

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

АКТИВНОСТЬ *IN VITRO* И ФАРМАКОКИНЕТИКА ИНГИБИТОРА РАННЕЙ СТАДИИ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ HCV (AVR-560)

А. В. Иващенко^{1, 2}, П. М. Яманушкин¹, О. Д. Митькин¹, Е. В. Ежова¹, О. М. Корзинов^{1, 3},
Е. А. Буланова¹, А. Г. Корякова¹, П. В. Вышемирская¹, В. В. Бычко², А. А. Иващенко^{1, 3}

Показано, что человеческая сыворотка практически не влияет на противовирусную активность AVR560 *in vitro* по отношению к HCV. Проведено иммуногистохимическое исследование AVR560 на модели клеточной линии гепатомы человека (Huh7), зараженной HCV (штамм JFH-1), и показано, что он блокирует раннюю стадию вирусной инфекции, а также подавляет ее распространение. Установлено, что AVR560 является специфическим ингибитором HCV и не активен по отношению к другим флавивирусам, таким как вирусы Западного Нила (штамм NY99), желтой лихорадки (штамм 17D) и Денге, тип 2 (New Guinea). Показано, что AVR560 не проявляет ингибирующей активности по отношению к изоферментам CYP3A4, CYP1A2, CYP2C19 и CYP2D6с цитохрома P450 человека. Изучена фармакокинетика AVR560 на грызунах и собаках при пероральном и внутривенном введении, определены основные фармакокинетические параметры и биодоступность.

Ключевые слова: [1-(1-метил-1*H*-индол-2-илметил)пиперидин-4-ил]-(4-пропилпиперазин-1-ил)кетон; 2-(8-изопропил-2,3,3а,4,5,6-гексагидро-3*H*-пиразино[3,2,1-*jk*]карбазол-3-ил)-ацетамид; {1-[1-(2-метилбензил)-1*H*-индол-2-илметил]пиперидин-4-ил}-(4-пропилпиперазин-1-ил)кетон, AVR560; AVR561; AVR562; ингибитор HCV; РНК-содержащий вирус; цитохром P450; фармакокинетика; биодоступность.

ВВЕДЕНИЕ

Гепатит С — воспалительное заболевание печени, вызванное вирусом гепатита С (HCV). Гепатит С может протекать как в острой форме, так и в хронической. Из-за особенностей вируса, “скрывающегося” от иммунной системы, острый гепатит в подавляющем большинстве случаев переходит в хроническую форму. У 20 – 30 % больных хроническим гепатитом С развивается цирроз печени, а у 3 – 8 % — гепатоцеллюлярная карцинома. В настоящее время в мире насчитывается приблизительно 130 – 170 миллионов человек с хроническим вирусным гепатитом С. Ежегодно от данного заболевания погибают более 350 тысяч человек [<http://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/>].

В настоящее время стандартом лечения гепатита С является комбинированная противовирусная терапия препаратами пегилированного интерферона альфа и рибавирина. В целом эффективность терапии не превышает 50 – 80 %. Таким образом, потребность в по-

иске новых эффективных средств для лечения вирусного гепатита С остается актуальной.

Недавно в результате исследования противовирусной активности гетероциклических соединений, включающих фрагмент 1*H*-индол-2-ил-, 1*H*-бензимидазол-2-ил-, бензофуран-2-ил- и бензоксазол-2-илметиламинов мы обнаружили перспективные ингибиторы HCV (рис. 1): дигидрохлорид [1-(1-метил-1*H*-индол-2-илметил)пиперидин-4-ил]-(4-пропилпиперазин-1-ил)кетона (AVR560), гидрохлорид 2-(8-изопропил-2,3,3а,4,5,6-гексагидро-3*H*-пиразино[3,2,1-*jk*]карбазол-3-ил)ацетамида (AVR561) и дигидрохлорид {1-[1-(2-метилбензил)-1*H*-индол-2-илметил]пиперидин-4-ил}-(4-пропилпиперазин-1-ил)кетона (AVR562) [1, 5]. В настоящей работе представлены результаты доклинического исследования наиболее активного из них — AVR560.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ингибиторы HCV AVR560, AVR561 и AVR562 представляют собой белые или белые со слегка желтоватым оттенком мелкокристаллические вещества, растворимые в воде, спирте, диметилформамиде, устойчивые при стандартных условиях хранения.

