

Zastosowanie kationowej pochodnej dekstranu do hamowania replikacji wirusa HSV-1

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie polimeru dekstranowego do profilaktyki i leczenia infekcji wywołanych przez wirusa opryszczki pospolitej.

Herpes simplex 1 (HSV-1), wirus opryszczki pospolitej, jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych patogenów spotykanych u ludzi. Statystyki wskazują, że około 50-90% populacji świata jest seropozytywna w stosunku do tego wirusa [1]. Typowe objawy pierwotnego zakażenia to owrzodzenia występujące głównie w obrębie twarzy na skórze, języku i wargach. Zakażenie wirusem HSV-1 może jednak prowadzić również do cięższych chorób, takich jak zapalenie oka lub zapalenie mózgu. Choroby te charakteryzują się ciężkim przebiegiem i mogą prowadzić do trwałych uszkodzeń zdrowia (np. ślepota), a nawet zgonu. Zakażenie następuje na skutek bezpośredniego kontaktu z nosicielem wirusa, w szczególności poprzez kontakt z miejscami zmienionymi chorobowo lub płynami biologicznymi (zwykle śliną). Zakażenie jest nieuleczalne. Oprócz fazy aktywnej infekcji tym wirusem, której skutki są widoczne w postaci zmian opryszczkowych, wirus powoduje infekcję utajoną. Tak więc osoba zakażona stanowi rezerwuuar wirusa przez cały okres swego życia stając się jego nosicielem i źródłem dalszych zakażeń. W fazie utajenia wirusa wchodzi on w stan latencji, ustanawiając zakażenie w komórkach nerwowych. W sytuacji nawet niewielkich zaburzeń stanu zdrowia gospodarza lub zaistnienia sytuacji stresowych wirus powraca do stanu aktywnego i jest transportowany poprzez zakończenia nerwowe do komórek skóry. Neurotropowe i neuroinwazyjne właściwości wirusa HSV-1 skutkują rozwojem zagrażających życiu chorób neurologicznych takich jak zapalenie opon mózgowych, a także podejrzewa się, że zakażenie może sprzyjać rozwojowi choroby Alzheimera. Infekcja wirusowa HSV-1 jest szczególnie groźna dla osób z osłabionym układem immunologicznym i niemowląt.

Obecnie dostępnych jest kilka leków przeciwwirusowych, które wykazują aktywność przeciwko patogenom należącym do rodziny *Herpesviridae*. Najstarszym i najczęściej stosowanym lekiem jest acyklowir i jego pochodne. Leki te zawierają analogi guanozyny, które do pełnej aktywności wymagają fosforylacji przez kinazy kodowane w genomie herpeswirusów. Po aktywacji są one włączane do nowo tworzonej nici DNA w czasie replikacji herpeswirusów, hamując jej elongację. Leki te zmniejszają częstotliwość nawrotów oraz łagodzą uciążliwe dolegliwości przy zakażeniu pierwotnym [2]. Choć są one zwykle

efektywne w stosunku do pierwotnego zakażenia, to nie zabezpieczają osoby zakażonej przed powtórным pojawieniem się symptomów choroby, ponieważ nie eliminują wirusa w stanie utajonym. Obserwuje się także coraz częstsze pojawianie się szczepów wirusowych opornych na te leki. Tak więc istnieje potrzeba poszukiwania nowego podejścia do opracowania efektywnych terapii zakażenia wirusem HSV-1.

Większość dotychczas stosowanych terapii wykorzystuje hamowanie replikacji wirusa oraz hamowanie fuzji. Natomiast istotnym etapem w cyklu życiowym wirusa jest jego wejście do komórki, dlatego hamowanie tego etapu wydaje się być kluczowe.

Ze względu na zdolność wykorzystywania różnych receptorów komórkowych, HSV-1 wykazuje wyjątkowo małą specyficzność tkankową. Receptory komórkowe wykorzystywane przez HSV-1 to przede wszystkim 3-O-sulfonowany siarczan heparanu, białko HVEM (herpesvirus entry mediator) oraz nektyna 1 [1]. Ze strony wirusa natomiast za oddziaływanie z komórką odpowiedzialne są glikoproteiny powierzchniowe gB, gC, gD oraz heterodimer gH/gL. Proces wejścia wirusa do komórki jest zapoczątkowywany przez interakcję gB ze znajdującymi się na powierzchni komórki proteoglikanami zawierającymi siarczan heparanu [2]. Następnie dochodzi do oddziaływania gD z jednym z receptorów i wejścia wirusa do komórki poprzez fuzję błon lub endocytozę [3,4]

