

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ AV0012 — ИНГИБИТОРА РАННЕЙ СТАДИИ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ГЕПАТИТА С. I. *In vitro* ADME И ФАРМАКОКИНЕТИКА

А. В. Иващенко^{1–3}, П. М. Яманушкин¹, О. Д. Митькин¹, Е. В. Ежова¹,
О. М. Корзинов^{1, 4}, Н. А. Шевкун¹, А. Г. Корякова¹, Р. Н. Карапетян¹, В. В. Бычко³,
А. А. Иващенко^{1, 4}, В. З. Агрба⁵, Б. А. Лапин⁵, С. В. Орлов⁵

На основании иммуногистохимических исследований на модели клеточной линии гепатомы человека (Huh7), зараженной HCV (штамм JFH-1) показано, что AV0012 относится к новому классу ингибиторов HCV, блокирующих ранние стадии вирусной инфекции и подавляющих ее распространение как посредством вирусной секреции, так и через тесный клеточный контакт. Установлено, что AV0012 является специфическим ингибитором HCV и не активен по отношению к РНК-содержащим вирусам, таким как бычья диарея (BVDV), венесуэльский лошадиный энцефалит (штамм TC-83), денге тип 2 (New Guinea), желтая лихорадка (штамм 17D), лихорадка западного Нила параинфлуэнца-3, RSV (штамм A2) и Риновирус (тип 2, штамм HGP). Показано, что человеческая плазма практически не влияет на противовирусную активность AV0012 *in vitro*. Исследования противовирусной активности AV0012 в комбинации с интерфероном альфа 2а показали аддитивное действие комбинации ингибиторов, что свидетельствует о возможности применения AV0012 совместно с интерфероном альфа в клинических испытаниях. Показано, что AV0012 имеет высокую растворимость и стабильность в водных растворах и в плазме крови мышей, ограниченную метаболическую стабильность, низкое связывание с белками плазмы крови человека, высокую проницаемость через биологические мембраны и взаимодействует только с изоферментами 2D6 и 3A4 цитохрома P-450 человека. AV0012 быстро всасывается в кровь животных, имеет достаточно высокое время полужизни в плазме крови и высокую биодоступность, достигающую 92 % в случае обезьян.

Ключевые слова: этиловый эфир 2,4-бис(диметиламинометил)-1-метил-6-пиридин-3-ил-1H-индол-3-карбоновой кислоты; ингибитор HCV; РНК-содержащие вирусы; ADME-свойства; растворимость; стабильность; Caco-2; цитохром P-450; фармакокинетика; биодоступность

ВВЕДЕНИЕ

Гепатит С — болезнь печени, вызываемая вирусом гепатита С (HCV). До 500 млн человек инфицированы HCV, из них около 150 млн поражено хроническим гепатитом С. Ежегодно заражается 3 – 4 млн человек. Длительный бессимптомный период заболевания

обычно сменяет острая инфекция. Причем, за период от 10 до 20 лет, у 20 – 30 % инфицированных HCV развиваются серьезные заболевания печени, включая цирроз и гепатоцеллюлярную карциному.

Несомненный интерес для комбинаторной терапии гепатита С представляет поиск новых лекарственных кандидатов, обладающих новыми механизмами действия, в том числе ингибиторов ранних стадий вирусной инфекции.

В результате скрининга *in vitro* противовирусной активности замещенных 2,4-бис(аминометил)-1H-индолов был найден замещенный индол AV0012 (рис. 1), обладающий активностью по отношению к вирусу гепатита С (HCV).

С использованием метода Western Blot было установлено, что AV0012 ингибирует HCV на 50 % при концентрации 11,9 μM , т.е. $\text{EC}_{50} = 11,9 \mu\text{M}$, при этом его цитотоксичность имеет значение $\text{CC}_{50} = 220,4 \mu\text{M}$. По данным метода иммуноферментного анализа (ИФА) на модели клеточной линии гепатомы человека

¹ Исследовательский Институт Химического Разнообразия (ИИХР), Россия, 114401, Химки, Московская Область.

E-mail: ypm@iigr.ru.

² ASAVI LLC, Hallandale Beach, FL 33009 USA, 1835 E. Hallandale Beach Blvd, #442

E-mail: av@chemdiv.com.

E-mail: av@asaville.com

³ ChemDiv, Inc., 6605 Nancy Ridge Drive, San Diego, CA 92121 USA

⁴ Московский физико-технический институт, Россия, 141700, Долгопрудный, Московская обл.

E-mail: okr@pharmcluster.ru

⁵ ФБГУ “Научно-исследовательский институт медицинской приматологии” РАМН, Россия, 354376, Сочи, Адлерский р-н, Краснодарский край.

E-mail: iprim@mail.sochi.ru

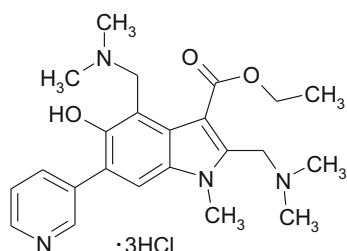


Рис. 1. Этиловый эфир 2,4-бис(диметиламинометил)-5-гидрокси-1-метил-6-(пиридин-3-ил)-1H-индол-3-карбоновой кислоты тригидрохлорид (AV0012).

Huh7, зараженной HCV *in vitro*, AV0012 имеет $EC_{50} = 2,2 \mu\text{M}$ и терапевтический индекс $TI_{50} = 100$. В то же время в клеточной линии гепатомы человека Huh7, содержащей субгеномный РНК-репликон HCV (генотип 1a, clone Con1) AV0012 не показал сколь-нибудь заметной активности. Это дает основание предположить, что AV0012 относится к новому классу ингибиторов HCV, блокирующих ранние стадии развития вирусной инфекции.

