

단순 포진 바이러스 감염 생쥐에 대한 아데닌 아라비노사이드와 그의 프레드니손 결합화합물인 BR-8702-AP의 항바이러스 효과

채희상* · 신원섭 · 신현종 · 백우현

보령제약 중앙연구소

The Efficacy of 9-(β -D-Arabinofuranosyl)adenine and its Conjugate of Prednisone (BR-8702-AP) in the Treatment of *Herpes simplex Virus Type 1 Encephalitis in Mice*

Hee Sang CHAI*, Woon Sub SIN, Hyun Jong SHIN and Woo Hyun PAIK

Boryung Pharmaceutical Central Research Laboratory, 689 Kumjeng-Dong,
Kunpo-Si, Kyunggi-Do, Korea.

(Received February 9, 1993; accepted March 24, 1993)

Abstract—The therapeutic effectiveness of adenine arabinoside(ara-A) and its conjugate of prednisone(BR-8702-AP) was compared in *Herpes simplex Virus Type 1* (HSV-1) infected BALB/c mice. The BALB/C mouse was infected with HSV-1(700 PFU/mouse) intranasally. Among mice infected intranasally with virus, a mortality rate of 100% was observed. On the oral administration of non-toxic doses of ara-A or BR-8702-AP(125 mg/kg/day) for 5 consecutive days 2 hours after virus infection, the ara-A was highly effective in reducing mortality to 0% ($P<0.001$) and BR-8702-AP was also effective in reducing mortality to 15% ($P<0.01$). In this model infection, the virus was first replicated in the lung and transmitted to the brain. Both ara-A and BR-8702-AP did not inhibit the viral replication in the lung, but they inhibited the viral transmission to the brain. However, the BR-8702-AP was less effective than the ara-A to prevent transmission of virus to brain. Therefore, the reduced mortality due to ara-A or BR-8702-AP therapy was associated with inhibition of viral transmission to brain.

Keywords □ adenine arabinoside, adenine arabinoside conjugate-prednisone, HSV-1, encephalitis, pathogenicity.

Herpes simplex virus는 Andrewes, 1967 등에 의해 Herpesvirus hominis로 표기되었으며, genital strain을 Herpes simplex virus type 2, mouth 및 eye에 발생하는 strain을 Herpes simplex virus type 1이라 부르고 있다.

Herpes simplex virus type 1(이하 HSV-1으로 표기함)은 Hinuma, 1962와 Whitley, Soong, 1981 등에 의하여 구진, 치육구내염, 각막염, 뇌염, 신생아 전신감염 등을 일으키며 잠재부위가 삼차 신경절임이 밝혀졌다.

한편 HSV-1 감염증에 대한 치료약물로는 Prusoff, 1959에 의해 합성된 idoxuridine을 시작으로 Lee, 1960 등에 의해 ara-A(vidarabine)가 합성되었고, Wellings,

1972에 의해 trifluridine이 개발되었다. 또한 Elion, 1977과 Schaeffer 1978 등에 의해 acyclovir가, 그후 Jones, 1979 등에 의해 bromovinyldeoxyuridine(BVDU)가 합성되어 치료제로 사용되고 있다. 이외에도 nucleoside계 유도체들이 주를 이루어 항HSV-1 약제로 개발되고 있다.

Ara-A는 Pavan-Langston, 1974에 의해 각막 herpes에 유효함이 보고된 이래 유효하게 항HSV 약제로 널리 이용되어 왔으나 1986년 이래 새롭게 임상치료에 등장한 acyclovir에 의해 제 1차 선택약으로서의 지위를 잃어 버리고 있다. 그러나 ara-A는 Pollard, 1978과 Chadwick, 1978 등이 보고한 바와 같이 B형 간염 virus에 대해서 치료약으로서 사용되고있는 등 아직도 선택의 폭이 넓은 약물이나 Plunkett, 1977와 Whitley, 1980 등이 보고한

* To whom correspondence should be addressed.

바와 같이 그 약리작용이 virus 감염 세포내에서만 작용하는 것이 아니라 정상세포의 DNA 합성에도 영향을 미치며 체내에서 deaminase에 의해 항 HSV-1 효과가 적은 arabinosyl hypoxanthine으로 변하는 등의 단점도 가지고 있다.