Opisanych zostało kilka klas związków stanowiących inhibitory wejścia HSV-1 do komórki gospodarza. Jedną z najliczniejszych grup stanowią peptydy, takie jak α -, β - i θ -defensyny, peptydy naturalnie występujące u naczelnych [5,6], czy peptydy syntetyczne, np. peptydy G1 i G2 posiadające ładunek dodatni o wysokiej gęstości [7]. Właściwości hamujące wejście HSV-1 do komórki wykazuje również wiele substancji pochodzenia naturalnego, ekstrahowanych z roślin [8,9], czy organizmów morskich [10]. Pojawiają się również nieliczne doniesienia o przeciwwirusowym działaniu oligonukleotydów [11,12] oraz nanocząstek [13,14].

Spośród dotychczas zbadanych materiałów polimerowych, które hamują infekcję poprzez oddziaływanie z receptorem wejścia - siarczanem heparanu, można wyróżnić kopolimer kwasu 4-styrenosulfonowego i kwasu maleinowego [3] oraz poliaminokwasy: poli-L-lizynę i poli-L-argininę [4].

Badano także pochodne aminowe i amoniowe naturalnych polisacharydów (np. dekstran, pullulan). Wykazano, że dekstran podstawiony grupami aminowymi, w szczególności dekstran-propylo-1,3-diamina efektywnie hamuje replikację wirusa HSV-1, podczas gdy związek ten zmodyfikowany poprzez przekształcenie pierwszorzędowej grupy aminowej w

grupę trimetyloamoniową (*monoquaternary ammonium propyl-1,3-diamine, MQ-propane-1,3-diamine*) aktywności tej nie wykazuje [15], w zupełnym przeciwieństwie do podobnych strukturalnie kationowych pochodnych dekstranu będących przedmiotem niniejszego zgłoszenia.

Według niektórych badań inhibitorami wejścia są także sulfonowane galaktany i fukoidany, siarczan dekstranu, heparyna oraz sulfonowane ligniny [6-7812].

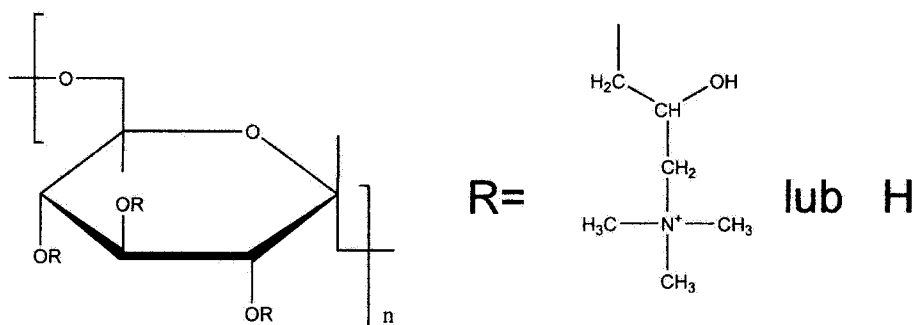
EP0066379 opisuje kompozycję do zwalczania HSV typu I i II, zawierającą sól sodową siarczanu dekstranu o masie molowej z zakresu od 4100 to 25000 i zawierającą co najmniej 0,2 równoważnika SO_3Na na jednostkę glukopiranozyłową.

Zgłoszenie WO2000024784 ujawnia pochodne dekstranu wykazujące biologiczną aktywność wobec HSV, mianowicie dekstranopolialdehydo-rezorcynę.

Celem wynalazku opisanego w niniejszym zgłoszeniu jest dostarczenie nowego skutecznego leku do leczenia i profilaktyki infekcji wywołanych przez HSV-1.

Istota wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie kationowo modyfikowanego za pomocą czwartorzędowych grup amoniowych dekstranu o wzorze I do leczenia i profilaktyki chorób wywoływanych przez wirusa HSV-1. Korzystnie stosuje się dekstran zmodyfikowany przy pomocy chlorku glicydylotrimetyloamoniowego (GTMAC).



Wzór I

Korzystnie stosuje się dekstran o masie cząsteczkowej od 6 do 100 kDa. Kationowo zmodyfikowany dekstran ma stopień podstawienia w zakresie 20-100%, korzystnie 20-60%, bardziej korzystnie 25-60%.