В данной работе приводятся результаты предклинических исследований AV0012, в том числе физико-химические свойства, активность, предполагаемый механизм действия, селективность, стабильность, фармакокинетика и биодоступность при пероральном введении животным, а также ADME свойства.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

AV0012 (ИИХР) представляет собой белый или белый с слегка желтоватым оттенком мелкокристаллический порошок, с температурой плавления $220 - 226 \text{ }^\circ\text{C}$

Таблица 1. Противовирусная активность и цитотоксичность AV0012 на панели РНК-содержащих вирусов*

Вирус	Клеточная линия	EC_{50} , мкМ	CC_{50} , мкМ
Бычья диарея (BVDV)	MDBK	> 100	> 100
Венесуэльский лошадиный энцефалит (штамм ТС-83)	Vero	> 200	> 200
Денге тип 2 (New Guinea)	Vero	> 200	> 200
Желтая лихорадка (штамм 17D)	Vero	> 200	> 200
Западный Нил	Vero	> 50	> 50
Параинфлуэнца (тип 3)	MA-104	> 110	110 ± 2
RSV (штамм A2)	MA-104	> 110	110 ± 2
Риновирус (тип 2, штамм HGP)	HeLa	> 200	> 200

* Все клеточные линии и вирусы, используемые в данных тестах, были получены из American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Клетки пассировали в культуральной среде MEM, содержащей 5 % фетальной бычьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина (все — от Nucleon Laboratories, Logan, UT, USA).

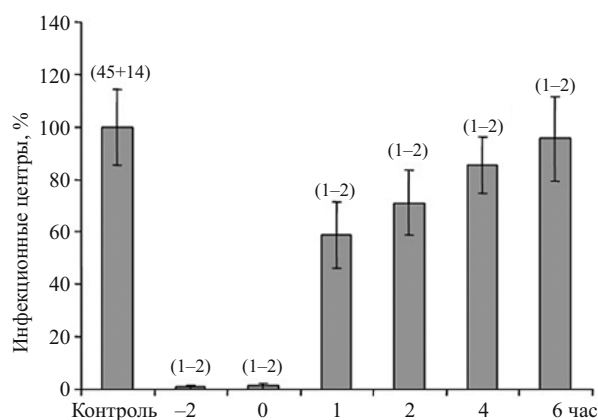


Рис. 2. Эффект AV0012 на заражение клеток линии Huh7 HCV. Время добавления 100 мкМ AV0012 по отношению к моменту заражения обозначено на оси абсцисс. Контроль — зараженные клетки без добавления AV0012. В скобках указано среднее количество окрашенных клеток в инфекционных центрах.

(с разложением), растворим в воде, спирте, диметилформамиде, устойчив при стандартных условиях хранения. Мол. масса 519,9, 7 гетероатомов, 3 акцептора водородной связи, 1 донор водородной связи, 7 вращающихся связей, $\text{Log } D = -0,71$ (pH 7,4), $\text{Log } P = -1,54$ (pH 4), $\text{Log } P = -0,02$ (pH 9,5), $\text{log } Sw = 2,47$, $\text{PSA} = 70,83$.

Эксперименты проводили на самцах мышей линии BALB/c, самцах крыс линии WAQ (питомник “Андреевка” РАМН) и самцах обезьян вида Макака резус (Rhesus macaques) 4,5 – 5 лет (Питомник ГУ НИИ Медицинской Приматологии РАМН) проводили в соответствии с Методическими указаниями руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [1].

Мышей и крыс содержали в группах по 10 – 12 животных при 12-часовом световом режиме и температуре $22 - 24 \text{ }^\circ\text{C}$, на стандартном брикетированном корме, при свободном доступе к воде и пище.

Обезьян не использовали в экспериментах в течение двух последних месяцев, они находились в жилых клетках на свободном двигательном режиме. Кормление обезьян осуществлялось обычным рационом из натуральных продуктов, рекомендуемых для данного вида приматов.

Молекулярные дескрипторы AV0012 $\text{log } P$, Sw , N_{donor} , $N_{\text{acceptors}}$, PSA были рассчитаны в программе ChemoSoft [www.chemdiv.com], а $\text{Log } D$ были рассчитаны

Таблица 2. Стабильность AV0012 в воде и в водных растворах

Растворитель	Содержание AV0012, %				
	0 ч	1 ч	6 ч	24 ч	48 ч
H ₂ O	96,62	94,93	95,84	95,10	94,96
pH 4,0	96,62	96,82	94,73	94,06	93,42
pH 7,0	96,62	91,70	86,36	67,61	50,90
pH 7,4	96,62	86,15	77,62	51,93	36,85

