БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 2013, том 39, № 5, с. 594–603

УДК 577.113.3

АРСЕНОЛИЗ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ СПОСОБЕ ПОЛУЧЕНИЯ РИБАВИРИНА. ИНГИБИРОВАНИЕ РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА ГРИППА А *in vitro И in vivo* С ПОМОЩЬЮ КОМБИНАЦИИ РИБАВИРИНА И ОЗЕЛЬТАМИВИРА

© 2013 г. И. Д. Константинова*, #, И. В. Фатеев*, Г. А. Галегов, П. Г. Дерябин**, А. Г. Ботиков**, И. С. Музыка*, Д. К. Львов**, А. И. Мирошников***

**ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

***ФГБУ "НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского" Минздрава РФ, Москва*

Поступила в редакцию 22.02.2013 г. Принята к печати 04.04.2013 г.

Усовершенствован биотехнологический способ получения противовирусного препарата рибавирина по реакции трансгликозилирования добавлением каталитических количеств арсената натрия в реакционную смесь. Такой подход позволяет гидролизовать избыточное количество природного нуклеозида – донора рибозы гуанозина и, как следствие, упростить состав реакционной смеси и процесс выделения рибавирина. Показано, что комбинация препаратов рибавирина и озельтамивира карбоксилата снижает репродукцию вируса гриппа А в культуре клеток по сравнению с каждым препаратом, взятым в отдельности. Аналогичные результаты получены в экспериментах на лабораторных животных (белых мышах Balb/C), инфицированных вирусом гриппа А H3N2/Aichi/68.

Ключевые слова: 1H-1,2,4-триазол-3-карбоксамид, рибавирин, вирамидин, реакция трансгликозилирования, нуклеозидфосфорилазы E. coli, грипп А, озельтамивира карбоксилат.

DOI: 10.7868/S0132342313050096

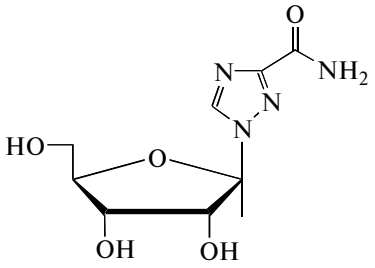
ВВЕДЕНИЕ

Комбинированная химиотерапия вирусных инфекций двумя и более препаратами с различным механизмом антивирусного действия, как хорошо известно, играет важную роль в лечении ВИЧ/СПИД инфекции и вирусных гепатитов В и С. Хотя для лечения гриппозной инфекции комбинации препаратов в практике не применяются, на экспериментальном уровне уже давно продемонстрирован высокий уровень антигриппозного действия комбинации амантадина (ремантадина) и рибавирина *in vitro* и *in vivo* [1].

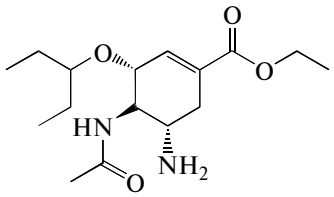
Недавно американские вирусологи обнаружили, что тройная комбинация амантадина, озельтамивира и рибавирина обладает *in vitro* и *in vivo* высоким уровнем антигриппозного действия [2, 3].

Рибавирин (**I**, 1-β-*D*-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид, Виразол) – модифицированный нуклеозид, действующий в отношении широкого спектра РНК- и ДНК-вирусов. Обладает выраженным лечебным действием при гепатите С, лихорадке Ласса, а также при гриппе А- и В-типов [2].

Озельтамивир (**II**, осельтамивир) – противовирусный препарат, относится к группе ингибиторов нейраминидаз, блокирует репликацию вирусов гриппа типа А и Б [4].



(I)



(II)

Рибавирин (**I**) и озельтамивир (**II**).

Сокращения: ТСА – 1*H*-1,2,4-триазол-3-карбоксамид; CD_{50} – 50% цитотоксическая доза; ЦПД – вирусспецифическое цитопатогенное действие; PNP – пуриннуклеозидфосфорилаза.

Автор для связи (тел.: +7 (495) 330-72-47; факс: +7 (495) 330-73-29; эл. почта: kid1968@yandex.ru).

Настоящее сообщение посвящено изучению комбинированного действия рибавирина как универсального ингибитора репродукции вирусов гриппа и ингибитора нейраминидазы вируса гриппа озельтамивира на гриппозную А инфекцию *in vitro* и *in vivo*.

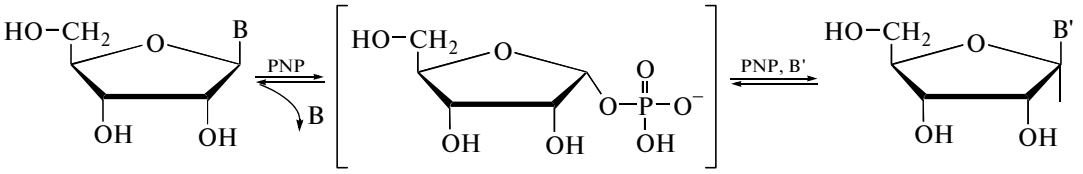
Обоснованием для проведения таких исследований послужили не только результаты американских коллег, но и наши более ранние эксперименты по изучению противогриппозного действия ремантадина совместно с рибавирином [5]. В этом плане по-новому вырисовываются противогриппозные свойства рибавирина. Мы считаем перспективным его применение в комбинированной терапии гриппозной инфекции, вызванной наиболее опасными в пандемическом плане вирусами животного происхождения.

