



ПЕПТИДНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ КАРБОЦИКЛОВ КАК ИНГИБИТОРЫ ФУНКЦИИ ВИРОПОРИНОВ РНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ

© 2017 г. В. А. Шибнев, П. Г. Дерябин, Т. М. Гараев[#], М. П. Финогенова, А. Г. Ботиков, Д. В. Мишин

Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «ФНИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, ул. Гамалеи 18

Поступила в редакцию 02.09.2016 г.

Принята к печати 10.04.2017 г.

Синтезированы новые карбоциклические производные аминокислот, пептидов и других соединений и исследована их противовирусная активность в отношении вирусов гриппа А/Н5N1 и гепатита С *in vitro*. Продемонстрировано, что аминокислотные производные аминокислот адамантана обладают способностью подавлять репликацию высоковирулентного штамма вируса гриппа А птиц (Н5N1), резистентного к аминокислотам адамантана амантадину и римантадину. Исследовано влияние конфигурации карбоциклического фрагмента в составе производного дипептида Н-Pro-Trp-OH на противовирусные свойства в отношении вируса гепатита С (ВГС). *N*-Циклогексилоксикарбонильное производное дипептида Н-Pro-Trp-OH активно подавляло репликацию ВГС *in vitro*. У некоторых соединений была выявлена высокая вирулицидная активность в отношении вирусных частиц гриппа А/Н5N1 или ВГС.

Ключевые слова: вирус гриппа А/Н5N1, производные адамантана, пептиды, вирус гепатита С, противовирусная активность.

DOI: 10.7868/S0132342317050153

ВВЕДЕНИЕ

Функции белков вирусных ион-селективных каналов вовлечены во многие этапы репликационного цикла вируса. Эти каналы локализуются в вирусной оболочке или мембранах клетки хозяина и играют важную роль в процессе проникновения вирусов в клетку, а также в сборке и выходе вновь образовавшихся вирионов. Вирусные ионные каналы не всегда требуются для воспроизводства вируса, хотя их содействие обычно значительно увеличивает рост числа вирионов. Это семейство белков получило название виропорина (*virogins*), оно включает в себя белки, которые содержат, по меньшей мере, один гидрофобный трансмембранный (ТМ) домен, в виде α -спирали [1]. Как правило, виропорина представлены небольшими белками (50–120 а.о.), которые имеют

тенденцию к образованию гомоолигомеров. Исследования молекулярной архитектуры вирусных ионных каналов показали, что большинство из них образованы тетрамерами, хотя пента- и гексамерные структуры для виропорина также характерны. Типичным представителем тетрамерных ион-селективных виропорина является канал М2 вируса гриппа А. Этот уникальный виропорин специфичен к транспорту ионов водорода внутрь вириона, в то время как большинство виропорина демонстрируют умеренную ионную селективность, то есть не отличаются предпочтением к какому-то конкретному иону. Пентамерный виропорин, представленный белком Vpu из ВИЧ-1, показывает умеренную катионную избирательность в растворах электролитов NaCl и KCl [2]. Это справедливо и для гексамерного виропорина р7 ВГС, который переносит одновалентные катионы (Na^+ и K^+) [3].

Высокая ионная селективность виропорина М2 вируса гриппа А обусловлена особым строением его ТМ-домена, который содержит остатки гистидина в положении 37 (His37) в виде тетрамерного сопряжения их имидазольных колец. Протоны из окружающей среды (внутриклеточной) протонируют три или все четыре имидазольных кольца гистидинов. Это приводит к конфор-

Сокращения: Amt – 1-аминоадамантан; Ad – 1-адамантанкарбонная кислота; Cho – циклогексилоксикарбонная кислота; IBCF – изобутилхлорформиат; Met(O₂) – метионинсульфон; Nor – 2-норборненовая кислота; Nrb – 2-норборнановая кислота; NMM – *N*-метилморфолин; Rim – римантадин (1-(1-адамантил)этиламин гидрохлорид); TEA – 3-(2-тиенил)пропеновая кислота; Tha – 2-тетрагидрофурановая кислота; Qln – хинолин-2-карбонная кислота; ВГС – вирус гепатита С.

[#] Автор для переписки (тел.: +7 (499) 190-30-43; эл. адрес: tmgaraev@gmail.com).

мационному изменению в результате электростатического отталкивания, что расширяет канал в районе His37 и позволяет протонам проникнуть внутрь оболочки вируса [4]. Индолная группа остатка триптофана-41 играет важную роль в стабилизации открытого состояния поры канала. Таким образом, молекулярная модель работы ионного канала M2 представляет собой “шлюзовой механизм” [5].