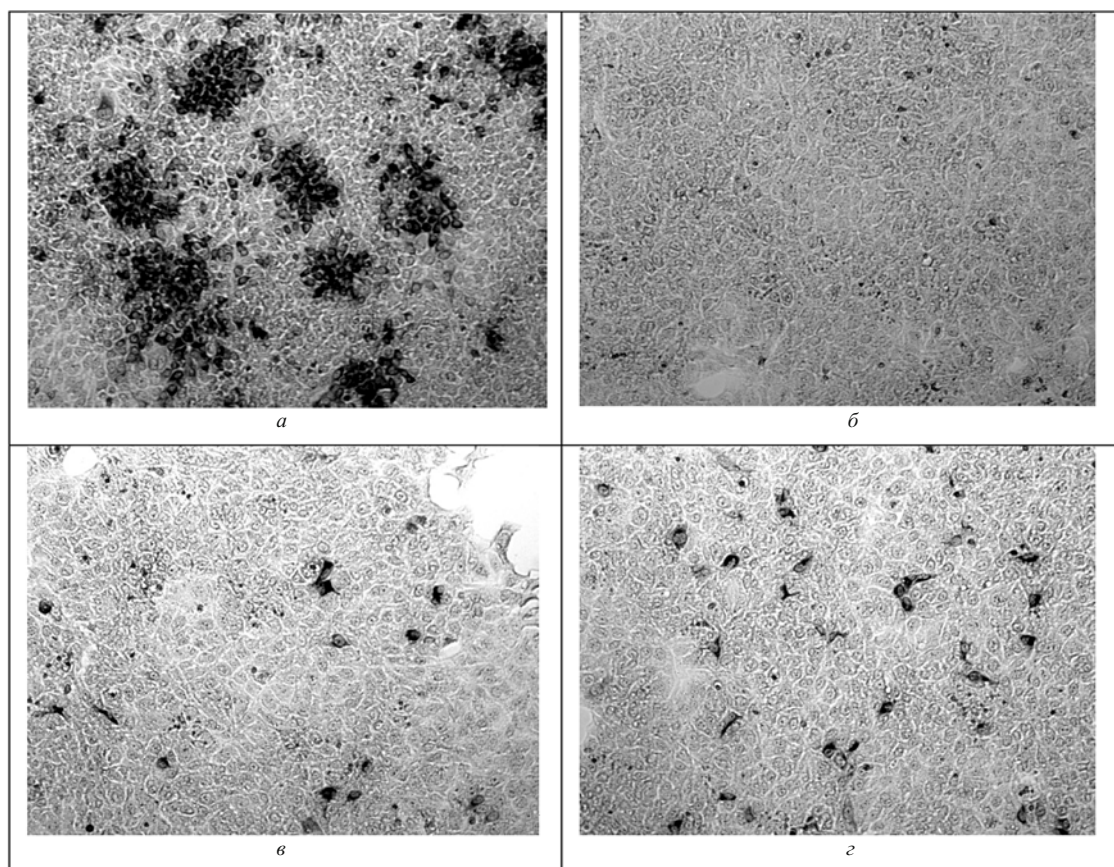


Рис. 3. Иммуногистохимическое окрашивание клеток линии Huh7, зараженных HCV. а — Контрольный монослой (без добавления AV0012), на котором хорошо видны окрашенные инфекционные центры. б — 100 мкМ AV0012 добавляли перед сдвигом температуры до 37 °С (время 0 ч). Окрашенных (зараженных) клеток практически не наблюдается. в — 100 мкМ AV0012 добавляли через 1 ч после сдвига температуры до 37 °С (время + 1 ч). Наблюдаются зараженные клетки, однако их количество на инфекционный центр снижено до 1 – 2. г — 100 мкМ AV0012 добавляли через 6 ч после сдвига температуры до 37 °С (время + 6 ч). Наблюдаются зараженные клетки, однако их количество на инфекционный центр снижено до 1 – 2.

таны в программе Marvin (ChemAxon) [<https://www.chemaxon.com/>].

Противовирусную активность AV0012 в комбинации с интерфероном альфа-2а изучали на модели гепатомы человека (Huh7), зараженной вирусом гепатита С (штамм JFH-1), с использованием иммунного теста ИФА на кор-антиген HCV. Используемая в данном эксперименте культура клеток Huh7 способна, будучи инфицированной HCV, поддерживать полный цикл вирусной репликации. Оба ингибитора продемонстрировали ожидаемую активность при их отдельном применении. Значение EC₅₀ для AV0012 составило

2,2 мкМ, а для интерферона — 0,11 ± 0,025 нг/мл. Результаты пяти независимых экспериментов усредняли и анализировали при помощи программы MacSynergy II. Для каждой экспериментальной точки (одна из комбинаций двух ингибиторов в одной из концентраций), рассчитывали сумму эффектов двух ингибиторов при данных концентрациях, которая отнималась от полученного экспериментально значения. Цитотоксичность каждой композициями ингибиторов определяли параллельно на идентичных, но незараженных клетках.

Таблица 3. Мембранопроницаемость AV0012 и стандартов на модели Сасо-2

Соединение	P _{app} (10 ⁻⁶ см/с) (3)	Мембранопроницаемость
AV0012	34,8 ± 3,0	Высокая
Кетопрофен	44,1 ± 4,9	Высокая
Метотрексат	0,08 ± 0,01	Низкая
Пропранолол	45,4 ± 5,2	Высокая

Таблица 4. Взаимодействие AV0012 с изоферментами цитохрома P-450

P-450	Ингибирование, %	IC ₅₀ , мкМ
1A2	26,66 ± 4,77	
2B6	-2,96 ± 3,08	
2C9	0,49 ± 1,74	
2C19	15,33 ± 4,12	
2D6	67,43 ± 1,65	1,6
2E1	6,81 ± 2,94	
3A4	68,89 ± 1,02	1,8

Противовирусную активность AV0012 в присутствии возрастающих концентраций человеческой сыворотки изучали с использованием ИФА, как указано выше.

Определение стадии вирусной инфекции, на которую воздействует AV0012, проводили на модели клеточной линии гепатомы человека (Huh7), зараженной HCV (штамм JFH-1). Клетки высевали в 24-луночные планшеты и заражали при температуре 4 °С (время – 2). При этой температуре происходит первичная адсорбция вирусных частиц на внешней клеточной мембране, однако проникновение вируса в клетку (интернализация) блокирована. Через два часа несвязанный вирус удаляли трехкратной промывкой охлажденным до 4 °С раствором PBS, после чего температуру поднимали до 37 °С (время 0), и клеточные культуры инкубировали в течение 48 ч в увлажненной атмосфере 5% CO₂ в воздухе. AV0012 в концентрации 100 мкМ добавляли к клеточным культурам в различное время: непосредственно перед заражением, перед сдвигом температуры до 37 °С, спустя 1, 2, 4 и 6 ч (время – 2, 0, + 1, + 2, + 4, + 6). Через 48 ч инкубации, клеточные культуры фиксировали смесью метанол-ацетон (1:1) в течение минуты, промывали PBS, блокировали 10 % фетальной телячьей сыворотки в PBS в течение 30 мин, инкубировали с мышиными моноклональными антителами к кор-антигену вируса гепатита С (Affinity BioReagents), разбавленными 1:250. После 1 ч инкубации, клетки промывали 3 раза раствором

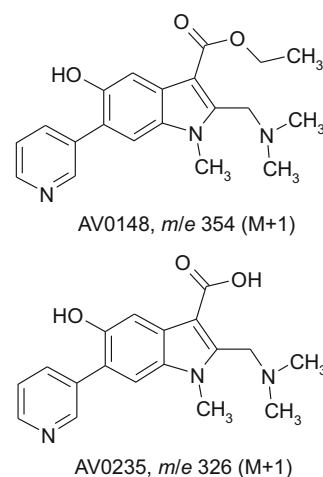


Рис. 4. Этиловый эфир 2-диметиламинометил-5-гидрокси-1-метил-6-(пиридин-3-ил)-1H-индол-3-карбоновой кислоты (AV0148) и 2-диметиламинометил-5-гидрокси-1-метил-6-(пиридин-3-ил)-1H-индол-3-карбоновая кислота (AV0235).