Zastosowanie obejmuje polimery oparte na dekstranie w postaci maści lub kropli podawanych miejscowo na skórę lub do oka, doustnie, dootrzewnowo lub dożylnie w leczeniu ogólnoustrojowym.

Wynalazek został zilustrowany na figurach rysunku, które przedstawiają korzystne przykłady realizacji:

Fig. 1 przedstawia widmo IR-ATR dekstranów modyfikowanych kationowo o masie 6kDa,

Fig. 2 widmo IR-ATR dekstranów modyfikowanych kationowo o masie 40kDa, a

Fig. 3 widmo IR-ATR dekstranów modyfikowanych kationowo o masie 100kDa.

Fig. 4 ilustruje cytotoksyczność polimerów. Żywotność komórek została przedstawiona jako % wartości próbki kontrolnej, tj. nie traktowanej polimerami,

Fig. 5 przedstawia przeciwwirusową aktywność dekstranów modyfikowanych GTMAC, a

Fig. 6 ilustruje zależność aktywności anty-HSV-1 od stopnia podstawienia.

Przykłady wykonania

Przedmiot wynalazku został bliżej przedstawiony w przykładach realizacji.

Przykład 1

Synteza kationowych dekstranów

0,5 g dekstranu o masie cząsteczkowej 6 kDa, 40 kDa (DEX40, Sigma-Aldrich) lub 100 kDa (DEX100, Sigma-Aldrich) rozpuszczono w 25 ml wody destylowanej, a następnie dodano odpowiednią ilość (Tabela 1) chlorku glicydylotrimetyloamoniowego (GTMAC, Sigma-Aldrich). Roztwór zalkalizowano dodając 1 ml 5 M roztworu NaOH. Mieszaninę intensywnie mieszano na mieszadle magnetycznym i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 4 godziny w temperaturze 80°C. Po zakończeniu syntezy mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej i zneutralizowano roztworem HCl. Roztwór przelano do tuby dializacyjnej o masie cząsteczkowej odcięcia równej 3,5 kDa i dializowano względem wody tak długo, aż przewodnictwo dializowanego roztworu spadło poniżej 10 μ S. Otrzymane polimery wyodrębniono poprzez liofilizację. Zostały one oznaczone akronimami, w których pierwsza liczba oznacza masę cząsteczkową w kilodaltonach, natomiast druga stopień podstawienia (DS) w procentach.

Tabela 1. Ilość GTMAC użytego do syntezy kationowych dekstranów

Polimer	Masa dekstranu [g]	GTMAC [ml]	Liczba moli GTMAC przypadająca na 1 mol grup glukozowych w dekstranie
DEX ₆ DS ₂₃	0,5	2,25	5
DEX ₆ DS ₄₁	0,5	4,5	10
DEX ₆ DS ₃₇	0,5	6,75	16
DEX ₆ DS ₅₂	0,5	13,5	32
DEX ₄₀ DS ₂₆	0,5	4,5	10
DEX ₁₀₀ DS ₃₅	0,5	4,5	10

Przykład 2

Wyznaczanie stopnia podstawienia kationowych dekstranów na podstawie analizy elementarnej

Dekstran oraz jego kationowe pochodne poddano analizie elementarnej w celu wyznaczenia stopnia podstawienia (DS) jednostek glukozowych grupami GTMAC, zdefiniowanego jako liczba grup GTMAC przypadających na 1 jednostkę glukozową w dekstranie. Wyniki zebrano w Tabeli 2.

Tabela 2. Wyniki analizy elementarnej otrzymanych kationowych pochodnych dekstranu oraz wartości DS obliczone na ich podstawie

Polimer	C	H	N	N/C	DS [%]
DEX ₆ DS ₀	40,75	6,544	0	0	0
DEX ₆ DS ₂₃	42,49	6,98	1,550	0,04	23
DEX ₆ DS ₄₁	41,23	7,214	2,32	0,06	41

DEX ₆ DS ₃₇	42,33	6,632	2,24	0,05	37
DEX ₆ DS ₅₂	43,38	7,491	2,87	0,07	52
DEX ₄₀ DS ₀	40,965	6,52575	0	0	0
DEX ₄₀ DS ₂₆	40,89	7,103	1,64	0,04	26
DEX ₁₀₀ DS ₀	40,965	6,52575	0	0	0
DEX ₁₀₀ DS ₃₅	41,53	7,372	2,12	0,05	35

Przykład 3

Widma IR kationowych pochodnych dekstranu

W celu potwierdzenia podstawienia dekstranu przez GTMAC, zmierzono widma IR. O obecności grup GTMAC w zmodyfikowanym dekstranie świadczy pasmo przy ok. 1475 cm⁻¹.