Эксперименты проводили в соответствии с методическими указаниями “Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ” [3].

¹ Исследовательский институт химического разнообразия (ИИХР), 114401 Химки, Московской обл., Россия, e-mail: ypm@iibr.ru.

² AllaChem LLC, Hallandale Beach, Fl 33009 USA, 1835 E. Hallandale Beach Blvd, #442, e-mail: av@asavillc.com.

³ Московский физико-технический институт (МФТИ), 141700 Долгопрудный, Московской обл., Россия, e-mail: okr@pharmcluster.ru.

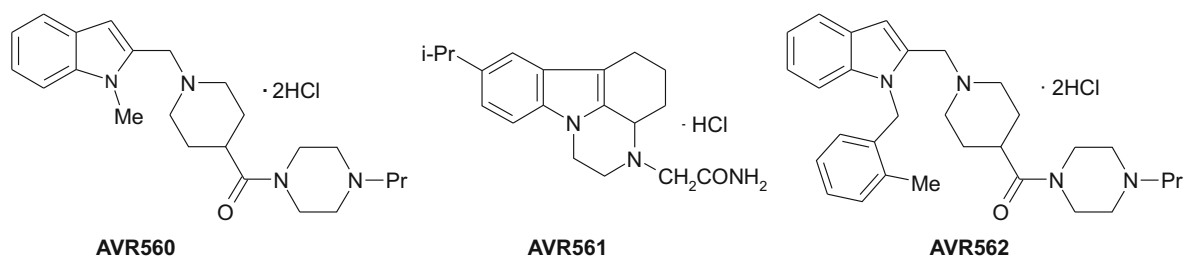


Рис. 1. Ингибиторы вируса гепатита С.

Мыши линии BALB/C, 26 самцов массой 25 – 30 г, и крысы линии Sprague Dawley, 12 самцов массой около 400 г (питомник “Андреевка” РАМН), содержались в группах по 10 – 12 животных при 12-часовом световом режиме и температуре 22 – 24 °С на стандартном брикетированном корме, при свободном доступе к воде и пище.

Собаки породы английский бигль, 2 самца, 2 самки, 3 – 6 лет и массой 10 – 14 кг (питомник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН), в течение последнего месяца перед исследованием не использовались в других экспериментах. Все животные были здоровы и содержались в огороженных отсеках (по одному в отсеке), при температуре воздуха 20 – 22 °С и относительной влажности 60 – 65 % в условиях принудительной вентиляции и приглушенного естественного освещения. Для кормления использовали стандартный промышленный сертифицированный брикетированный корм, кормление проводили в одно и то же время один раз в день. Воду давали в избытке. Пища и вода не содержали посторонних примесей, которые могли бы повлиять на результаты исследования.

Противовирусная активность AVR560, AVR561 и AVR562 в отношении HCV в присутствии человеческой сыворотки крови NHS была исследована на

Таблица 1. Влияние человеческой сыворотки крови на противовирусную активность AVR560, AVR561 и AVR562 в отношении HCV (штамм JFH-1) *in vitro*

| Сыворотка | EC _{50+сыворотка} /EC ₅₀ | | |
|-------------------------|--|--------|--------|
| | AVR560 | AVR561 | AVR562 |
| 10 % фетальной телячьей | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 10 % человеческой | 1,0 | 4,7 | 2,9 |
| 20 % человеческой | 3,2 | 8,6 | 5,1 |
| 30 % человеческой | 3,8 | 20,6 | 42,8 |

Таблица 2. Противовирусная активность (EC₅₀, μM), цитотоксичность (CC₅₀, μM) и терапевтический индекс (TI₅₀) AVR560 в тесте *in vitro* на ингибирование вирусной цитопатичности

| Соединение | Вирус Западного Нила (штамм NY99) | | | Вирус желтой лихорадки (штамм 17D) | | | Вирус Денге, тип 2 (New Guinea) | | |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------|------------------|------------------------------------|-----------------------|------------------|---------------------------------|-----------------------|------------------|
| | EC ₅₀ , μM | CC ₅₀ , μM | TI ₅₀ | EC ₅₀ , μM | CC ₅₀ , μM | TI ₅₀ | EC ₅₀ , μM | CC ₅₀ , μM | TI ₅₀ |
| AVR-560 | > 30 | > 30 | ... | > 30 | > 30 | ... | > 30 | > 30 | ... |
| Infergen™ с IFN-α, нг/мл | 0,016 | > 10 | > 625 | 0,09 | > 10 | > 111 | 0,011 | > 10 | > 910 |