PBS (15 мин каждый), после чего добавляли антитела козы к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена, разбавленные 1:500. Все антитела разбавляли блокирующим раствором (10% фетальной телячьей сыворотки в PBS). Через 30 мин инкубации, клетки промывали 3 раза раствором PBS (15 мин каждый), после чего добавляли раствор субстрата (DAB substrate kit, Vectir Laboratories). После проявления яркого синего окрашивания, реакцию останавливали

Таблица 5. Основные фармакокинетические параметры AV0012 после однократного перорального введения (ПОВ) и внутривенного введения (ВВВ) крысам в дозе 5 мг/кг

Введение	T_{\max} , мин	C_{\max} , нг/мл	$AUC_{0 \rightarrow t}$, нг · мин/мл	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$, нг · мин/мл	$T_{1/2}$, мин	K_{el} , мин ⁻¹
ПОВ	15	102,0	4539,8	6340,1	124,79	0,0056
ВВВ	5	288,0	6400,5	7589,7	20,27	0,0342

Таблица 6. Основные фармакокинетические параметры AV0012 при пероральном введении (ПОВ) обезьянам AV0012 в дозе 10 мг/кг и внутривенном введении (ВВВ) в дозе 2 мг/кг

Введение	Обезьяна	T_{\max} , мин	C_{\max} , нг/мл	$AUC_{0 \rightarrow t}$, нг · мин/мл	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$, нг · мин/мл	$T_{1/2}$, мин	K_{el} , мин ⁻¹
ПОВ	35132	15	80,0	11737,5	18555,3	363,52	0,0019
	35133	30	206,0	32685,0	40990,0	230,26	0,003
	35283	120	19,0	4650,0	4969,7	110,81	0,0063
	средн. (n = 2)*	22,50	143,0	22211,3	29772,66	296,89	0,0025
	SD	10,61	89,1	14812,1	15863,7	94,23	0,0008
	SEM	7,50	63,0	10473,8	11217,3	66,63	0,0006
ВВВ	35266	1	430,0	4724,8	6739,2	66,49	0,0104
	35296	1	182,0	3591,7	5503,4	82,82	0,0084
	35921	1	231,0	6113,6	10798,7	69,09	0,01
	средн. (n = 2)	1	281,0	4810,0	7680,4	72,80	0,0096
	SD	-	131,3	1263,1	2770,3	8,77	0,0011
	SEM	-	75,8	729,3	1599,4	5,07	0,00

Примечание. * — для расчета средних значений использовались экспериментальные данные по двум обезьянам — 35132 и 35133.

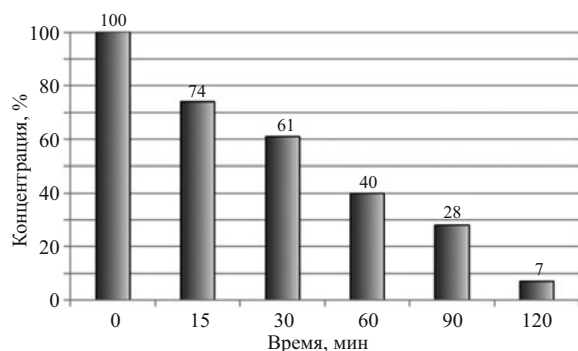


Рис. 5. Динамика содержания AV0012 в опытных образцах после инкубации с S9 фракцией микросом печени человека (полулогарифмические координаты).

промыванием водой. Окрашенные клеточные культуры фотографировали с помощью микроскопа Zeiss AxioPhot. Полученные результаты представлены на рис. 2 и 3.

Противовирусная активность AV0012 в отношении панели РНК-содержащих вирусов исследовали на соответствующих клеточных линиях (табл. 1) для чего клетки высевались в 96-луночные планшеты (Corning Glass Works, Corning, NY), 0,1 мл/лунку (5 – 10 000 клеток), и инкубировали при 37 °С до получения клеточного монослоя (обычно 12 – 18 ч). После этого к клеткам добавляли серийные разведения AV0012 в 0,1 мл среды на лунку. Каждая концентрация AV0012 добавлялась в три лунки. В контрольные лунки (вирусный контроль) добавлялось такое же количество среды, не содержащей AV0012. Через 5 мин к клеткам добавляли вирус в 0,1 мл среды на лунку. Множественность заражения составляла 0,001. Такое же количество среды без вируса добавлялось в лунки контроля цитотоксичности и клеточного контроля. Клетки инкубировали при 37 °С в увлажненной атмосфере 5 % CO₂ до появления выраженного цитопатического эффекта в лунках вирусного контроля (как правило, в течение трех дней). Далее клеточный супернатант был удален, 0,1 мл 0,034 % красителя Neutral Red была добавлена в каждую лунку, после чего клетки инкубировали 2 ч при 37 °С в темноте. После удаления красителя лунки промывали водой, высушивали на воздухе, после чего оставшийся в лунках краситель растворяли в 0,1 мл этанола. Планшеты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте, после чего оптическая плотность при 540/405 нм определялась при помощи спектрофотометра (Opsys MRTM, Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA). Значения оптической плотности выражались в процентах от контроля без тестируемых соединений, значения EC₅₀, CC₅₀, и терапевтического индекса (TI₅₀) приведены в табл. 1.