Wyniki zebrano w Tabeli 3 i na Fig. 1-3.

Tabela 3.

Polimer	DS [%]	Położenie pasma - drgania asymetryczne C-H pochodzące od GTMAC [cm ⁻¹]
DEX ₆ DS ₀	0	-
DEX ₆ DS ₄₁	41	1477
DEX ₆ DS ₂₃	23	1477
DEX ₆ DS ₃₇	37	1477
DEX ₆ DS ₅₂	52	1478
DEX ₄₀ DS ₀	0	-
DEX ₄₀ DS ₂₆	26	1475
DEX ₁₀₀ DS ₀	0	-
DEX ₁₀₀ DS ₃₅	35	1477

Przykład 4

Potencjał zeta kationowych pochodnych dekstranu

Potencjał zeta został zmierzony przy użyciu urządzenia NanoZetasizer firmy Malvern. Pomiary wykonano dla próbek o stężeniu 1 mg/ml w 0,015 M NaCl. Wyniki zebrane są w Tabeli 4.

Tabela 4. Potencjał zeta 1 mg/ml roztworów kationowych pochodnych dekstranu w 0,015 M NaCl.

Polimer	DS [%]	Potencjał zeta [mV]
DEX ₄₀ DS ₀	0	-1,87 ± 0,64
DEX ₄₀ DS ₂₆	26	+14,0 ± 1,61
DEX ₁₀₀ DS ₀	0	-2,85 ± 0,94
DEX ₁₀₀ DS ₃₅	35	+25,2±1,42
DEX ₆ DS ₀	0	1,80 ± 1,78
DEX ₆ DS ₂₃	23	+9,48 ± 1,80
DEX ₆ DS ₄₁	41	+9,69 ± 1,73
DEX ₆ DS ₃₇	37	+11,5 ± 2,29
DEX ₆ DS ₅₂	52	+16,4 ± 1,50

Przykład 5

Wpływ kationowo modyfikowanych dekstranów na żywotność komórek

Cytotoksyczność kationowych pochodnych dekstranu sprawdzono z wykorzystaniem testu XTT. Analiza została przeprowadzona na linii komórkowej Vero E6, która jest permisywna dla wirusa HSV-1. Test ten opiera się na badaniu aktywności enzymów mitochondrialnych, poprzez określenie ich zdolności do redukcji substratu do barwnego produktu. Żywotność

komórek wyznaczono przez pomiar absorbancji przy 450 nm w stosunku do kontroli, którą stanowiły komórki hodowane w pożywce bez dodatków. Komórki hodowano przez 2 dni w mieszaninie pożywki MEM z dodatkiem soli Hanka, oraz pożywki M199 z dodatkiem soli Earle'a w stosunku 2:1 suplementowanej 3% inaktywowaną termicznie płodową surowicą cielęcą (FBS) oraz penicyliną i streptomycyną, z dodatkiem badanego polimeru.

Przedstawione na Fig. 4 wyniki jasno wykazują bardzo niską cytotoksyczność zsyntetyzowanych polimerów w testowanych stężeniach

Przykład 6

Wpływ kationowo modyfikowanych dekstranów na replikację wirusa opryszczki typu 1 (HSV-1)

Po ustaleniu stężeń związków, które nie miały toksycznego wpływu na komórki zbadano ich wpływ na replikację wirusa HSV-1. Komórki preinkubowano z dekstranami o odpowiednich stężeniach przez 30 min, a następnie, nadal w obecności dekstranów, zakażano wirusem o $TCID_{50}=400$. Po 2 godzinach usuwano niezwiązane cząstki wirusa przez 3-krotne przemycie roztworem PBS i inkubowano, również w obecności dekstranów, przez kolejne 2 dni. Po tym czasie z pożywki komórkowej izolowano DNA i wykorzystywano jako matrycę w reakcji real-time PCR. Zdolność dekstranów do hamowania replikacji HSV-1 wyznaczono jako spadek liczby kopii wirusa w mililitrze pożywki.