базе ИИХР с помощью ИФА на модели клеточной линии гепатомы человека (Huh7), зараженной HCV *in vitro*. При повышении содержания человеческой сыворотки крови до 40 %, измерение противовирусной активности соединений становится невозможным, вследствие низкой эффективности заражения. Эффект человеческой сыворотки крови на противовирусную активность соединений выражался как изменение значения EC₅₀ в присутствии сыворотки по отношению к таковому без сыворотки (EC_{50+сыворотка}/EC₅₀). HCV получены от Университета штата Юта, Logan, Юта, США. Человеческая сыворотка крови NHS получена из BioWhittaker, каталожный номер 14 – 402E, а клеточная линия Huh7 получена из American Type Culture Collection (ATCC), Манассас, Виржиния (США).

Определение стадии вирусной инфекции, чувствительной к AVR-560 проводили на базе AllaChem LLC по аналогии с [2] на модели клеточной линии гепатомы человека (Huh7), зараженной HCV (штамм JFH-1), которая получена от Dr. Christoph Seeger, Fox Chase Cancer Center, Филадельфия, Пенсильвания, США.

Противовирусная активность AVR-560 в отношении панели РНК-содержащих вирусов была определена на базе ИИХР на основе ингибирования цитопатических эффектов вирусов по аналогии с [2]. Цитотоксичность AVR-560 определяли параллельно на линии клеток Vero-76, которая была получена из American Type Culture Collection (ATCC), Манассас, Виржиния (США), а РНК-содержащие вирусы Западного Нила (штамм NY99), желтой лихорадки (штамм 17D) и Денге, тип 2 (New Guinea) были получены от Университета штата Юта, Logan, Юта, США.

Ингибирование AVR560 активности изоферментов цитохрома P450 человека было изучено на базе ИИХР на панели цитохромов CYP3A4, CYP1A2, CYP2C19 и CYP2D6 (Invitrogen Vivid® CYP450