Хорошо известно, что к рибавирину не формируются устойчивые штаммы вируса гриппа и в настоящее время рибавирин является обязательным препаратом при лечении гепатита С и входит в новый стандарт терапии: рибавирин-телапривир-интерферон-альфа [6, 7]. В связи с этим представляется важным проведение цикла исследований по созданию высокоэффективного биотехнологического способа получения субстанции препарата рибавирина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Способ получения 1-β–D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамида

Химико-ферментативный (биотехнологический) подход к синтезу рибавирина и его аналогов вытесняет в настоящее время многостадийные химические процессы, позволяет осуществлять ключевые превращения с высокой эффективностью, регио- и стереоселективностью [8, 9]. Основу биотехнологического способа синтеза рибавирина составляет *реакция трансгликозилирования* – ферментативная реакция переноса рибозы природного нуклеозида, гуанозина или инозина, на 1*H*-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (ТСА). Эта реакция катализируется бактериальной пуриннуклеозидфосфорилазой (PNP), которая, в отличие от PNP человека, способна воспринимать ТСА и его структурные аналоги в качестве субстрата [10]. Механизм реакции трансгликозилирования представлен на схеме 1 [11–13]. При проведении реакции в фосфатном буфере промежуточным продуктом ее является α-*D*-рибозо-1-фосфат, образующийся в активном центре фермента.

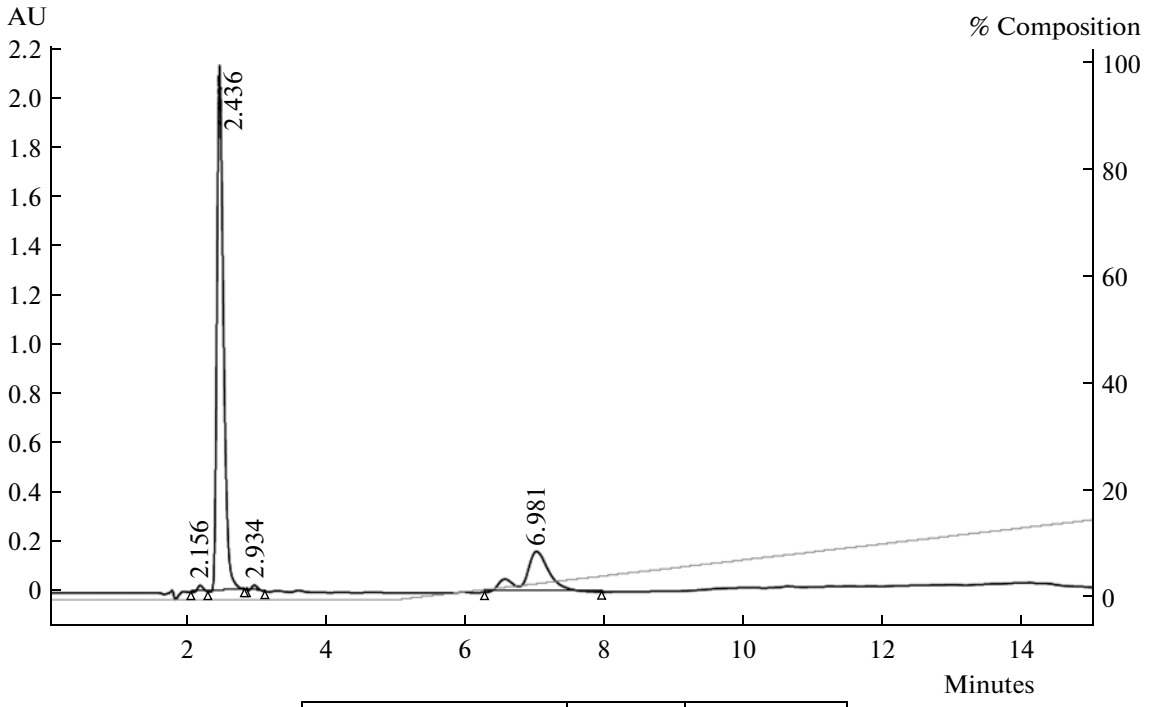


B = природное гетероциклическое основание;
B' = модифицированное гетероциклическое основание.

Схема 1. Механизм реакции трансгликозилирования.

При выборе источника рибозы предпочтительнее оказалось использовать гуанозин, т.к. образующийся в процессе реакции гуанин выпадает в осадок, смещая равновесие ферментативной реакции в сторону образования рибавирина. Степень конверсии ТКА в рибавирин составляет 98% при использовании гуанозина и 67% при использовании в качестве донора рибозы инозина.

Ранее мы сообщали о возможности синтеза рибавирина с помощью генно-инженерной PNP из штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3)/pERPUPHHO1 (КФ 2.4.2.1) [14–16]. В соответствии с разработанной нами методикой, 1,2,4-триазол-3-карбоксамид и гуанозин вводили в реакцию трансгликозилирования в фосфатном буфере при 60°С в присутствии иммобилизованных ферментов [8]. Выход составлял 67%. Однако при масштабировании этой технологии оказалось нецелесообразно использовать иммобилизованные ферменты, т.к. из-за кристаллизации образующегося в реакции гуанина на макропористом стекле активность иммобилизованных на нем ферментов постепенно снижалась. Кроме того, по окончании реакции кроме рибавирина в реакционной смеси присутствует избыточное количество гуанозина и гетероциклические основания, гуанин (Gua) и ТСА. Следовательно, для выделения целевого продукта, рибавирина, необходимо было использовать хроматографию. Данные ВЭЖХ стандартной реакционной смеси приведены на рис. 1.



Компоненты смеси	R_t, мин	Площадь, %
ТКА	2.156	0.81
Рибавирин	2.436	75.26
Гуанин	2.934	0.79
Гуанозин	6.981	23.14

Рис. 1. Данные ВЭЖХ реакционной смеси синтеза рибавирина (**I**) после охлаждения до комнатной температуры и удаления осадка гуанина.

