. 7), что «привлекает» вирус к большему взаимодействию с ними [20].

Первые официальные сообщения о препаратах с антинейраминидазным действием были сделаны M. von Itzstein et al. в 1993 году (занамивир) и C. U. Kim et al. – в 1997 (осельтамивир) [20]. Их практическое применение было начато в 1999 году, при этом осельтамивир достаточно

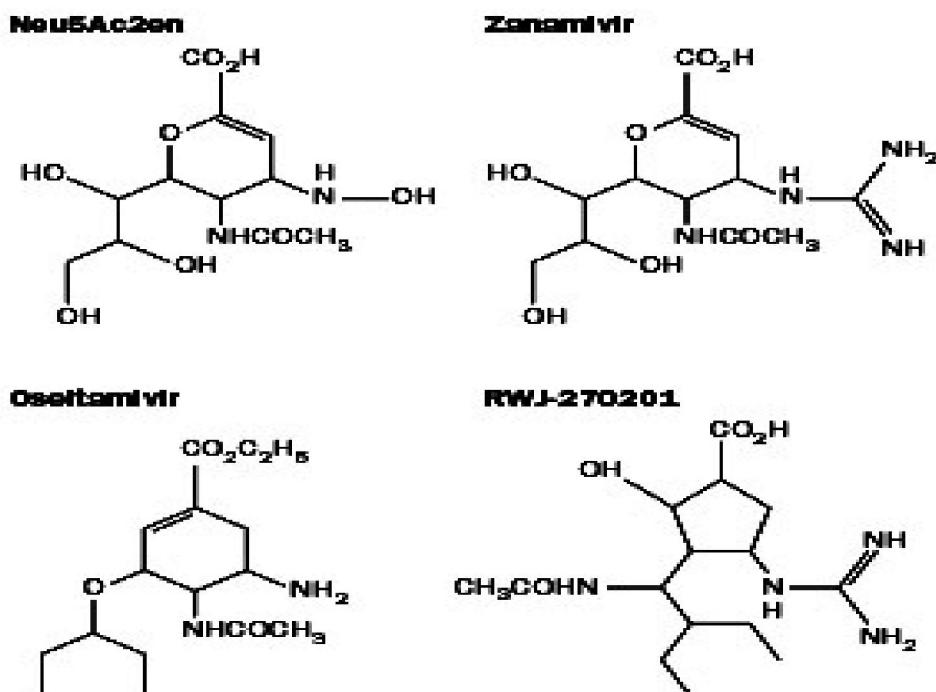


Рис. 7. Структура ингибиторов нейраминидазы

быстро завоевал право быть препаратом выбора для лечения гриппозной инфекции в период эпидемий и для создания резерва на случай пандемии [1]. С появлением резистентных к нему вирусов в популяции эпидемических штаммов А(H1N1), а также среди высокопатогенных штаммов вируса гриппа птиц А(H5N1) эксперты ВОЗ дополнili рекомендации в Планах подготовки к пандемии включением в список занамивира [21].

Занамивир – препарат, который вводится непосредственно в респираторный тракт в форме мелкодисперсного порошка при помощи ингалятора. Он не подвергается метаболизму, при этом создаются условия распределения активного вещества в высоких концентрациях: до 90% – в верхних дыхательных путях, от 10 до 20% – в легких. Исследователи указывают на два неоспоримых достоинства занамивира, способствующих предупреждению формирования резистентных мутантов вирусов гриппа к препаратау. Первое – концентрация, создаваемая на протяжении респираторного тракта, превышает необходимую для подавления репродукции вируса как минимум в два раза (IC₅₀). И второе – противовирусное действие занамивира начинается в течение 10 секунд после его введения. Помимо этого,

молекуле занамивира не требуется конформационных изменений для связывания с вирусной нейраминидазой. Кроме того, 5 – 15% от общей дозы выводится в неизмененном виде через почки, что является важным преимуществом и позволяет применять этот препарат у лиц с хроническими заболеваниями с большей эффективностью по сравнению с системными препаратами, подвергающимися метаболизму [19, 20].