이에 본 연구자 등은 BR-8702-AP 즉 9-(β -D-arabino-furanosyl)adenine conjugate를 합성하였는데, conjugate moiety로서는 prednisone을 phosphodiester bond로 결합시킨 것이다. Matsumoto와 Uzuka, 1987 등은 감염증에 대한 steroid의 사용은 중증 감염증에 대해서만 사용할 것을 권고하고 있으며 Siota, 1985는 herpes성 각막염에 대해서 steroid제의 안전한 사용법을 요구하는 등 내인성 herpes감염증에서의 steroid제의 사용에 많은 규제가 있는것도 사실이다. 한편 Perrillo, 1985등은 steroid와 ara-A 혹은 ara-AMP와의 병용 요법에 의한 간염바이러스 감염증 치료에 효과가 우수함을 발표하였고 Hong, 1984 등은 이 conjugate의 장점으로 수용성의 증가, adenosine deaminase에 대한 안전성 증가, lipophilicity의 증가, steroid에 의한 target specific한 역할부여 등을 거론 하였는바 본 물질의 항 HSV-1효과를 검색하여 biological activity에 대한 기초자료로 삼고자 하였다.

실험방법

항바이러스 시험물질

Ara-A는 sigma사 제품(Lot No., 50 H 2617)이며, BR-8702-AP(ara-AMP-Prednisone)은 보령제약 중앙연구소에서 합성한 것으로 0.5% carboxy methyl cellulose (이하 0.5% CMC로 표기함)에 소정의 농도가 되도록 현탁하여 사용하였다.

바이러스

바이러스는 일본 오츠카제약의 미생물연구소로부터 분주받은 것으로 E. MEM(10% FBS 함유) 배지를 이용한 단층배양한 vero세포에 접종 증식시켰다. Dulbecco, 1980의 Plaque법을 이용하여 정량하였으며 1.366×10^6 PFU/ml의 HSV-1 원액을 얻었다. 이를 이하의 실험에 사용하였다.

감염모델(Kern, 1978. Modified)

공격 virus로서 이용할 HSV-1의 virus량을 결정하기 위해 1.366×10^6 PFU/ml의 HSV-1 원액을 생리식염액을 이용하여 1/10, 1/20, 1/40, 1/80으로 희석하였다. BALB/c mouse에 희석한 virus액을 10 μ l씩 chloroform 마취하에 비강으로 흡입 시켜서 virus 감염에 의해 발생한 mouse의 사망율을 기록하였다. 그 결과 Fig. 1.에 표시한 바와같이 1/20의 virus량을 감염 시킨 군은 6일부터 9일까지 모두 사망하였다.

이 결과로부터 이하의 실험에 감염시킬 virus양은 1/20 희석액으로 결정되었으며 PFU로 계산하면 700 PFU/mouse이다.

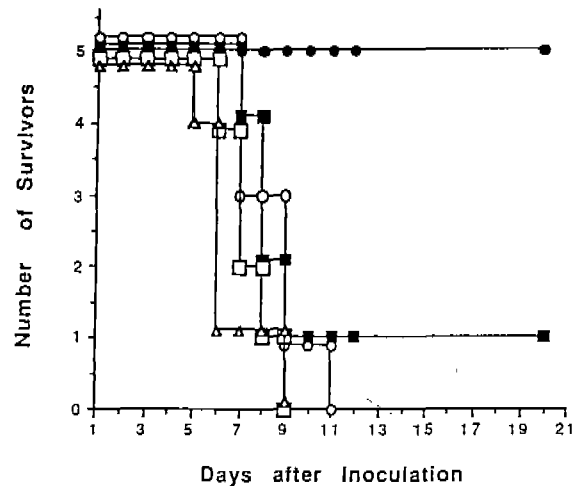


Fig. 1. The viral titration of HSV-1 on BALB/c mice *in vivo*. The HSV-1 was infected intranasally to BALB/c mice. n=5. —●— Intact, —■— 1/80, —○— 1/40, —□— 1/20 6.83×10^4 PFU/ml, —△— 1/10

한편 BALB/C mouse는 15~20g인 4주령으로 일본 Charles River에서 구입하였다.