Растворимость AV0012 в деионизованной воде определяли спектрофотометрически с помощью фильтровальных 96-луночных планшетов компании Миллипор (США) по стандартному протоколу [4]. Было уста-

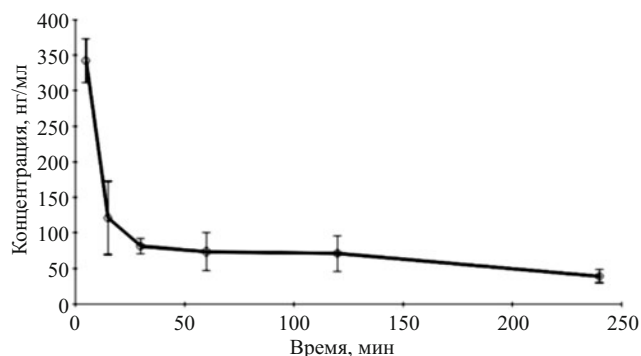


Рис. 6. Фармакокинетическая кривая усредненных концентраций AV0012 в плазме крови мышей после однократного внутривенного введения в дозе 5 мг/кг ($n = 3$) и основные фармакокинетические параметры AV0012: $T_{max} = 5$ мин, $C_{max} = 341,7$ нг/мл, $AUC_{0 \rightarrow t} = 17901$ нг · мин/мл, $AUC_{0 \rightarrow \infty} = 29197$ нг · мин/мл, $T_{1/2} = 201$ мин, $K_{el} = 0,0035$ мин⁻¹.

новлено, что растворимость AV0012 в деионизованной воде > 200 мкг/мл.

Стабильность AV0012 в воде и в водных растворах с pH 4, pH 7 и pH 7,4 (табл. 2) изучали с использованием LC-MS/MS системы, включающей высокоэффективный жидкостной хроматограф Agilent 1100 и двойной масс-спектрометр API 2000 компании Applied Biosystems. Стандартами при определении процентного содержания веществ во времени служили их содержание в образцах, которые были проанализированы сразу после растворения навески (0 часов). Для расчета относительного содержания препаратов в пробах использовались значения площадей пиков, рассчитанные программой Analyst 1.3.1.

Метаболическую стабильность AV0012 (рис. 3) изучали в микросомах печени человека с использованием LC-MS/MS по методике, описанной в работе [3] с использованием S9 постмитохондриальной фракции, содержащей микросомы и цитозоль печени человека.

Стабильность AV0012 в плазме крови мышей изучали с использованием LC-MS/MS по методике, аналогичной описанной в [2].

Связывание AV0012 с белками плазмы крови человека оценивали в соответствии с известной методикой [5].

Проницаемость AV0012 через биологические мембраны изучали на клеточной линии Caco-2 (ATCC, Кат. № HTB-37, Millipore) в соответствии с руководством производителя по применению Caco-2 планшеты с использованием UV/Vis спектрофотометра SPECTRAMax (Molecular Devices, США), пипетки объемом 0,2 – 10 мкл, 50 – 1200 мкл (Eppendorf AG-Hamburg, Германия), MultiScreen Caco-2 96-луночной фильтровочной планшеты для ВПС (Millipore Кат. № MACAC02S5) и УФ-планшеты №8404 Thermolabsystems, США). Полученные результаты представлены в табл. 3.

Взаимодействие AV0012 с изоферментами цитохрома P-450 человека: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19,

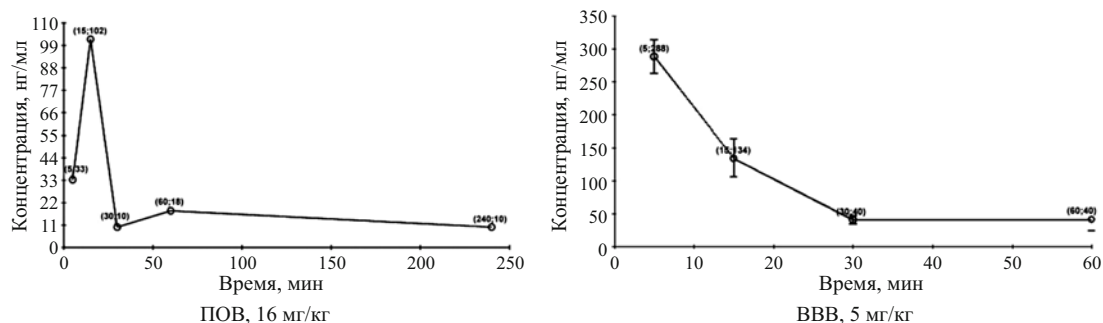


Рис. 7. Фармакокинетическая кривая усредненных концентраций AV0012 в плазме крови крыс при пероральном введении (ПОВ) и внутривенном введении (BVB) крысам.

CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 (Invitrogen, США) и CYP2B6 (BD Biosciences, США) было изучено (табл. 4) с использованием прилагаемых к китам протоколов. AV0012 использовался в концентрации 10 мкМ.

Фармакокинетика у мышей, крыс и обезьян

Пробоподготовка и введение препарата.

Изучение фармакокинетики AV0012 в мышах проводили при внутрибрюшинном введении раствора препарата мышам, который готовили путем растворения навески AV0012 в стерильном физиологическом растворе. Пробы крови отбирали после декапитации животных. Фармакокинетику изучали на 26 мышах при внутрибрюшинном введении в дозе 5 мг/кг. В опытную группу вошли 18 мышей, 8 оставшихся животных использовали для получения интактной плазмы. За 12 ч до начала эксперимента животных лишали пищи, оставляя свободный доступ к воде. На каждую временную точку брали по 3 мыши.