Заключение. На сегодняшний день практическая медицина обладает достаточно внушительным арсеналом противовирусных средств, способных подавлять репродукцию вируса на любой стадии процесса. Однако, несмотря на определенные успехи, достигнутые в вирусной химиотерапии, клиническая практика сталкивается с серьезной проблемой появления вариантов вируса, устойчивых к тем или иным препаратам. Так, эффективность адамантана и его производных в настоящее время ограничивается появляющимися резистентными штаммами вируса гриппа А. Формирование резистентности штаммов обусловлено заменой аминокислот в положениях 26, 27, 30, 31 и 34 трансмембранный части М2-канала [4, 19]. При анализе более 60 000 штаммов вируса гриппа А (H3N2), выделенных в различных странах мира за последнее

десятилетие, выявлено увеличение устойчивости к ингибиторам М2-каналов с 0,4% в 1995 году до 12,3% в 2004 году. Частота устойчивости оказалась самой высокой в Азии: в Китае в 2004 году резистентными были 73,8% выделенных штаммов [4]. В США также наблюдалась высокая частота устойчивости к амантадину штаммов вируса гриппа А, выделенных в сезоны 2005–2006 гг. и 2006–2007 гг. Так, у 72,0–92,3% штаммов вируса гриппа А (H3N2) и 25% штаммов вируса гриппа А (H1N1) выявлена замена аминокислоты в позиции 31 гена М2-канала. Аналогичная частота резистентности к вирусу гриппа А/H3N2 (91%) наблюдалась в этот период в Канаде [2].

Ранее считалось, что развитие резистентности вируса гриппа к ингибиторам нейраминидазы встречается редко и не является клинической проблемой. Частота резистентности клинических изолятов вируса гриппа А в 2001 году не превышала 1,5% (резистентность к осельтами-вирусу составляла 0,32 и 4,1% у взрослых и детей соответственно), а среди штаммов гриппа В резистентных к препаратам не было обнаружено [4]. Однако современные данные говорят о развитии резистентности к ингибиторам нейраминидазы от 0 до 64% изолятов вирусов гриппа А и В в различных странах мира [22].

Хуже всего обстоит дело с использованием ингибиторов вирусных протеаз, так как уже через несколько циклов репликаций вирусы способны обходить механизм действия подобных препаратов.

Изучение растительных препаратов, обладающих антивирусными свойствами (аллизарин, эпиген, протефлазид, госсипол), показало, что за счет разных механизмов действия препаратов (противовирусное и иммуностимулирующее) появление вирусов устойчивых к данным препаратам не наблюдается. Большое разнообразие биологически активных соединений, находящихся в растениях, произрастающих на территории Казахстана, позволяет рассчитывать на возможность получения новых высокоактивных препаратов, обладающих способностью блокировать различные вирусы, в том числе, резистентные к существующим коммерческим химиопрепаратам. Подобные препараты, сочетающие в себе свойства иммуностимулирующих и противовирусных соединений, можно рекомендовать для

лечения и профилактики инфекционных заболеваний, ассоциированных с иммунодефицитным состоянием, в том числе таких, как грипп, ВИЧ, гепатит С и др. [23, 24].