В этой связи встала задача усовершенствования условий реакции трансгликозилирования для получения рибавирина. Мы обнаружили, что при добавлении в реакционную смесь каталитических количеств арсената натрия Na_2HAsO_4 (до 0.5 мМ) избыточное количество гуанозина в реакции в течение 2 ч быстро гидролизуется до гуанина, который при охлаждении до +4–8°C выпадает в осадок практически нацело. В результате состав реакционной смеси становится более простым (рис. 2).

Процесс арсенолиза природных нуклеозидов известен давно, и его механизм хорошо изучен [17, 18]. В присутствии солей мышьяковой кислоты в активном центре PNP из нуклеозида образуется интермедиат, α-D-рибозо-1-арсенат, который крайне неустойчив в водных растворах и быстро диссоциирует до рибозы и неорганического арсената. В мировой практике арсенаты применяются при гидролизе нуклеозидов до гетероциклических оснований [17, 18].

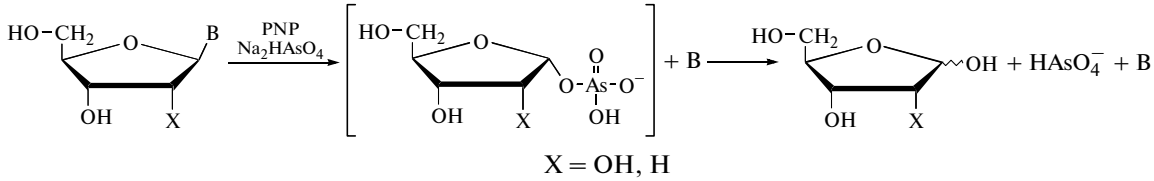


Схема 2. Схема арсенолиза природных нуклеозидов гуанозина, инозина и аденозина PNP *E. coli*.

Исследуя субстратную специфичность PNP *E. coli* в реакции арсенолиза, мы обнаружили, что фермент эффективно катализирует превращение только природных нуклеозидов пурино-

вого типа: гуанозина, инозина, аденозина и их ближайших структурных аналогов. На рис. 3 приведены кинетические кривые накопления гуанина в реакциях фосфоролиза, арсенолиза, а также параллельного проведения этих реакций. Видно, что арсенолиз гуанозина в указанных условиях завершается через 3 ч (98–99% гуанина).

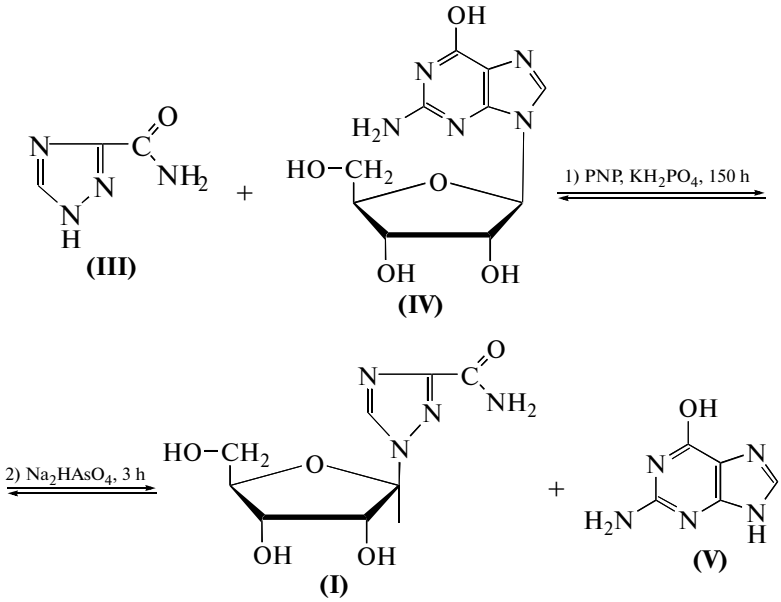


Схема 3. Синтез рибавирина с применением арсената натрия.

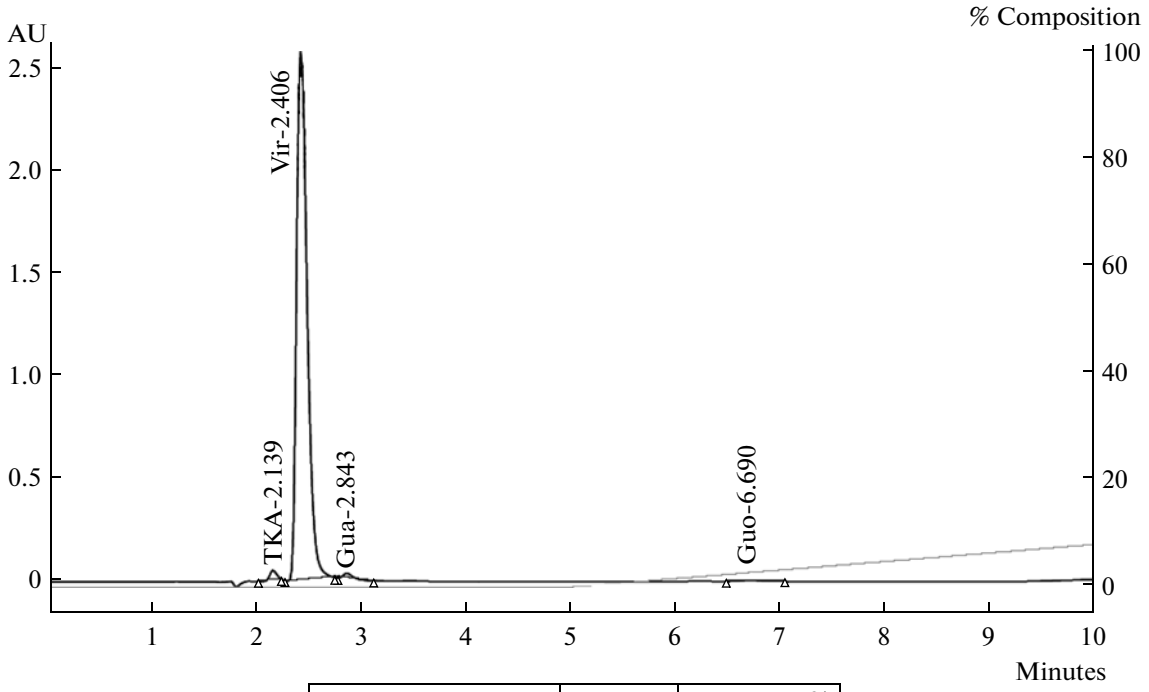
Мы также установили, что рибавирин является "плохим" субстратом для PNP *E. coli*: его фосфоролиз до ТСА проходит всего на 2.3% за 4 ч термостатирования (линия P, рис. 4) и он практически не подвергается арсенолизу – 0.16% за то же время (линия A) (рис. 4).