항 HSV-1 효과검색실험, *in vivo*(Kern, 1978과 Sloan, 1973. Modified)

감염모델항에서 결정된 감염제에서 ara-A-conjugate인 BR-8702-AP의 경구투여에 의한 항 HSV-1 활성을 평가하기 위해 대조약으로서 ara-A을 이용하여 실시하였다. 소정의 약제 농도가 되도록 0.5% CMC를 이용, 현탁액을 조제하여 투여 Sample로 하였다. 투여용량은 0.2 ml로 하였으며 이때의 투여농도는 ara-A는 13.9, 41.7, 125 mg/kg/day였으며 BR-8702-AP는 41.7, 125, 375 mg/kg/day로 하였다. 모든 sample은 감염원료일부부터 5일간 경구투여하였다. 감염완료일부부터 각군의 체중변화를 측정하면서 virus감염에 의해 발생한 mouse의 사망을 기록하였다.

BR-8702-AP 및 ara-A 투여에 의한 HSV-1의 pathogenicity 변화

HSV-1 감염 mouse의 blood, lung, brain안에서 증식하는 virus의 수에 미치는 BR-8702-AP 및 ara-A의 작용을 검토하기 위해 이미 결정된 감염제에서 이하의 실험을 실시하였다.

감염당일로부터 5일간 ara-A와 BR-8702-AP 125 mg/kg/day을 경구투여하였다. 장기는 감염 후 3일부터 9일까지 약물투여군 및 control군을 각각 3마리씩 취하여 채취하였다.

장기채취 : Chloroform 심마취하에서, 흉부를 절개한 후 21G 주사침의 syringe를 이용하여 심장에서 채혈을 하였다. 순차로 흉부에서 폐, 두부에서 뇌를 채취하였다.

장기보존 : 혈액을 원심분리(4°C, 10 min, 3,000 r.p.m)한 후, 혈청을 -80°C 에 동결보존하였다. 폐와 뇌는 ep-

pendorf tube에 채취하여 -80°C 에 동결보존하였다.

장기중 virus 정량: 동결한 폐와 뇌를 해동시켜서 중량을 측정 후, MEM(HEPES 함유) 2 ml를 넣어둔 원심 tube에 넣었다. Homogenizer로 10초간씩, 2회 파쇄하고 3,000 r.p.m, 10분간 원심분리하여 상등액을 tube에 회수하였다. 상등액을 빙수중에서 보존하면서 MEM(HEPES 함유)으로 1/5로 희석하였다. 한편 동결 시킨 혈청도 해동시켜서 1/5로 희석하였다. 각 희석액을 24 well의 단층 vero 세포에 0.2 ml씩 가해서 60분간 흡착시켰다. 희석액을 제거한후 1% methylcellulose 유지배지를 가해서 2일후 cytopathic effect(CPE)를 확인하고 plaque를 crystalviolet액으로 염색한 후 counting하였다.

통계처리

각 약물 치료군과 control군간의 mice의 생존율에 대한 유의성 검정은 Kaplan-Meier법에 의해 처리하였다.

결 과

항 HSV-1 효과

체중변화: Control군의 체중은 감염후 10일까지 감소하여 모든 mouse가 사망했다. 약제 투여군은 BR-8702-AP, ara-A 투여에 의해서 감염에 의한 체중감소가 control군에 비해서 억제되었다. Fig. 2.(감염 7일 후 점선으로 표시한 graph는 생존한 mouse의 체중임.)