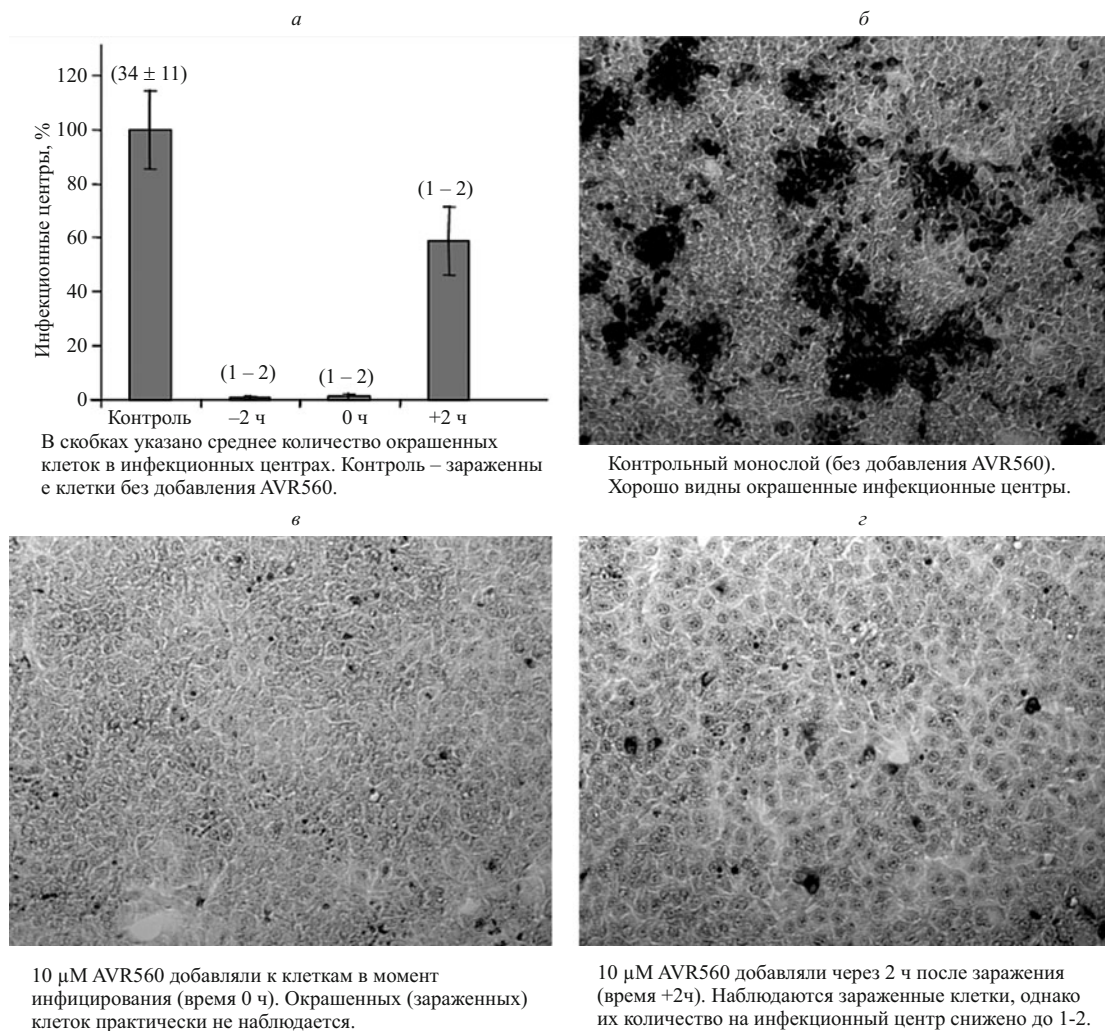


Рис. 2. Влияние момента добавления AVR560 (10 μM) на заражение клеток линии Huh7 HCV (*a*) и иммуногистохимическое окрашивание клеток линии Huh7, зараженных HCV фотографии монослоев клеток (*б*, *в* и *г*).

Таблица 3. Основные фармакокинетические параметры AVR-560 после однократного перорального и внутривенного введения

| Параметр * | Доза, мг/кг | | | | | |
|--------------------------------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | 10 | | 2 | | 10 | |
| | Мыши | | Крысы | | Собаки | |
| | внутривенно | перорально | внутривенно | перорально | внутривенно | перорально |
| K_{el} , 1/ч | 0,0882 | н/о | 0,045 | 0,04 | 0,50 | 0,11 |
| $T_{1/2}$, ч | 7,9 | н/о | 15,5 | 15,5 | 1,39 | 6,7 |
| T_{max} , ч | 0,083 | 1 | 0,083 | 4 | 0,02 | 2,00 |
| C_0 , нг/мл | 1300 | * | 112,2 | * | 3482 | * |
| C_{max} , н/д | 799 | 70 | 86,0 | 31,5 | 2527 | 172 |
| $AUC_{(0 \rightarrow t)}$, нг·ч/мл | 515 | 173 | 213 | 432 | 286 | 918 |
| $AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$, н/д | 1286 | н/о | 307 | 654 | 330 | 1821 |
| MRT_{last} , ч | 1,1 | 1,9 | 7,6 | 9,3 | 0,33 | 4 |
| MRT_{linf} , ч | 9,7 | н/о | 19,4 | 21,9 | 0,94 | 11 |
| Cl , мл·ч/кг | 7777 | * | 6519 | * | 7650 | * |
| V_d , мл/кг | 88197 | * | 146125 | * | 15457 | * |
| V_{ss} , мл/кг | 75122 | * | 126474 | * | 8682 | * |
| Биодоступность, % | * | 33,5 | * | 40 | * | 64 |

* При данном пути введения параметр не определяют.