Это наблюдение позволило нам так подобрать условия ферментативного синтеза рибавирина (содержание фосфата калия и арсената натрия в реакционной смеси), что удалось селективно вывести из реакции избыточное количество гуанозина, практически не гидролизуя целевой продукт до ТСА. Изменение содержания компонентов реакционной смеси синтеза рибавирина после добавления арсената представлены на рис. 5.

Синтез рибавирина осуществляли следующим образом: 1,2,4-триазол-3-карбоксамид смешивали с гуанозином (в молярном соотношении 1 : 2) в калий-фосфатном буфере, добавляли PNP и смесь термостатировали при температуре 60°C в течение несколько дней. Когда конверсия ТСА в рибавирин по данным ВЭЖХ достигала 97–98%, реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры для осаждения гуанина. После удаления осадка из реакционной смеси в нее добавляли каталитическое количество Na_2HAsO_4 (до 0.5 мМ). Через 3 ч остаточное содержание гуанозина в реакционной смеси обычно составляло 0.2–0.5%. Сконцентрированную до 1/3 объема реакционную смесь выдерживали несколько часов при комнатной температуре, отфильтровывали гуанин и супернатант пропускали через ионообменную смолу DOWEX (H^+-форма). Далее элюат концентрировали примерно вдвое и оставляли при комнатной температуре до кристаллизации рибавирина. Для получения рибавирина фармакопейного качества проводили дополнительную кристаллизацию из смеси этанол–вода, 9 : 1.

Проведение процесса получения рибавирина описанным способом позволяет упростить процесс выделения продукта из реакционной смеси и получить рибавирин с выходом 82% и чистотой не менее 99%. На данный способ получения рибавирина нами была оформлена заявка на получение патента РФ (*Константинова И.Д., Фатеев И.В., Мирошников А.И.* "Способ получения 1-beta-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамида", патент РФ № 2480218 от 27.04.2013 г., приоритет от 06.12.2011 г.

Данным способом нами была получена экспериментальная партия препарата рибавирина в количестве 1.4 г, после чего в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского проводилось изучение противовирусной активности полученного рибавирина индивидуально и в сочетании с озельтамивиром в отношении вирусов гриппа типа А в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.



Компоненты смеси	R_t, мин	Площадь, %
ТКА	2.139	1.29
Рибавирин (Vir)	2.406	97.40
Гуанин (Gua)	2.843	0.86
Гуанозин (Guo)	6.690	0.45

Рис. 2. Данные ВЭЖХ реакционной смеси синтеза рибавирина (**I**) с применением арсената натрия после охлаждения до комнатной температуры и удаления осадка гуанина.

Оценку противовирусной активности соединений проводили на основе общепринятых методов: определение инфекционной активности, детекция вирусспецифических гемагглютининов и способности соединений предотвращать развитие вирусспецифического цитопатогенного действия (ЦПД).

Из данных, приведенных в табл. 1, следует, что и рибавирин, и озельтамивир, взятые в отдельности, обладают противовирусным действием *in vitro*,

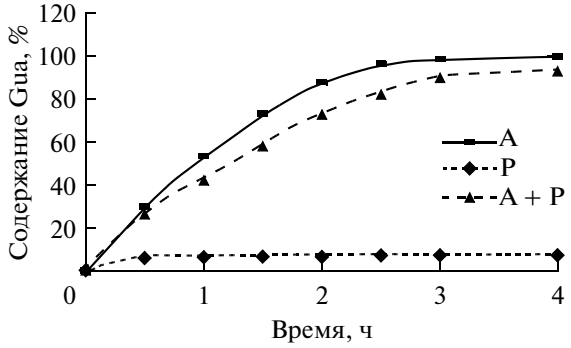


Рис. 3. Динамика накопления гуанина (Gua) в реакционной смеси по данным ВЭЖХ: водный раствор 2 мМ гуанозина с 0.78 ед. акт. PNP (2 мл, pH 7.0, 50°C) содержит: (A) – 0.25 мМ Na_2HAsO_4; (P) – 2 мМ KH_2PO_4; (A + P) – 0.25 мМ Na_2HAsO_4 и 2 мМ KH_2PO_4.