Изучение фармакокинетики AV0012 в крысах проводили при внутривенном введении и введении в желудок с помощью зонда раствора препарата в стерильном физиологическом растворе. Раствор препарата готовили непосредственно перед применением. Объем раствора рассчитывали соответственно массе тела и корректировали после взвешивания животных, которое проводили каждую неделю. Контрольным животным вводили 1 % крахмальную слизь в эквивалентных объемах. В каждую опытную группу вошли по 18 крыс и по 6 крыс использовали для получения интактной плазмы.

Изучение фармакокинетики AV0012 в обезьянах проводили при пероральном и внутривенном введении раствора препарата, который готовили путем растворения навески AV0012 в стерильном физиологическом растворе непосредственно перед применением. Препарат вводили внутрь в дозе 10 мг/кг веса обезьяны в 5 мл физиологического раствора и затем дополнительно давали запить 5 – 10 мл физиологического раствора. Забор крови осуществляли из левой локтевой вены обезьян, фиксированных в приматологических крес-

лах, спустя 15, 30, 60, 120, 240 и 480 мин после введения препарата.

Внутривенное введение препарата проводили на обезьянах, фиксированных в приматологических креслах. Препарат, растворенный в физиологическом растворе, вводили в правую локтевую вену в объеме 3 мл в дозе 2 мг/кг. Никаких патологических проявлений при пероральном и внутривенном введении не наблюдалось. Заборы проб венозной крови проводили на обезьянах, фиксированных в приматологических креслах.

Кровь животных собирали в пластмассовые пробирки, содержащие 100 мкл 5 % ЭДТА, до введения вещества (контрольная проба) и через 5, 15, 30, 60, 120 и 240 мин после введения. Плазму отделяли центрифугированием при 10000 об/мин в течение 10 мин и хранили до анализа при температуре – 80 °С.

Стандартные растворы AV0012 готовили в ацетонитриле в концентрациях 50, 100, 250, 500, 1000, 2500 и 5000 нг/мл для чего к 0,3 мл плазмы добавляли 0,5 мл ацетонитрила для осаждения белковых соединений и оставляли на 5 мин в холодильнике при 4 °С, затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант переносили в пробирки для дальнейшего анализа.

Пробы для получения калибровочных кривых (спайки) готовили добавлением 30 мкл соответствующего стандартного раствора AV0012 в ацетонитриле (50, 100, 250, 500, 1000, 2500 и 5000 нг/мл) к 0,3 мл интактной плазмы крови.

Для количественного определения AV0012 использовали систему высокоэффективной жидкостной хроматографии Agilent 1100, включающую дегазатор, бинарный насос, автосамплер и детектор поглощения света с изменяемой длиной волны в диапазоне 190 – 600 нм. С выхода системы образец подавался на вход двойного масс-спектрометра API 2000 компании Applied Biosystems. В качестве источника ионов в масс-спектрометре использовали электрораспылительный модуль TurboIonSpray, работающий в режиме положительных ионов.

Концентрации вещества в плазме рассчитывали на основании калибровочных данных. Основные фармакокинетические параметры, рассчитанные с помощью