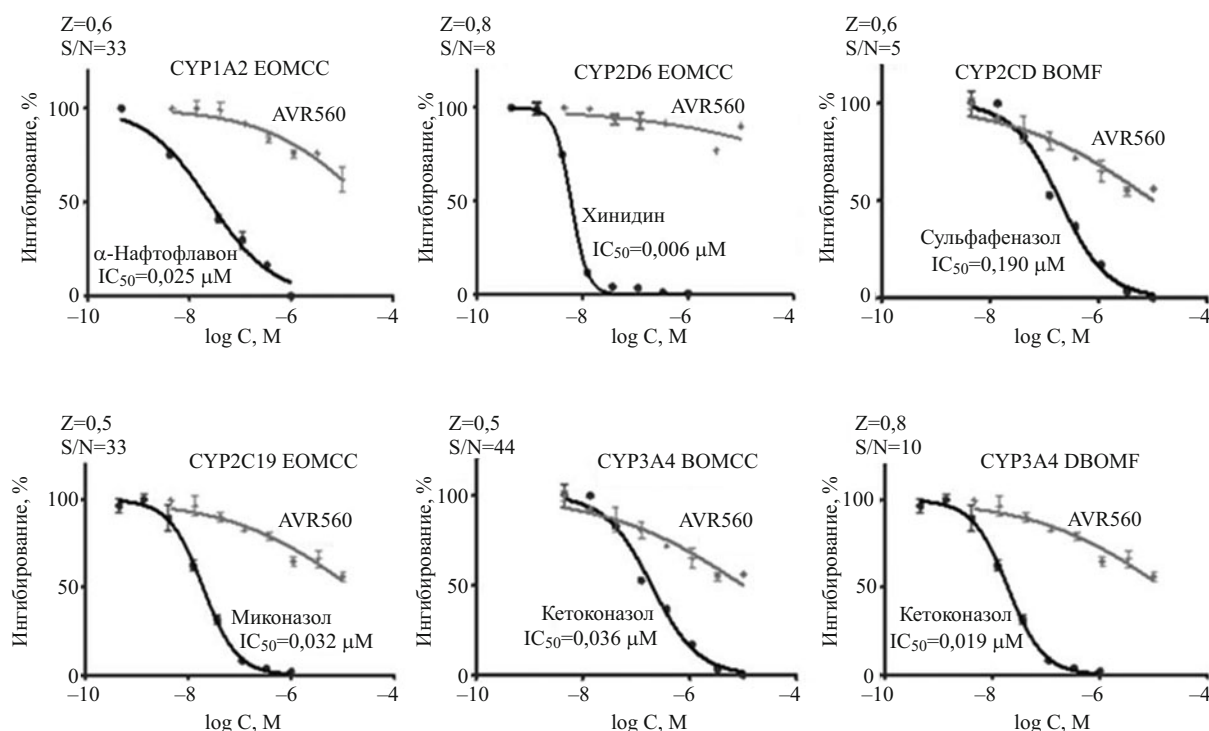


Рис. 3. Кривые ингибирующей активности AVR560 и контрольных веществ по отношению к различным изоферментам цитохрома P450 (1 % ДМСО).

Screening Kits, Cat. no. P2860, P2858, P2857, P2863, P2864, P2972) в 1 % растворе DMSO. Ингибирующие свойства AVR560 в концентрациях 10, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,03, 0,01 и 0,003 мкМ исследованы в 2 повторах с использованием протоколов, прилагаемых к наборам реагентов. Значение EC_{50} рассчитано с помощью программы Graph Pad Prism 5.

Фармакокинетику на мышах изучали на базе ИИХР на 36 животных — по 18 на внутривенное и пероральное введение, по 3 мыши на каждую временную точку. Фармакокинетику AVR-560 изучали после перорального и внутривенного введения в дозе 10 мг/кг. Отбор и исследование образцов крови проводили по аналогии с [2].

Фармакокинетику на крысах изучали на базе ИИХР на 12 грызунах, которые были разделены на 2 опытные группы по 6 крыс в каждой. В первой группе AVR560 вводили внутривенно при помощи зонда в дозе 10 мг/кг в виде раствора в 0,5 % Tween-80 с концентрацией целевого вещества 1 мг/мл. Животным второй группы препарат вводили внутривенно (в хвостовую вену) в дозе 2 мг/кг в виде раствора в 20 % HP- β -CD (гидроксипропил-бета-циклодекстран) с концентрацией целевого вещества 0,4 мг/мл. Отбор и исследование образцов крови проводили по аналогии с [2].

Фармакокинетику на собаках изучали на базе ОАО «ВНЦ БАВ» на 4 особях, которые были разделены на 2 опытные группы, по 2 собаки в каждой. Первой подопытной группе собак AVR560 вводили однократно в дозе 2 мг/кг внутривенно с последующим за-

бором венозной крови через 1, 5, 15, 30, 60 и 120 мин после введения AVR560. Второй подопытной группе собак AVR560 вводили перорально однократно в дозе 10 мг/кг с последующим забором венозной крови через 15, 30, 60, 120, 240 и 480 мин после введения AVR560. Рабочий раствор AVR560 для перорального и внутривенного введения готовили путем растворения навески AVR560 в стерильном физиологическом растворе с добавлением 0,5 % Tween-80.