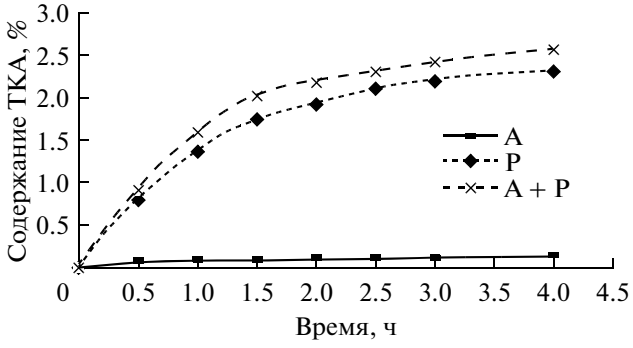


Рис. 4. Динамика накопления ТСА в реакционной смеси по данным ВЭЖХ: водный раствор 2 мМ рибавирина с 0.78 ед. акт. PNP (2 мл, pH 7.0, 50°C) содержит: (A) – 0.25 мМ Na_2HAsO_4; (P) – 2 мМ KH_2PO_4; (A + P) – 0.25 мМ Na_2HAsO_4 и 2 мМ KH_2PO_4.

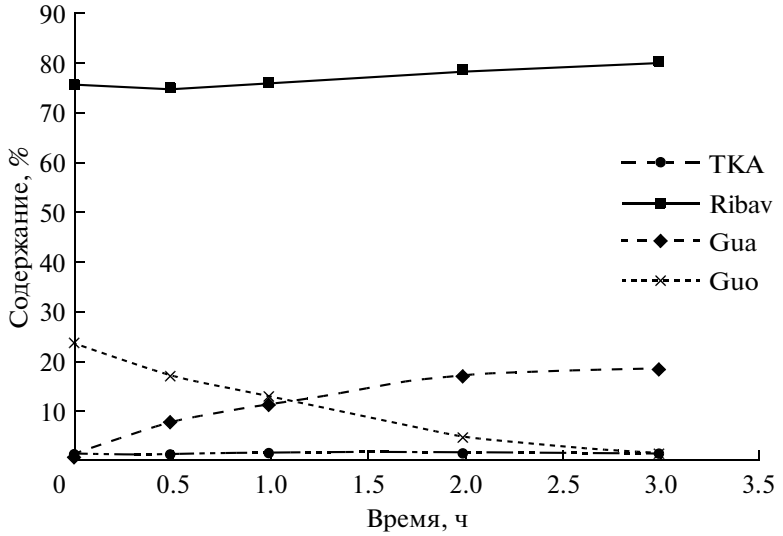


Рис. 5. Изменение содержания компонентов реакционной смеси синтеза рибавирина (по данным ВЭЖХ) через 3 ч после добавления арсената натрия и охлаждения до комнатной температуры.

снижая главный показатель репродукции вирусов – инфекционный титр вируса гриппа А – в зависимости от концентрации препаратов (дозозависимый эффект), однако наибольший противовирусный эффект был получен при одновременном использовании двух соединений на фоне двукратно увеличенной концентрации озельтамивира карбоксилата.

Эти результаты также подтверждаются данными, изложенными в табл. 2. Мы наблюдали эффективное подавление развития вирусспецифического ЦПД, при этом подавление ЦПД наиболее выражено в пробах, одновременно содержащих два препарата.

Из табл. 3 четко следует, что комбинация рибавирина и озельтамивира более эффективно обеспечивает выживание мышей (19 животных из 20 испытуемых) при гриппозной А инфекции по сравнению с каждым из препаратов, взятым в отдельности.

Таблица 1. Влияние рибавирина, озельтамивира карбоксилата и их комбинации на репродукцию вирусов гриппа А в культуре клеток MDCK. Определение величины инфекционного титра вирусов lgТЦИД$_{50}$/0.1 мл

Вирус	Контроль (без препаратов)	Рибавирин, мкг/мл			Озельтамивира карбоксилат, мкг/мл			Рибавирин/Озельтамивир, мкг/мл		
		1.25	2.5	5.0	1.0	2.0	4.0	1.25/0.5	2.5/1.0	5.0/2.0
H1N1/pdm	5.6	4.2	3.6	2.9	3.9	3.2	2.5	2.8	2.2	1.2
H5N1/Duck/Novosibirsk/56/05	7.2	6.4	5.2	4.6	4.9	3.6	2.9	3.0	2.6	1.5
H3N2/Aichi/68	6.8	5.2	4.7	4.0	4.1	3.2	2.8	2.2	1.4	0

Примечание. Результаты учтены через 72 ч после инфицирования культуральных клеток.

Таблица 2. Влияние рибавирина, озельтамивира карбоксилата и их комбинации на способность предотвращать развитие вирусиндуцированного ЦПД в культуре клеток MDCK

Вирус	Контроль (без препаратов)	Рибавирин, мкг/мл			Озельтамивира карбоксилат, мкг/мл			Рибавирин/Озельтамивир, мкг/мл		
		2.5	5.0	10.0	1.25	2.5	5.0	1.25/1.25	2.5/1.25	5.0/1.25
H1N1/pdm	+	+	–	–	+	–	–	–	–	–
H5N1/Duck/Novosibirsk/56/05	+	+	–	–	+	–	–	–	–	–
H3N2/Aichi/68	+	+	–	–	+	–	–	–	–	–

Примечание: “+” наличие ЦПД, “–” отсутствие ЦПД.

Наши результаты подтверждаются данными, приведенными в табл. 4: максимально выраженное снижение титра вируса в легких мышей Balb/C, зараженных гриппом (H3N2)Aichi/68, наблюдается именно в группе животных, получавших и рибавирин, и озельтамивир. Эффективность использования комбинации препаратов подтверждается также и данными, приведенными в табл. 5, когда определяли количество лейкоцитов в легких мышей Balb/c. Преимущество использования комбинации двух препаратов было показано также при определении вирусспецифических гемагглютининов (данные не приводятся).