생존율: Control군은 감염 후 6일부터 11일까지 모든 mouse가 사망하였고, BR-8702-AP 투여군은 41.7 mg/

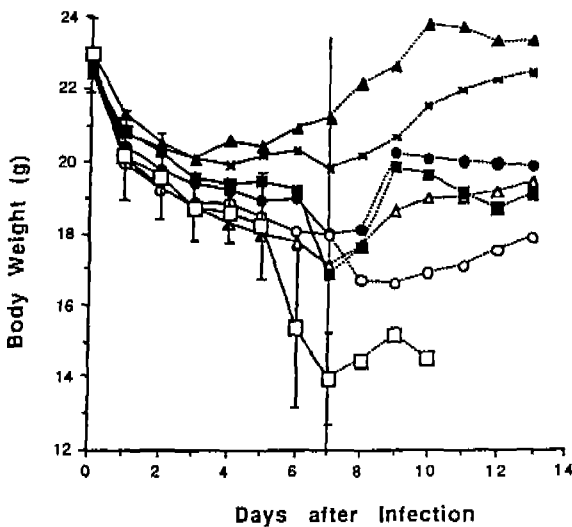


Fig. 2. Effect of body weight of BR-8702 and ara-A on HSV-1 infected BALB/c mice Mice were infected with 700 PFU /mouse of HSV-1 and given orally BR-8702-AP or ara-A once daily for 5 consecutive days. n=7. —●— Br-8702-AP, 41.7 mg/kg, —△— Br-8702-AP, 125 mg/kg, —○— Br-8702-AP, 375 mg/kg, —■— are-A, 13.9 mg/kg, —▲— are-A, 41.7 mg/kg, —×— are-A 125 mg/kg, —□— 0.5%CMC

kg/day, 125 mg/kg/day 투여로 감염 후 9일에 1마리씩 사망, 375 mg/kg/day 투여로는 감염 후 4일과 9일에 1마리씩 사망하였다. 한편 ara-A 투여군은 125 mg/kg/day 투여로 모든 mouse가 실험 종료일까지 생존하였으나, 41.7 mg/kg/day 투여군은 감염 후 3일에 2마리, 13.9 mg /kg/day 투여군은 감염 후 9일에 3마리가 사망하였다. (Fig. 3.)

각군의 생존수와 생존율은, ara-A 투여군은 125 mg/kg/day 투여로 7/7, 100%, 41.7 mg/kg/day 및 13.9 mg /kg/day 투여로는 각각 5/7, 71.4%, 4/7, 57.4%로 dose dependent response가 보였다. BR-8702-AP 투여군은 41.7 mg/kg/day, 125 mg/kg/day 투여로 양쪽군 모두 6/7, 85.7% 였으나, 375 mg/kg/day 투여로는 5/7, 71.4%로 독성의 발현이 있지 않나 사료된다.

이상의 경구투여에 의한 비교결과, BR-8702-AP는 HSV-1의 mouse 실험감염증에서 ara-A와 동등한 활성을 보였다.

BR-8702-AP 및 ara-A 투여에 의한 HSV-1의 pathogeni-city 변화

HSV-1을 비강으로 감염시켰을때, 감염초기에 폐내에서 증식한 virus양(Fig. 4B)은 각 약제투여군간에 차가 없었다. 비강으로 감염된 후 일단 증식하여 감염 후 7일까지 폐안에 존재하였다. 뇌내에는 감염 후 5일에 control군에서 virus가 검출되었으며, 6일부터는 약제 투여군에서도 검출되었다(Fig. 4C). Control군은 감염 후 6일

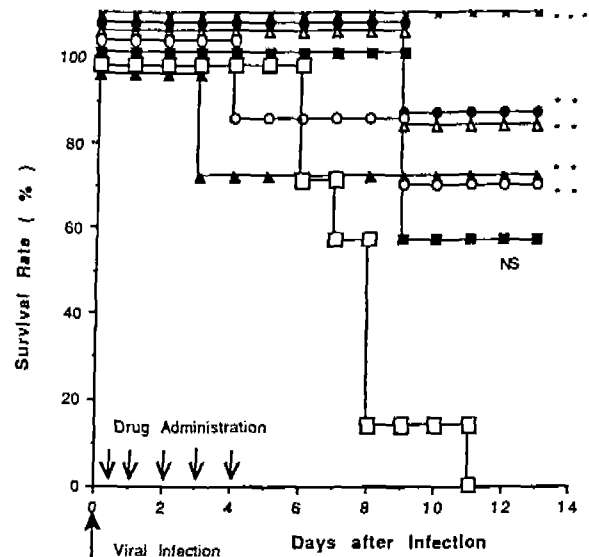


Fig. 3. Effect of multiple oral doses of BR-8702-AP and ara-A on survival rate. 700 PFU/mouse of HSV-1 was infected intranasally to BALB/c mice. The drugs were administrated once daily for 5 consecutive days. ***, p<0.001, **, p<0.01. n=7. —■— ara-A, 13.9 mg/kg, —▲— ara-A, 41.7 mg/kg, —×— ara-A, 125 mg/kg, —●— BR-8702-AP, 41.7 mg/kg, —△— BR-8702-AP, 125 mg/kg, —○— BR-8702-AP, 375 mg/kg, —□— 0.5%CMC