Особенности жизнедеятельности вирусов, как внутриклеточных паразитов на молекулярно-генетическом уровне, диктуют необходимость постоянного поиска веществ, обладающих способностью подавлять репродукцию и распространение вирусов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Thayer A.M. Flu fighters // Chem. Eng. News. 2009. V. 87. P. 15-26.
2. World Health Organization (WHO), CSR disease outbreak news. Available from: http://who.int/csr/don/2010_05_21/en/index.html.
3. World Health Organization (WHO), World Health Statistics 2011. Available from: http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS2011_TOC.pdf
4. Preziosi P. Influenza pharmacotherapy: present situation, strategies and hopes // Expert Opin. Pharmacotherapy. 2011.
5. Boltz D.A., Aldridge J.R., Webster R.G., et al. Drugs in development for influenza // Drugs. 2010. V. 70. P. 1349-1362.
6. Beigel J., Bray M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza // Antiviral Res. 2008. V. 78. P. 91-102.
7. Krug R.M., Aramini J.M. Emerging antiviral targets for influenza A virus // Trends. Pharmacol. Sci. 2009. V. 30. P. 269-277.
8. Li Y., Jiang R., Ooi L.S. et al. Antiviral triterpenoids from the medicinal plant *Schefflera heptaphylla* // Phytother. Res. 2007. V. 21. P. 466-470.
9. Логинова С.Я., Ковальчук А.В., Борисевич С.В. и др. Противовирусная активность индуктора интерферона амиксина при экспериментальной форме лихорадки Западного Нила // Вопр. вирусол. 2004. № 2. С. 8-10.
10. Cady S.D., Schmidt-Rohr K., Wang J., et al. Structure of the amantadine binding site of influenza M2 proton channels in lipid bilayers // Nature. 2010. V. 463. P. 689-692.
11. Balfour H. Antiviral Drugs // Drug Therapy. New Engl. J. Med. 1999. V. 340. P. 1255-1268.
12. Спасов А.А., Хамидова Т.Б., и др. Фармакологические и токсикологические свойства производных адамантана // Хим.-фарм. журнал. 2000. № 1. С. 3-9.
13. Sidwell R., Huffman J., Barnard M., Reist E. Effect of phosphonic acid analogs of acyclovir and gancyclovir on in vitro cytomegalovirus infections // Nucleotides and Nucleosides. 1989. V. 8. P. 833-836.
14. Галегов Г.А., Андронова В.Л., Леонтьева Н.А., и др. Этиотропная лекарственная терапия вирусных инфекций // Вопр. вирусол. 2004. № 3. С. 35-40.
15. Deyrup M., Sidwell R., Little R. et al. Improved delivery through biological membranes. Synthesis and antiviral activity of a series of ribavirin chemical delivery systems: 2' and 3' derivatives // Antiviral Chem. and Chemother. 1991. V. 2. P. 337-356.

16. *Sidwell R.* Ribavirin: A review of antiviral efficacy // Abstr. Recent. Res. Devel. in Antimicrob. Agents and Chemother. (G. Pandalai, ed.) Research Signpost. India, 1995. V. 1. P. 219-256.
17. *Варташян Р.В., Иванова Л.А., Кондрашина Н.Г., Львов Д.К.* Влияние рибавирина на репродукцию буньявирусов в культуре клеток и в эксперименте на белых мышах // Вопр. вирусол. 1992. № 2. С. 97-99.
18. *Patick A.K., Potts K.E.* Protease inhibitors as antiviral agents // Clinic. Microbiol. Rev. 1998, V. 11, № 4. P. 614-627.
19. *Hayden F.G.* Antiviral for influenza: historical perspectives and lessons learned // Antiviral research. 2006. V. 71. P. 372-378.
20. *Bantia S., Parker C.D., Ananth S.L. et al.* Comparison of the anti-influenza virus activity of RWJ-270201 with those of oseltamivir and zanamivir // Antimicrob. Agents and Chemother. 2001. V. 45, № 4. P. 1162-1167.
21. *Покровский В.И., Онищенко Г.Г., Черкасский Б.Л.* Современные представления об инфекционной патологии и основные направления совершенствования стратегии ее профилактики // Вестник РАМН. 2000. № 1. С. 3-6.
22. *Ferraris O., Lina B.* Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance // J. Clin. Virol. 2008. V. 41. P. 9-13.
23. *Fabricant D.S., Farnsworth N.R.* The value of plants used in traditional Medicine for drug discovery // Environmental Health Perspectives. 2001. V. 109. P. 69-75.
24. *Safrin S.* Antiviral agents. Basic and clinical pharmacology. In: Katzung B.G., editor, McGraw-Hill, New York. 2007. P. 815.

Резюме

Вируска қарсы терапияда көнінен қолданып келе жатқан химиялық байланыстардың негізгі класстары сипатталған. Вируска қарсы препараттардың әсері вирус репродукциясының кез келген кезеңінде бола-тындыбы көрсетілген.

Summary

The article describes main classes of chemical compounds are successfully used in antiviral therapy. It is shown that the effect of antiviral preparations is possibly at any stage of viral replication.