Таким образом, наибольший противогриппозный эффект наблюдается во всех проведенных нами экспериментах при использовании комбинации рибавирина и озельтамивира карбоксилата, по сравнению с каждым из них, взятым в отдельности.

Американские вирусологи показали, что тройная комбинация амантадина, рибавивирина и озельтамивира приводит к глубокому антигриппозному действию (эффект синергидного характера) [2, 3]. Необходимо, однако, учитывать, что в настоящее время среди циркулирующих вирусов гриппа почти 80% составляют варианты вируса гриппа А, которые частично (A/H3N2, H1N1, в том числе пандемический) или полностью (A/H5N1) резистентны к ремантадину и амантадину. Следовательно, в современных условиях можно ограничиться применением комбинации двух препаратов: рибавирина и озельтамивира, исключив амантадин и ремантадин. Такая схема, предложенная нами, может иметь выраженную практическую направленность в случае угрозы пандемий.

Преимущество использования комбинации этих двух препаратов выявляется и при экспериментальной гриппозной инфекции белых мышей Balb/C, зараженных гриппом A H3N2/Aichi/68.

По нашему мнению, полученные результаты могут иметь практическую направленность в случае поражения людей вирусами гриппа типа А животного происхождения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали DOWEX 50WX8 (H^+-форма), гуанозин, KH_2PO_4 и Na_2HAsO_4 (Sigma-Aldrich) без дополнительной очистки. ТСА был синтезирован ранее по стандартной методике [19].

Пуриннуклеозидфосфорилаза (концентрация белка, определенная по методу Бредфорд – 15 мг/мл, активность 52 ед. акт./мг белка) была получена в группе рекомбинантных белков ИБХ РАН под руководством к.х.н. Есипова Р.С. [15, 16].

^{1}H-ЯМР-спектр (δ, м.д.; *J*, Гц) регистрировали в D_2O на приборе Bruker DPX-700 (ФРГ) с рабочей частотой 700 МГц (ИБХ РАН). Обозначения в ^{1}H-ЯМР-спектрах: с – синглет, д – дублет, т – триплет, уш. – уширенный.

Масс-спектры регистрировали на приборе Agilent 6224, ESI-TOF, LC/MS. УФ-спектры сни-

Таблица 3. Влияние рибавирина, озельтамивира карбоксилата и их комбинации на экспериментальную гриппозную A H3N2/Aichi/68 инфекцию мышей Balb/c

Доза препарата	Выжившие животные (из 20 зараженных)	Средняя продолжительность жизни (дни)
Контроль	0*	7.8 ± 0.5
Рибавирин 100 мг/кг 2 раза в день, 5 дней	9	11.5 ± 0.7
Озельтамивир 2.5 мг/кг 2 раза в день, 5 дней	11	12.6 ± 0.4
Рибавирин 100 мг/кг и озельтамивир 1.25 мг/кг, 2 раза в день, 5 дней	19	14.8 ± 0.8

Примечание. * В контрольной группе животных из 20 зараженных погибли все 20 животных.

Таблица 4. Влияние рибавирина, озельтамивира и их комбинации на титр вируса гриппа типа А в легких инфицированных мышей Balb/c

Контроль	Животные, получавшие рибавирин	Животные, получавшие озельтамивир	Животные, получавшие рибавирин + озельтамивир
4.7	3.6	3.0	2.3
5.2	3.2	2.7	1.6

Примечание. Приведены результаты трех независимых экспериментов. Результаты выражены в lg $ТЦИД_{50}$/0.1 мл. Зараженным вирусом животным вводили препараты по схеме, представленной в табл. 3. Первая строка цифр результаты на 8 день, вторая – на 12 день после инфицирования.

Таблица 5. Влияние рибавирина, озельтамивира и их комбинации на количество лейкоцитов в легких инфицированных гриппом A H3N2/Aichi/68 мышей Balb/C

Неинфицированные животные	Контрольная группа инфицированных животных	Животные, получавшие рибавирин	Животные, получавшие озельтамивир	Животные, получавшие рибавирин + озельтамивир
3	15	8	9	5
4	12	7	7	4

Примечание. Результаты выражены количество клеток/мышь ($\times 10^5$).

мали на спектрофотометре Shimadzu UV-160 (Япония).

За ходом ферментативных реакций следили с помощью ВЭЖХ (хроматограф Waters 2487, Breeze, США), колонка: Nova-Pak C18, 4 мкм, 4.6 × 150 мм. Элюент A: 0.1% TFA/вода, элюент B: 70% ацетонитрила в A. Скорость потока – 1 мл/мин, детектирование осуществляли при 215 и 254 нм. Градиент B в A: 0% B – 5 мин, 0–15% B – 10 мин.

1-β-D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид (рибавирин). Смесь 0.84 г (7 ммоль) 1,2,4-триазол-3-карбоксамида и 4.58 г (14 ммоль) гуанозина растворяли в 1 л 15 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7.0) и термостатировали в течение 120 ч при 60 ± 2°C в присутствии 3 мл ферментного препарата PNP (29 мг/мл, 30 ед. акт./мг белка или 373 ед. акт. на 1 ммоль 1,2,4-триазол-3-карбоксамида). Контроль полноты процесса осуществляли с помощью ВЭЖХ. Затем в реакционную смесь добавляли раствор 0.10 г (0.5 ммоль, 25 мл) Na_2HAsO_4 Продолжали термостатировать при 60 ± 2°C в течение 3 ч, пока содержание гуанозина по данным ВЭЖХ не снизится до 0.5%.