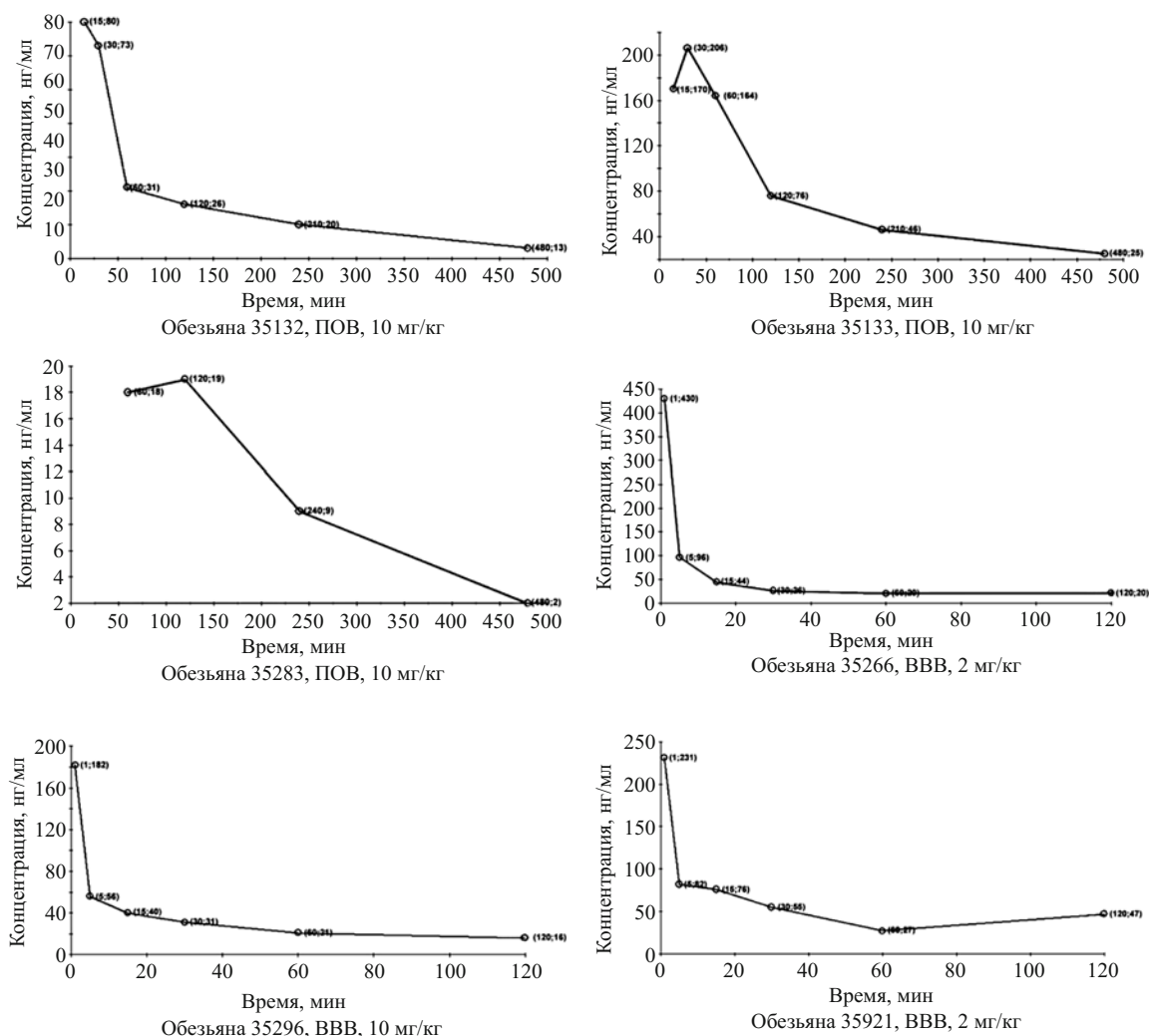


Рис. 8. Фармакокинетические кривые концентраций AV0012 в плазме крови обезьян при пероральном введении (ПОВ) и внутривенном введении (ВВВ) AV0012.

программы WinNonlin Professional ver. 5.2. на основании экспериментально полученных данных концентрация — время.

Результаты изучения фармакокинетики AV0012 на мышах представлены на рис. 4, на крысах — на рис. 5, табл. 5, у обезьян — на рис. 6, табл. 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование противовирусной активности AV0012 в комбинации с интерфероном альфа-2а показали, что оба ингибитора *in vitro* не проявляют антагонизма по отношению друг к другу. Противовирусная активность каждого из этих ингибиторов проявляется в полной мере в данной экспериментальной системе (аддитивный эффект) при этом цитотоксичность не была обнаружена ни для одной из тестируемых комбинаций ингибиторов. Это свидетельствует о возможности применения AV0012 совместно с интерфероном альфа в клинических исследованиях.

Было также установлено, что человеческая сыворотка вплоть до ее содержания 30 % не влияет на про-

тивовирусную активность AV0012 *in vitro*. Так, отношение активности AV0012 в присутствии плазмы ($EC_{50} + \text{плазма}$) к активности AV0012 без плазмы (EC_{50}) имеет значение $EC_{50 + 10\% \text{ плазмы}}/EC_{50} = 1,1 + 0,23$ ($EC_{50 + 20\% \text{ плазмы}}/EC_{50} = 0,95 + 0,14$ и $EC_{50 + 30\% \text{ плазмы}}/EC_{50} = 1,21 + 0,19$). При увеличении содержания плазмы до 40 %, измерение противовирусной активности становится невозможным, вследствие низкой эффективности заражения.

Результаты исследования зависимости ингибирования HCV от времени добавления 100 мкМ AV0012 к клеткам линии Huh7 по отношению к моменту их заражения HCV представлены на рис. 2 и 3, из которых следует, что максимальный эффект достигается при добавлении AV0012 за 2 ч до заражения вплоть до момента заражения (0 ч). При добавлении AV0012 через 1 ч и 6 ч после сдвига температуры до 37 °C (время + 1 и + 6) наблюдаются резкое снижение антивирусной активности. Полученные результаты свидетельствуют о том, что AV0012 сохранял способность подавлять инфекцию HCV *in vitro*, даже если его добавляли после

того, как вирус был адсорбирован на поверхности клеток. Однако при его добавлении всего на 1 ч позже, ингибиторная активность AV0012 была в значительной степени потеряна.

Полученные данные позволяют заключить, что AV0012 блокирует ранние стадии вирусной инфекции (интернализацию), следующую непосредственно за стадией первичной адсорбции на клеточной мембране. Таким образом, данный препарат является ингибитором нового класса, кардинально отличающимся от всех известных разрабатываемых в настоящее время препаратов против HCV.

Отметим также, что, по данным иммуногистохимического анализа, AV0012 подавляет распространение инфекции HCV в культуре клеток как посредством вирусной секреции, так и через тесный клеточный контакт. Для сравнения, нейтрализующие антитела не обладают такой способностью. Данное свойство AV0012 является принципиально важным преимуществом, т.к. распространение вирусной инфекции через клеточный контакт играет очень большую роль в распространении инфекции в печени при хроническом гепатите С.

Исследование селективности AV0012 проведенное на панели РНК-содержащих вирусов (табл. 1) показало, что вплоть до 50 – 200 мкМ ингибирования вирусов не наблюдается. В то же время, использовавшиеся в качестве положительного контроля рибавирин и интерферон Альфакон 1, проявили ожидаемую антивирусную активность (не показано). Эти данные указывают на то, что AV0012 является специфическим ингибитором HCV. Кроме того, представленные данные свидетельствуют также об отсутствии цитотоксичности AV0012 по отношению к ряду клеточных линий человека и других млекопитающих.

Исследование растворимости и стабильности AV0012 показало, что AV0012 хорошо растворим (> 200 мкг/мл) и стабилен в воде. AV0012 стабилен и в кислых средах. В нейтральных и щелочных средах, по данным LC-MS/MS, наблюдается заметное снижение стабильности AV0012 (табл. 2). Установлено, что в этих условиях одним из продуктов превращения AV0012 является AV0148, обладающий микромолярной активностью по отношению к HCV в клеточной линии гепатомы человека Huh7.3 ($EC_{50} = 19,6$ мкМ, $CC_{50} = 175,4$ мкМ, $TI_{50} = 8,9$). Через 24 ч образуется 8 % этого продукта, а через 48 ч — 13 %. Отметим, также, что образование продукта AV0235 в исследованных условиях мы не наблюдали.

AV0012 имеет ограниченную метаболическую стабильность в системе, содержащей S9 фракцию микросом печени человека (рис. 5). Содержание AV0012 в испытуемых образцах после 2 часов инкубации в присутствии S9 фракции снижается на 93 %, по сравнению с контролем, период полураспада AV0012 составляет 36 мин, а константа элиминации равна $K_{el} = 0,0195 \text{ мин}^{-1}$.