Fig. 5 przedstawia przeciwwirusową aktywność dekstranów modyfikowanych GTMAC. Do analizy wykorzystano dekstrany o różnej masie molowej (6, 40 i 100 kDa) modyfikowane GTMAC. Jako kontrolę (ctrl) wykorzystano odpowiednie niemodyfikowane dekstrany. Dla wszystkich związków zastosowano stężenie 500 µg/ml.

Na podstawie diagramu wyraźnie widać, że dekstran modyfikowany GTMAC hamuje namnażanie się wirusa HSV-1 w porównaniu z odpowiednią próbką kontrolną.

W następnej kolejności ustalono wpływ stopnia podstawienia GTMAC na aktywność przeciwwirusową przy stałej masie molowej dekstranu (6 kDa).

Fig 6. przedstawia zależność aktywności anti-HSV-1 od stopnia podstawienia. Wykorzystano 3 różne stopnie podstawienia polimeru: 23%, 37% oraz 52%. Przedstawiony diagram wyraźnie wskazuje, że aktywność przeciwwirusowa polimeru koreluje ze stopniem podstawienia.

Literatura:

- [1] Spear PG: Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* 2004, 6:401-410.
- [2] Shukla D, Spear PG: Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *J Clin Invest* 2001, 108:503-510.
- [3] Subramanian RP, Geraghty RJ: Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104:2903-2908.
- [4] Clement C, Tiwari V, Scanlan PM, Valyi-Nagy T, Yue BY, Shukla D: A novel role for phagocytosis-like uptake in herpes simplex virus entry. *J Cell Biol* 2006, 174:1009-1021.
- [5] Hazrati E, Galen B, Lu W, Wang W, Ouyang Y, Keller MJ, Lehrer RI, Herold BC: Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. *J Immunol* 2006, 177:8658-8666.
- [6] Yasin B, Wang W, Pang M, Cheshenko N, Hong T, Waring AJ, Herold BC, Wagar EA, Lehrer RI: Theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry. *J Virol* 2004, 78:5147-5156.
- [7] Tiwari V, Liu J, Valyi-Nagy T, Shukla D: Anti-heparan sulfate peptides that block herpes simplex virus infection in vivo. *J Biol Chem* 2011, 286:25406-25415.
- [8] Chen SD, Gao H, Zhu QC, Wang YQ, Li T, Mu ZQ, Wu HL, Peng T, Yao XS: Houittuynoids A-E, anti-herpes simplex virus active flavonoids with novel skeletons from *Houittuynia cordata*. *Org Lett* 2012, 14:1772-1775.
- [9] Lin LT, Chen TY, Chung CY, Noyce RS, Grindley TB, McCormick C, Lin TC, Wang GH, Lin CC, Richardson CD: Hydrolyzable tannins (chebulagic acid and punicalagin) target viral glycoprotein-glycosaminoglycan interactions to inhibit herpes simplex virus 1 entry and cell-to-cell spread. *J Virol* 2011, 85:4386-4398.
- [10] Vo TS, Ngo DH, Ta QV, Kim SK: Marine organisms as a therapeutic source against herpes simplex virus infection. *Eur J Pharm Sci* 2011, 44:11-20.
- [11] Sauter MM, Gauger JJ, Brandt CR: Oligonucleotides designed to inhibit TLR9 block Herpes simplex virus type 1 infection at multiple steps. *Antiviral Res* 2014, 109:83-96.
- [12] Shogan B, Kruse L, Mulamba GB, Hu A, Coen DM: Virucidal activity of a GT-rich oligonucleotide against herpes simplex virus mediated by glycoprotein B. *J Virol* 2006, 80:4740-4747.
- [13] Baram-Pinto D, Shukla S, Gedanken A, Sarid R: Inhibition of HSV-1 attachment, entry, and cell-to-cell spread by functionalized multivalent gold nanoparticles. *Small* 2010, 6:1044-1050.
- [14] Mishra YK, Adelung R, Röhl C, Shukla D, Spors F, Tiwari V: Virostatic potential of micro-nano filopodia-like ZnO structures against herpes simplex virus-1. *Antiviral Res* 2011, 92:305-312.
- [15] Yudovin-Farber I, Gurt I, Hope R, Domb AJ, Katz E: Inhibition of herpes simplex virus by polyamines. *Antivir Chem Chemother* 2009, 20: 87-98.

Lidia Chlebicka
rzecznik patentowy