에 virus양이 peak에 달하였으며 1.2×10^4 PFU/g가 검출되었다. Ara-A 투여군은 감염 후 7일에 85.828 PFU/g, BR-8702-AP 투여군은 감염 후 8일에 696 PFU/g가 검출되었다. 폐안과 뇌안의 virus양을 비교해 보면 폐안에서 증식한 virus가 감소하기 시작한 때에 뇌안에서 virus가 늘어나기 시작하였다. 한편 혈청중의 감염성의 virus는 이 assay계에서 검출되지 않았다(Fig. 4A).

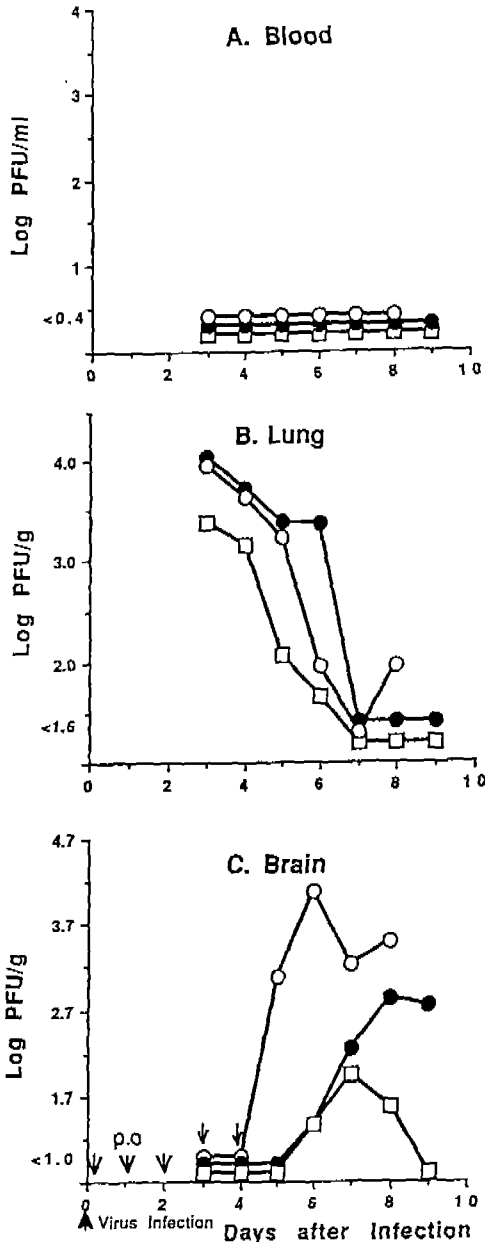


Fig. 4. Effect of BR-8702-AP and ara-A on the viral growth of HSV-1 in blood(A), lung(B) and brain(C) of HSV-1 infected BALB/c mice intranasally(700 PFU/mouse). 125 mg/kg dose of ara-A or BR-8702-AP was administrated p.o. once daily for 5 consecutive days. —□— ara-A, 125 mg/kg, —●— BR-8702-AP, 125 mg/kg, —○— Control

고찰

단순 herpes 바이러스·감염증은 Morishima, 1989에 의하면 초 감염 증상으로서 치육구내염, herpes 뇌염, 수막염, 각막염 등이 있으며 재발감염증으로는 구진 herpes, herpes 뇌염, 각막염 등이 있다고 하였고, herpes 뇌염의 발병기전에 대해 Williams, 1978 등은 HSV-1이 신경절을 따라서 중추 신경 조직에 들어가는데 비강 점막의 취각 신경으로부터 취구를 매개로 직접 대뇌 측두엽에 침입하거나 ganglion semilunare에 잠재해있던 HSV-1이 활동을 시작해 뇌간의 신경핵을 매개로 올라가 측두엽에 도달하는 두가지 경로에 의한다고 하였다.