Реакционную смесь упаривали в вакууме примерно до 1/3 исходного объема, охлаждали до температуры +4°C. Выпавший в осадок гуанин отфильтровывали, маточник концентрировали в вакууме (5–7 мм. рт. ст.) до объема ~100 мл и пропускали через стеклянный фильтр с 20 г ионнообменной смолы DOWEX (H^+-форма). Смолу промывали дважды 30 мл дистиллированной воды. Объединенный фильтрат упаривали в вакууме (5–7 мм. рт. ст.) до объема ~20 мл, добавляли 50 мл этилового спирта, выдерживали при 20°C в течение 24 ч, выпавший в осадок рибавирин отфильтровывалит, промывали этиловым спиртом (2 × 10 мл), затем высушивали в эксикаторе до постоянного веса. Выход: 1.40 г (82%). Содержание основного вещества 99.8%, R_t = 2.42 мин (ВЭЖХ). Т. пл. 175–178 °C. λ_{max}, нм (ε, M^{-1} $см^{-1}$): 205.6 (11400); *m/z*: 245.0899 $[M + H]^+$ (расч. 245.0930), 267.0707 $[M + Na]^+$. ^{1}H-ЯМР: 8.80 (1H, уш. с, H5), 6.20 (1H, д, $J_{1',2'}$ 3.44, H1'), 4.71 (1H, дд, $J_{2',1'}$ 3.44, $J_{2',3'}$ 5.27, H2'), 4.55 (1H, дд, $J_{3',2'}$ 5.27, $J_{3',4'}$ 5.27, H3'), 4.28 (1H, тд, $J_{4',3'}$ 5.27, $J_{4',5a'}$ 3.21, $J_{4',5b'}$ 5.27, H4'), 3.93 (1H, дд, , $J_{5a',5b'}$ 12.6, $J_{5a',4'}$ 3.21, H5a'), 3.82 (1H, дд, $J_{5b',5a'}$ 12.6, $J_{5b',4'}$ 5.27, H5b').

Цитотоксическое и антивирусное действие изучаемых препаратов

В работе использовали карбоксилат озельтамивира, любезно предоставленный компанией "Hoffmann La Roche" (Basel, Швейцария).

В работе был использован вирус гриппа A H5N1/Duck/Novosibirsk/56/05, вирус гриппа A H1N1/pdm (пандемический) и вирус гриппа A H3N2/Aichi/68, полученные из Государственной коллекции вирусов, действующей на базе НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России.

Культура клеток Madin-Darby Canin Kidney (MDCK) была получена из коллекции культур клеток НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского Минздрава России. Клетки культивировали в 96-луночных пластиковых планшетах, вводя в каждую лунку клетки за 24 ч до их заражения вирусом. Клетки были инфицированы вирусом с множественностью 0.01 $ТЦИД_{50}$/0.1 мл. Рибавирин и озельтамивир вносились в лунки непосредственно после инфицирования клеток вирусом гриппа. Использовали питательную среду для вирусной репликации: минимальная эссенциальная среда Игла (Eegle minimal essential medium). Среда содержала 2.5 мкг/мл трипсин, обработанный N-тозил-*L*-фенилаланил-хлорметилкетоном (TPCK), 1 мкг/мл EDTA и 50 мкг/мл антибиотика гентамицин. Далее проводили в течение 72 ч инкубацию клеток при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO_2. Именно к этому сроку в контрольных лунках развивается 100% ЦПД. Культуральная жидкость в опытных и контрольных лунках отделялась и с ней проводились аналитические процедуры по определению стандартных параметров репродукции вируса гриппа A H5N1 (см. табл. 1, 2).

Предварительно определялась цитотоксичность соединений с помощью стандартного мето-

да окрашивания клеток MDCK красителем трипановым синим. За величину CD_{50} принимали концентрацию соединения, которая обеспечивала выживаемость 50% неинфицированных клеток в течение 72 ч в присутствии изучаемых соединений. После определения величины CD_{50} для каждого изучаемого соединения проводили, как описано выше, изучение антивирусного действия в нецитотоксичных для клеток концентрациях: 1/8, 1/16 CD_{50} и при более низких концентрациях.

Действие рибавирина и их комбинации на экспериментальную гриппозную инфекцию мышей Balb/C (вес 15–17 г)

Инфицирование мышей вирусом гриппа типа А H3N2/Aichi/68 проводили интраназально под эфирным наркозом $10LD_{50}$. Это обеспечивало 90–100% гибель животных (20 особей в каждой группе). Рибавирин вводили интраперитонеально через 2 ч после инфицирования животных и в течение 4 последующих дней однократно. Разовая доза – 100 мг/кг живого веса. Озельтамивир вводили перорально за 3 ч до инфицирования животных: разовая доза 2.5 мг/кг живого веса 2 раза в день в течение 5 дней. Общий срок наблюдения за животными 16 дней, начиная с первого дня инфицирования.

Титр вируса гриппа А в легких мышей и количество лейкоцитов в легких определяли на 8-й по стандартным методикам [20].