Фармакокинетический анализ проводили на базе ИИХР и МФТИ по экспериментально полученным данным «концентрация — время». Концентрацию AVR560 в образцах плазмы животных измеряли с помощью ВЭЖХ-МС/МС метода с использованием систем тройных квадрупольных масс-спектрометров в сочетании с ВЭЖХ: QTRAP 5500 (ABSciex) с хроматографом Agilent 1290 (Agilent Technologies) и LCMS-8030 (Shimadzu) с ВЭЖХ системой.

Расчет основных фармакокинетических параметров (K_{el} , $T_{1/2}$, T_{max} , C_0 , C_{max} , $AUC_{(0 \rightarrow t)}$, $AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$, MRT_{last} , MRT_{inf} , Cl , V_d , V_{ss} и биодоступность) выполняли модельно-независимым способом с помощью программы PhoenixTM WinNonlin[®] 6.3 (Pharsight Corp.).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование активности ингибиторов AVR560, AVR561 и AVR562 в отношении HCV на модели клеточной линии гепатомы человека (Huh7), зараженной HCV, в присутствии возрастающих концентраций человеческой сыворотки вплоть до 30% показало, что

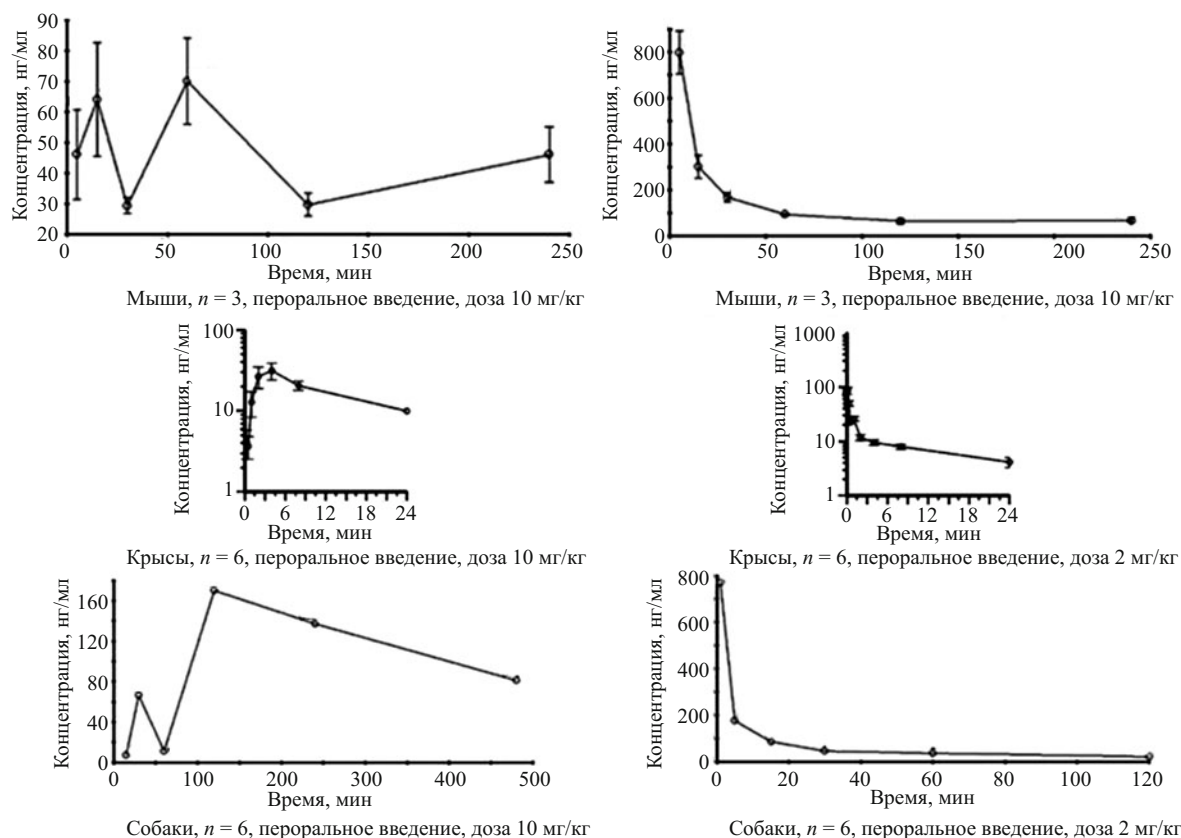


Рис. 4. Фармакокинетические кривые усредненных концентраций AVR560 в плазме крови животных. Концентрацию вещества определяли с помощью ВЭЖХ-МС/МС системы QTRAP 5500 (ABSciex) с хроматографом Agilent 1290 (Agilent Technologies).

последняя оказывает очень умеренный ингибирующий эффект на противовирусную активность AVR560 (табл. 1). Активность AVR560 снижается в присутствии 30 % сыворотки в 3,8 раза. В то же время ингибирующий эффект 30 % сыворотки оказался гораздо более выраженным в случае веществ AVR561 и AVR562. Активность этих ингибиторов HCV снижается в 20,6 и 42,8 раза соответственно.

На основании полученных результатов можно предположить, что противовирусная активность вещества AVR560 в клинических испытаниях не будет существенно снижена из-за его связывания белками плазмы крови. По результатам данных экспериментов вещество AVR560 было выбрано для дальнейших исследований.

Изучение влияния AVR560 на заражение клеток Huh7 HCV (штамм JFH-1) показало, что это вещество блокирует одну из ранних стадий вирусной инфекции (проникновение вируса в клетку, инициацию трансляции вирусных белков или инициацию синтеза вирусной РНК). Действительно, по данным иммуногистохимического анализа (рис. 2), при добавлении к клеткам AVR560 за 2 ч до инфицирования (-2 ч) или в момент инфицирования (0 ч), репликация вируса подавляется практически полностью, в то время как при добавлении к клеткам AVR560 через 2 ч после инфицирования ($+2$ ч) наблюдается заметное падение антивирусной активности. Следует отметить, что число зараженных