또한 Sekizawa와 Openshow, 1984 등은 cyclophosphamide 등 면역 억제제 특히 T 세포를 중심으로한 세포성 면역 억제제를 투여하면 신경절에 잠재해있던 HSV-1이 재활성화되어 신경절과 뇌조직에서 HSV-1의 검출율이 높아진다고 말하고 있다. 한편 Nii, 1989는 *in vitro*에서 HSV-1의 재활성화제로서 n-butyrate를 언급하면서 prednisone은 아니나 steroid로서 cortison과 prostaglandin 등은 HSV-1의 재활성화에 특별한 관련이 없다고 보고한바 있다.

이상 보고된 바와 같이 herpes뇌염은 herpes감염증에 있어서 치사율을 높이는데 중요한 역할을 하고 있다 하겠는바 항 HSV-1 약제의 효과검색에 있어서 뇌에서의 HSV-1 증식 혹은 뇌로의 HSV-1의 transmission을 억제하는 약물을 검색하는것이 중요하다 하겠다. 한편 본 실험에서 나타난 결과를 고찰해보기 위해 mouse의 사

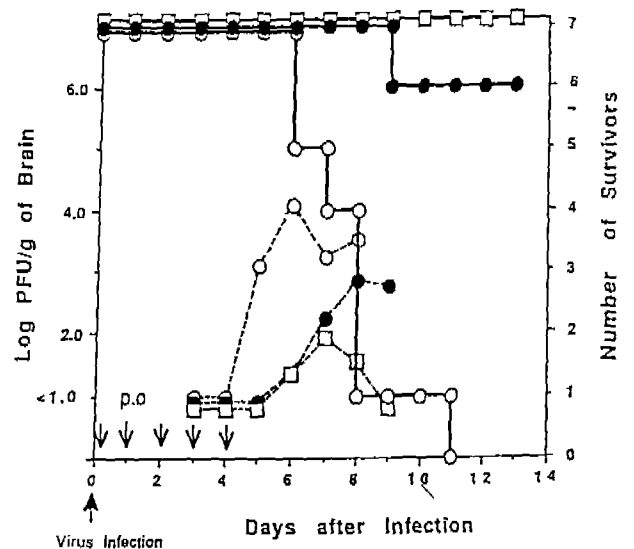


Fig. 5. Effect of BR-8702-AP and ara-A on the viral growth and survival rate. 700 PFU/mouse of HSV-1 was infected intranasally to BALB/c mice and 125 mg/kg dose of ara-A or BR-8702-AP was administrated p.o. once daily for 5 consecutive days. —□— ara-A, 125 mg/kg, —●— BR-8702-AP, 125 mg/kg, —○— Control

망과 뇌내의 virus양과의 관계를 Fig. 5에 표시하였다. Control 군의 경우 감염 후 6일부터 사망하기 시작하였는데 이는 뇌내에 늘어난 virus에 의해서 발생한 것이며, BR-8702-AP, 125 mg/kg 투여군의 감염 후 9일에 한마리 사망한것도 뇌내의 virus 증식에 의한 것으로 사료되어진다. ara-A 및 BR-8702-AP의 이러한 감염계에 대한 연명효과는 뇌내의 HSV-1의 증식에 의한 뇌척수염의 발생 저지라고 추찰 되어진다.