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность Есипову Р.С. и Муравьевой Т.И. за любезно предоставленные препараты пуриннуклеозидфосфорилазы.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных исследований (проекты 07-04-13573-офи_ц и 10-04-01020-а), ФЦП “Национальная технологическая база” на 2007–2012 гг. (госконтракт № ГП/07/439/НТБ/К от 23 июля 2007 г.) и ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг. (проект П1085 от 31.05.2010).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hayden F.G., Slepushkin A.N., Pushkarskaya N.L.* // J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1984. V. 25. № 1. P. 53–57.
2. *Govorkova E.A., Fang H.B., Tan M., Webster R.G.* // J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004. V. 48. № 7. P. 4855–4863.
3. *Smee D.F., Hurst B.L., Wong M.-H., Bailey K.W. Morrey J.D.* // J. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009. V. 53. № 5. P. 2120–2128.
4. *Kwong A.D., Kauffman R.S., Hurter P., Mueller P.* // Nature Biotechnology. 2011. V. 29. P. 993–1003.
5. *Galegov G.A., Pushkarskaya N.L., Obrosova-Serova N.P., Zhdanov V.M.* // Experiencia. 1977. V. 33. P. 905–906.
6. *Hézode C., Forestier N., Dusheiko G., Ferenci P., Pol S., Goeser T., Bronowicki J.-P., Bourlière M., Gharakhanian S., Bengtsson L., McNair L., Kieffer Sh., Kwong A., Kauffman R. S., Alam J., Pawlotsky J.-M., Zeuzem S.* // New Engl. J. Med. 2009. V. 360. P. 1839–1850.
7. *Ling L.M.,Chow A.L., Lye D.C., Tan A.S., Krishnan P., Cui L., Win N.N., Chan M., Lim P.L., Lee C.C., Leo Y.S.* // Clin. Infect. Dis. 2010. V. 50. P. 963–969.
8. *Константинова И.Д., Есипов Р.С., Муравьева Т.И., Таран С.А., Веревкина К.Н., Гуревич А.И., Феофанов С.А., Мирошников А.И.* Способ получения 1-β-*D*-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамида (рибавирина). Патент РФ № 2230118 от 10.07.2004 г.; С2, МПК[7] кл. С12 Р17/16, опубл. 10.06.2004.
9. *Hennen W.J., Wong C.-H.* // J. Org. Chem. 1989. V. 54. P. 4692–4695.
10. *Константинова И.Д., Чудинов М.В., Фатеев И.В., Матвеев А.В., Журило Н.И., Швец В.И., Мирошников А.И.* // Биоорган. химия. 2013. Т. 39. № 1. С. 61–80. [*Konstantinova I.D., Chudinov M.V., Fateev I.V., Matveev A.V., Zhurilo N.I., Shvets V.I., Miroshnikov A.I.* // Russ. J. Bioorgan. Chem. 2013. V. 39. P. 52–70].
11. *Михайлопуло И.А., Мирошников А.И.* // Acta Naturae. 2010. V. 2. P. 38–61.
12. *Bzowska A., Kulikowska E., Shugar D.* // Pharmacology, Therapeutics. 2000. V. 88. P. 349–425.
13. *Mikhailopulo I.A.* // Current Org. Chem. 2007. V. 11. P. 317–335.
14. *Константинова И.Д., Фатеев И.В., Музыка И.С., Галкина И.В., Бутенко А.М., Галегов Г.А., Белов А.В., Ларичев В.Ф., Дерябин П.Г., Швец В.И., Львов Д.К., Мирошников А.И.* // Биотехнология. 2008. № 4. С. 69–79.
15. *Есипов Р.С., Гуревич А.И., Мирошников А.И., Чувиковский Д.В.* Способ получения рекомбинантной пуриннуклеозид- фосфорилазы, рекомбинантная плазмидная ДНК pERPUPHHOI и штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)/pERPUPHHOI для его осуществления. Пат. 2179188 РФ, МПК С12 Р17/16. № 2000105214; заявлено 03.03.2000; опубл. 10.02.2002, Бюл. № 4. – 12 с.
16. *Esipov R.S., Gurevich A.I., Chuvikovsky D.V., Chupova L.A., Muravyova T.I., Miroshnikov A.I.* // Protein Expes. Purif. 2002. V. 24. P. 56–60.
17. *Kline P.C., Schramm V.L.* // Biochemistry. 1993. V. 32. P. 13212–13219.
18. *Schramm V.L.* // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 28297–28300.
19. *Chipen G.I., Grinshtein V.Ya.* // *Chem. Heterocycil. Compounds*. 1965. T. 1. P. 420.
20. *Knight V., Wilson S.Z., Wide P.R.* Ribavirin a broad spectrum antiviral agent. Ed. R.A. Smit. Academ Press. 1981. P. 129–146.

The Arsenolysis Reaction in the Biotechnological Method of Synthesis of the Ribavirin. Inhibition of Reproduction of Influenza A Virus with the Combination of Ribavirin and Ozeltamivir in Experiments *in vitro* and *in vivo*

I. D. Konstantinova[a, #], I. V. Fateev[a], G. A. Galegov[b], P. G. Deryabin[b], A. G. Botikov[b], I. S. Muzyka[a], D. K. L'vov[b], A. I. Miroshnikov[a]

[#] Phone: +7 (495) 330-72-47; fax: +7 (495) 330-73-29; e-mail: kid1968@yandex.ru

[a] Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

[b] Ivanovsky Institute of Virology, Moscow, Russia

Abstract—Improved biotechnological method of receiving the antiviral drug ribavirin by the reaction of transglycosilation by addition of catalytic amounts of sodium arsenate in the reaction mixture. Such approach allows to hydrolyze the amount of the excess natural nucleoside donor – ribose and, as a consequence, to simplify the composition of the reaction mixture and the process of separation of ribavirin. The effect of ribavirin and ozeltamivir carboxylate and their combination on the reproduction of the virus of the influenza A in cell culture and in experiments on laboratory animals (mouse Balb/C). The greatest anti-influenza effect is observed when using a combination of drugs, as compared to each of them taken separately.

Keywords: nucleoside phosphorylases from E. coli, Ribavirin, transglycosylation, 1-H-1,2,4-triazole-3-carboxamide, Ozeltamivir, influenza A