клеток в этом случае почти в 2 раза меньше, чем число зараженных клеток в эксперименте без добавления AVR560. Зараженные клетки хорошо видны на фотографиях монослоев клеток (рис. 2, б – г).

Следует отметить, что AVR560 подавляет распространение инфекции HCV в культуре клеток (рис. 2, б – г). Данное свойство AVR560 является принципиально важным, т.к. распространение вирусной инфекции от зараженных гепатоцитов к незараженным клеткам играет очень большую роль в поддержании хронической инфекции HCV в печени [4].

Исследование AVR-560 в отношении нескольких флавивирусов, таксономически близких HCV (вирусы Западного Нила, желтой лихорадки и Денге), показало (табл. 2) отсутствие заметной активности AVR-560, в то время как интерферон- α (IFN- α), использовавшийся в качестве стандартного ингибитора проявил ожидаемую активность против всех 3 вирусов. Это свидетельствует о селективности AVR-560 в отношении HCV.

Взаимодействие препарата AVR560 с различными изоферментами цитохрома P450 человека показало (рис. 3), что вплоть до концентрации до 10 мкМ он не проявляет ингибирующую активность по отношению к изоферментам CYP3A4, CYP1A2, CYP2C19 и CYP2D6, в то время как контрольные вещества показали ожидаемую активность.

Изучение фармакокинетики на грызунах и собаках при пероральном и внутривенном введении AVR-560 позволило определить основные фармакокинетические параметры вещества (табл. 3), рассчитанные на основании экспериментально полученных данных “концентрация — время” (рис. 4). Биодоступность AVR-560 у грызунов и собак была рассчитана как отношение значения $AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$, полученного при пероральном введении, к значению $AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$, полученного при внутривенном введении с учетом дозы препарата, и составила 34 % у мышей, 43 % у крыс и 64 % у собак.

Следует отметить достаточно быстрое всасывание AVR-560 в кровь животных (мыши — 1 ч, крысы — 4 ч, собаки — 2 ч) и достаточно длительный период его полувыведения при пероральном введении (крысы — 15,5 ч, собаки — 6,7 ч).