Препарат амантадин (Symmetrel, 1-адамантил-амин гидрохлорид) был одним из первых изученных ингибиторов протонного канала M2 вируса гриппа А. Он использовался в клинической практике против вируса гриппа А с 1966 г. [6]. Позднее, в 1985 г. было показано, что некоторые мутации в гидрофобной последовательности белка M2 могут приводить к резистентности вируса к амантадину и его аналогу римантадину (Flumantadine, 1-(1-адамантил)этиламин гидрохлорид). Эти данные позволили предположить, что белок M2 может быть мишенью для препаратов адамантанового ряда [7], а в 1992 г. эти предположения были подтверждены [8].

Недавние исследования показали, что ионная активность гексамерного канала белка p7 ВГС также может быть ингибирована препаратами адамантанового ряда *in vitro* [9, 10]. Это дает надежду, что канал p7 может быть хорошей мишенью для анти-ВГС-препаратов на основе адамантана. Неструктурный белок p7 ВГС состоит из 63 а.о. и имеет два трансмембранных домена (TM1 и TM2) [11]. Этот виropорин, локализу-

ющийся преимущественно во внутриклеточных мембранах, в опытах *in vitro* демонстрирует функцию ионных каналов, необходимых для сборки вируса и оптимального выхода из инфицированных клеток путем изменения кислотно-щелочного равновесия внутриклеточных везикул. Мембранный белок p7 представляет собой новую мишень для противовирусной терапии ВГС [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Устойчивость вируса к амантадину и римантадину является следствием произошедшей мутации в аминокислотной последовательности белков в протонном канале M2 вируса гриппа А. Нужно отметить, что препараты римантадин и амантадин имеют перекрестную резистентность. Одним из путей восстановления противовирусных свойств препаратов адамантана является внесение в их структуру дополнительных функционально активных групп. В настоящей работе в качестве источника таких групп были предложены замещенные аминокислоты, пептиды и 3-(2-тиенил)пропеновая кислота. К молекулам римантадина или амантадина, имеющим одну аминогруппу, остатки аминокислот и пептидов можно присоединять методом смешанных ангидридов [13, 14].

В результате нами был синтезирован ряд производных адамантана и некоторых других карбоциклов, таких как норборнен, циклогексан и хинолин-2-карбоновая кислота (схема 1):

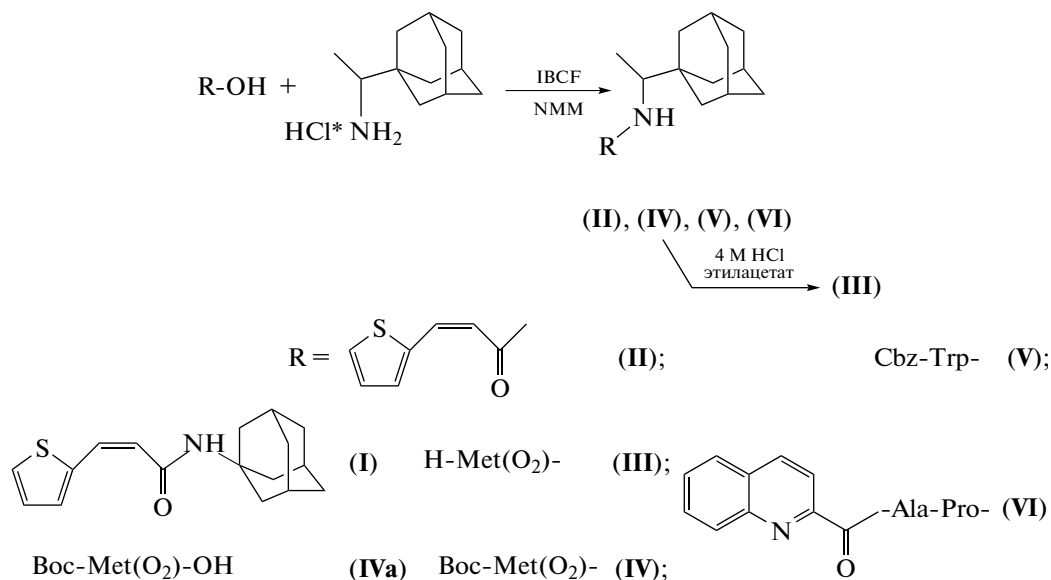


Схема 1. Общая схема синтеза производных римантадина. Соединение (I) получено аналогично, но с использованием в качестве аминокомпонента 1-аминоадамантина вместо римантадина.