В плазме крови мышей AV0012 показал высокую стабильность, так как после 30-минутной выдержки AV0012 в плазме его содержание снижается всего на 6%, по сравнению с контрольными пробами.

Установлено также, что AV0012 слабо связывается с белками плазмы крови человека (38,3 %) и обладает высокой степенью мембранной проницаемости в условиях модели Сасо-2 (табл. 3).

Исследование взаимодействия AV0012 с изоферментами цитохрома Р-450 показало (табл. 4), что AV0012 взаимодействует только с изоферментами 2D6 ($IC_{50} = 1,6$ мкМ) и 3A4 ($IC_{50} = 1,8$ мкМ), и, вероятно, может метаболизироваться данными изоферментами.

Изучение фармакокинетики при внутрибрюшинном введении AV0012 мышам (рис. 6), пероральном и внутривенном введении крысам (рис. 7, табл. 5) и обезьянам (рис. 8, табл. 6) показало, что этот препарат хорошо всасывается и быстро поступает в системный кровоток, причем максимальная концентрация в зависимости от способа введения достигается через 1 – 22 мин после введения. Время полужизни в плазме крови составляет при пероральном введении животным 2 – 3 ч. Следует отметить также значительную биодоступность AV0012, которая в крысах составляет 71 %, а в обезьянах — 92 %.

ВЫВОДЫ

1. Иммуногистохимическое исследование позволило подтвердить, что AV0012 блокирует ранние стадии вирусной инфекции HCV, а также подавляет распространение инфекции HCV в культуре клеток, осуществляемое как посредством вирусной секреции, так и через тесный клеточный контакт. Показано, что AV0012 является специфическим ингибитором HCV и человеческая сыворотка практически не влияет на его противовирусную активность *in vitro*. Исследование противовирусной активности AV0012 в комбинации с интерфероном альфа 2a показали аддитивное действие комбинации ингибиторов, что свидетельствует о возможности применения AV0012 совместно с интерфероном альфа.

2. AV0012 имеет высокую растворимость и стабильность в водных растворах и в плазме крови мышей, ограниченную метаболическую стабильность, низкое связывание с белками плазмы крови человека, высокую проницаемость через биологические мембраны и взаимодействует только с изоферментами 2D6 и 3A4 цитохромами Р-450 человека.

3. AV0012 быстро всасывается в кровь животных, имеет достаточно высокое время жизни в плазме крови и высокую биодоступность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Р. У. Хабриев, *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, 2 изд., ЗАО "ИИА "Ремедиум", Москва (2005), с. 47 – 60.

2. L. Di, E. H. Kerns, Y. Hong, H. Chen. *Int. J. Pharm.*, **297**(1 – 2), 110 – 119 (2005).
3. M. Fonsi, M. Orsale, E. Monteagudo, *J. Biomol. Screen.*, **13**(9), 862 – 869 (2008).
4. M. Gao, R. E. Nettles, M. Belema, et al., *Nature*, **465**, 96 – 100 (2010).
5. N. Waters, R. Jones, G. Williams, B. Sohal, *J. Pharm. Sci.*, **97**(10), 4586 – 4595 (2008).

Поступила 27.01.14

PRECLINICAL STUDY OF AV0012 EARLY STAGE INHIBITOR OF HEPATITIS C VIRUS INFECTION: I. *IN VITRO* ADME AND PHARMACOKINETICS

A. V. Ivashchenko^{1,2,3}, P. M. Yamanushkin^{1*}, O. D. Mit'kin¹, E. V. Ezhova¹, O. M. Korzinov^{1,4}, N. A. Shevkun¹, A. G. Koryakova¹, R. N. Karapetyan¹, V. V. Bychko³, A. A. Ivashchenko^{1,4}, V. Z. Agrba⁵, B. A. Lapin⁵, and S. V. Orlov⁵

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

² ASAVI LLC, Hallandale Beach Blvd. #442, 1835 E. Hallandale Beach, FL 33009, USA;

³ ChemDiv, Inc., 6605 Nancy Ridge Drive, San Diego, CA 92121, USA;

⁴ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow oblast, 141700 Russia;

⁵ Research Institute of Medical Primatology, Russian Academy of Medical Sciences, Sochi-Adler, Krasnodar Krai, 354376 Russia;

* e-mail: ypm@ihr.ru

In vitro immunohistochemical investigations on the human hepatoma cell line (Huh7) infected with hepatitis C virus (HCV) strain JFH-1 showed that AV0012 compound blocks the early stages of viral infection. AV0012 also blocked viral infection spread in tissue culture through the secreted virus and through tight cell-to-cell contact. AV0012 is a specific inhibitor of HCV but not of related pestivirus, flaviviruses and other RNA-containing viruses such as bovine diarrhoea (BVDV), Venezuelan equine encephalitis (strain TC-83), dengue type 2 (New Guinea), yellow fever (strain 17D), west Nile fever, parainfluenza (type 3) virus, RSV (strain A2), and Rhinovirus (type 2 strain HGP). It is established that human serum does not significantly affect the antiviral activity of AV0012 *in vitro*. The drug combination studies with AV0012 and interferon alpha 2a *in vitro* showed that the two inhibitors act additively, which makes possible the use of this combination in clinical tests. AV0012 is highly soluble and stable in aqueous solutions and murine blood plasma, has limited metabolic stability, low binding to human plasma proteins, high permeability through biological membranes, and only interacts with isoenzymes 2D6 and 3A4 of human cytochrome P450. In animal pharmacokinetic studies, AV0012 was rapidly absorbed into the blood stream upon oral administration, showed sufficiently long half-elimination times, and had high oral bioavailability that reached 92% in monkeys. Further preclinical development of AV0012 is in progress.

Keywords: 2,4-bis(dimethylaminomethyl)-1-methyl-6-pyridin-3-yl-1'-indole-3-carboxylic acid ethyl ether; hepatitis C virus (HCV); HCV inhibitor; RNA-containing viruses; ADME properties; solubility; stability; Caco-2; cytochrome P-450; pharmacokinetics; bioavailability