ВЫВОД

Исследование активности AV560, AV561 и AV562 в присутствии сыворотки крови человека позволило установить, что наиболее эффективным из них является ингибитор HCV AV560. Последний по данным иммуногистохимического исследования на модели клеточной линии гепатомы человека (Huh7), зараженной HCV (штамм JFH-1), блокирует раннюю стадию вирусной инфекции, а также подавляет ее распространение. Показано, что AVR560 не активен по отношению

к РНК близким HCV флавивирусам, таким как вирусы Западного Нила (штамм NY99), желтой лихорадки (штамм 17D) и Денге, тип 2 (New Guinea), и не проявляет ингибирующую активность по отношению к изоферментам CYP3A4, CYP1A2, CYP2C19 и CYP2D6с цитохрома P450 человека. Изучение фармакокинетики AVR560 на грызунах и собаках показало, что он может эффективно использоваться перорально, так как отличается высокой биодоступностью, быстрым всасыванием в кровь и достаточно длительным периодом полувыведения.

Авторы выражают благодарность генеральному директору ОАО “ВНЦ БАВ” д.б.н., профессору Митрохину Н. М. за помощь в проведении исследований фармакокинетики на собаках.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Ивашенко, В. В. Бычко, О. Д. Митькин, Патент России 2436786, *Бюл. изобрет.*, № 35 (2011).
2. А. В. Ивашенко, П. М. Яманушкин, О. Д. Митькин и др., *Эксперим. клин. фармакол.*, 77(4), 33 – 41 (2014)
3. Р. У. Хабриев, *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, ЗАО “ИИА “Ремедиум”, Москва (2005), сс. 47 – 60.
4. S. W. Chan, *World J. Gastroenterol.*, 20(11), 2785 – 2800 (2014).
5. А. V. Ivachtchenko, V. V. Bichko, O. D. Mitkin, Международная заявка PCT / RU2011 / 000533, WO 2012 / 011847 (2012).

Поступила 24.03.14

ANTIVIRAL ACTIVITY *IN VITRO* AND PHARMACOKINETICS OF HCV ENTRY INHIBITOR AVR560

A. V. Ivashchenko^{1,2,3}, P. M. Yamanushkin¹, O. D. Mit'kin¹, E. V. Ezhova¹, O. M. Korzinov^{1,3},
E. A. Bulanova¹, A. G. Koryakova¹, P. V. Vishemirskaya¹, V. V. Bychko³, and A. A. Ivashchenko^{1,3}

¹ Chemical Diversity Research Institute, ul. Rabochaya 2-a, Khimki, Moscow oblast, 141401 Russia;

² AllaChem LLC, 1835 E. Hallandale Beach Blvd. #442, Hallandale Beach, FL 33009, United States;

³ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow Region, 141700, Russia;

* e-mail: ypm@ihr.ru

Several novel compounds were found to be potent inhibitors of the HCV (JFH-1 isolate) infection *in vitro*. Human serum did not significantly reduce antiviral activity of the lead compound, AVR560 (< 4-fold). The immunohistochemistry studies with the Huh7 cell line, infectable with the HCV (JFH-1 strain), demonstrated that AVR560 inhibited the early steps of viral infection and blocked the spread of the HCV infection in tissue culture. The cytotoxicity in Huh7 and Vero-76 cell lines was mild. AVR560 proved to be a specific HCV inhibitor and exhibited no activity against other flaviviruses such as yellow fever (strain 17D), West Nile (strain NY99), and dengue (New Guinea type 2) in *in vitro* infection experiments. AVR560 also did not inhibit any of the tested human CYP450 isozymes (3A4, 1A2, 2C19 and 2D6). In the pharmacokinetic studies in mice, rats and dogs, favorable pharmacokinetic profiles and good oral bioavailability were observed for AV560. Further pre-clinical studies with this novel HCV inhibitor are in progress.

Keywords: [1-(1-methyl-1H-indole-2-ylmethyl)piperidin-4-yl]-(4-propylpiperazin-1-yl)ketone; 2-(8-isopropyl-2,3,3a,4,5,6-hexahydro-3H-pyrazino[3,2,1-jk]-carbazol-3-yl)-acetamide; {1-[1-(2-methylbenzyl)-1H-indol-2-ylmethyl]piperidin-4-yl}-(4-ppropylpiperazin-1-yl)ketone; AVR560; AVR561; AVR562; HCV inhibitor; RNA-containing virus; cytochrome P450; pharmacokinetics, bioavailability