참고문헌

- Andrewes, C., Snider, M. and Stubbs, G. (1967). Studies on the virulence of herpes simplex viruses isolated from different clinical entities. *Pediat. Res.* **1**, 209-210.
- Chadwick, R.G. (1978). HBs Ag-positive chronic liver disease: Inhibition of DNA polymerase activity by vidaravine. *Brit. Med. J.* **2**, 531-533.
- Chung Il Hong., Alan J. Kirisits, Charles R. West and David J. Buchheit. (1984). Nucleoside conjugate V: Synthesis and biological activity of 9-(β -D-arabinofuranosyl)adenine conjugate of corticosteroids. *J. Pharm. Sci.* **73**, 278-280.
- Dulbecco, R. and Ginsberg, H.S. (1980). *Viology*. Second Edition, J.B. Lippincott company press. philadelphia. 17-25.
- Elion, G.B., Furman, P.A., de Milanda, P., Beauchamp, L. and Schaeffer, H.J. (1977). Selectivity of action of antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5716-5720.
- Hinuma, Y. (1989). Special, the group of herpes virus and disease; foreword. *The Saishin-Igaku* **44**, 2-7
- Jones, A.S., Verhelst, G. and Walker, R.T. (1979). The synthesis of the potent antiherpes agent, E-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine, and related compounds. *Tetrahedron Lett.* **45**, 4415-4418.
- Keizo Matsumoto, Yoshio Uzuka. (1987). The combination chemotherapy of antibiotics and corticosteroids in severe infection disease. *Kagaku Ryohou no Ryouiki.* **3**, 14-18.
- Kern, E.R., Richards, J.T., Overall, J.C. and Glasgow, L.A. (1978). Alteration of mortality and pathogenesis of three experimental Herpesvirus hominis infection of mice with adenine arabinoside 5'-monophosphate, adenine arabinoside, and phosphono acetic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**, 53-60.
- Lee, W.W., Denitez, A., Goodman, L. and Baker, B.R. (1960). Potential anticancer agents. XL. Synthesis of the β -anomer of 9-(D-arabinofuranosyl)-adenine. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 2648-2649.
- Morishima, T. (1989). Special, the group of herpes virus and disease; treatment of herpesvirus infections. *The Saishin-Igaku* **44**, 94-99.
- Pavan-Langston, D. and Dohlman, C.H. (1974). A double blind clinical study of adenosine arabinoside therapy of viral Keratoconjunctivitis. *Am. J. Ophthalmol.* **74**, 81-88.
- Perrillo, R.P. (1985). Comparative efficacy of adenine arabinoside 5'-monophosphate and prednisone withdrawal followed by adenine arabinoside 5'-monophosphate in the treatment of chronic active hepatitis type B. *Gastroenterology.* **88**, 780-786.
- Plunkett, W. and Cohen, S.S. (1977). Increased toxicity of 9- β -D-arabinofuranosyl-adenine in the presence of an inhibitor of adenosine deaminase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **284**, 91-102.
- Pollard, R.B. (1978). Effect of vidarabine on chronic hepatitis B virus infection. *JAMA.* **239**, 1648-1650.
- Prusoff, W.H. (1959). Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine. *Biochem. Biophys. Acta* **32**, 295-296.
- Schaeffer, H.J., Beauchamp, L., de Milanda, P., Elion, G.B., Bauer, D.J. and Colis, P. (1978). 9-(2-hydroxy ethoxymethyl) guanine activity against viruses of herpes group. *Nature* **272**, 583-585.
- Sekizawa, T. and Openshaw, H. (1984). Encephalitis resulting from reactivation of latent herpes simplex virus in mice. *J. virol.* **50**, 263-266.
- Shiota, H. (1985). Therapeutic problem in viral Keratoconjunctivitis. *Therapeutic Research* **2**, 639-642.
- Shiro Nii. (1989). Latent herpes simplex virus infectin. *The Saishin-Igaku* **44**, 88-93.
- Sloan, B.J. and Miller, F.A. (1973). Treatment of herpes simplex virus type 1 and 2 encephalitis in mice with 9- β -D-arabinofuranosyl-adenine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **3**, 74-80.
- Wellings, P.C. and Awdry, P.N. (1972). Clinical evaluation of trifluorothymidine in the treatment of herpes simplex corneal ulcers. *Am. J. Ophthalmol.* **73**, 932-942.
- Whitley, R.J., Alford, F. Hess. and R. Buchanan. (1980). Vidarabine: a preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs* **20**, 267-282.
- Whitley, R.J., Soong, S.-J., Hirsch, M.S., Karchmer, A.W., Dolin, R., Galasso, G., Dunnich, J.K., Alford, C.A. and the NIAID Collaborative Antiviral Study Group. (1981). Herpes simplex encephalitis, vidarabine therapy and diagnostic problems. *New. Eng. J. Med.* **304**, 313-318.
- Williams, B.W., Lerner. A.M. (1978). Some previously unrecognized features of herpes simplex virus encephalitis. *Neurology* **28**, 1193-1196.