Таблица 1. Противовирусные свойства соединений в отношении инфекции, вызванной высокопатогенным вирусом гриппа А/Н5N1

Время внесения соединений	Показатели действия соединений	Действующая концентрация (мкг/мл) для соединений:						
		(I)	(II)	(III)*	(IV)*	(V)*	(VI)	римантадин гидрохлорид
За 6 ч до заражения	ЦД ₅₀	>6.25	>50.0	25.0	100.0	100.0	>12.5	>12.5
	ИД ₅₀	0.2	1.56	<3.12	0.2	0.2	<1.56	>12.5
	ИД ₉₅	0.4	3.12	3.12	0.4	0.4	1.56	>12.5
В момент заражения клеток	ЦД ₅₀	>6.25	>50.0	>50.0	>25.0	>100.0	>25.0	25.0
	ИД ₅₀	0.4	<6.25	<3.12	0.4	0.4	1.56	>25.0
	ИД ₉₅	0.8	6.25	3.12	0.8	0.8	3.12	>25.0
Через 6 ч после заражения клеток	ЦД ₅₀	>12.5	>50.0	50.0	100.0	>100.0	>12.5	25.0
	ИД ₅₀	6.25	<6.25	12.5	<6.25	0.8	1.56	25.0
	ИД ₉₅	12.5	1.56	25.0	12.5	1.56	3.12	50.0

* Эксперимент проведен в клеточной культуре СПЭВ.

ИД₅₀ – ингибирующая доза 50: минимальное разведение препарата, вызывающее защиту 50% клеток монослоя.

ЦД₅₀ – цитотоксическая доза 50: разведение соединения, вызывающее гибель 50% клеток монослоя.

ИД₉₅ – минимальная концентрация соединений, вызывающая защиту 95% клеток.

N-[3-(2-тиенил)пропеноил]-(1-адамантил)амид (TEA-Amt (I));

N-[3-(2-тиенил)пропеноил]-1-адамантаилэтиламин (TEA-Rim (II)); метионил(диоксид)-(1-адамантаилэтил)амида гидрохлорид (HCl*Met(O₂)-Rim (III));

N-Вос-метионил(диоксид)-(1-адамантаилэтил)амид (Вос-Met(O₂)-Rim (IV));

N-Z-*L*-триптофил-(1-адамантилэтил)амид (Z-Trp-Rim (V));

хинальдин-2-оил-*L*-аланил-*L*-пролил-(1-адамантилэтил)амид (Qln-Ala-Pro-Rim (VI))

В работе противовирусная активность этих соединений была оценена *in vitro* с использованием высокопатогенного штамма вируса гриппа птиц А/Н5N1, резистентного к действию римантадина, на клеточных моделях культур клеток почки зеленой мартышки (Vero-E6) и клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ).

Противовирусная активность синтезированных соединений в отношении вируса A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1). Противовирусная активность соединения, как правило, включает как его вирулицидные, так и противовирусные свойства, т.е. способность ингибировать ту или иную стадию репликации вируса – от адсорбции вируса на клетке, его проникновения в клетку до влияния на сборку и выход вируса из зараженной клетки. Поэтому противовирусную активность исследуемого вещества проверяют путем обработки им монослоя клеток до заражения вирусом (профилактический эффект соединения), в момент заражения (лечебно-профилактический эффект) и

через определенный интервал времени после заражения (лечебный эффект). Противовирусный эффект соединения оценивается по доле жизнеспособных инфицированных клеток. В опыте изучали жизнеспособность (% выживших клеток) Vero-E6 (или СПЭВ), инфицированных высоковирулентным штаммом вируса гриппа A/Duck/Novosibirsk/56/06 (H5N1) при различных схемах введения синтезированных соединений.

Из данных табл. 1 видно, что производное римантадина с тиенилпропеновой кислотой (II) эффективно защищало монослой клеток Vero-E6 во всех схемах внесения соединения: ИД₅₀ < 0.8 мкг/мл для схем до инфицирования и одномоментного введения и ИД₅₀ = 6.25 мкг/мл для лечебной схемы введения. Почти так же эффективно во всех схемах внесения производное амантадина с 3-(2-тиенил)пропеновой кислотой (I), ИД₅₀ = 1.56 мкг/мл для профилактической схемы и менее 6.25 мкг/мл в лечебно-профилактической и лечебной схемах.

Противовирусную активность синтетических соединений (III), (IV) и (V) оценивали по их способности защищать монослой СПЭВ от цитопатического воздействия вируса. Соединения были высоко эффективны при внесении в профилактической и лечебно-профилактической схемах. Для соединений (III) и (V) ИД₅₀ составила менее 0.8 мкг/мл, а для (IV) – менее 3.12 мкг/мл. При внесении этих соединений в лечебной схеме ингибирующая способность уменьшалась.

N-Хинальдиноилпроизводное Rim-амида дипептида (VI) эффективно защищало клетки Vero-

Таблица 2. Вирулицидные свойства синтезированных соединений (I)–(VI) в отношении высокопатогенного вируса гриппа А/Н5N1

Показатель	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)	Римантадин гидрохлорид
IgТЦИД ₅₀ /0.2 мл	0	0	7.0	4.8	2.9	8.0	8.5
Ig снижения инфекционной активности	7.7	6.6	1.5	3.7	4.1	0.5	0
Без препарата (контроль)	7.7	6.6	8.5	8.5	7.0	8.5	8.5

IgТЦИД₅₀ – выражение инфекционного титра вируса для культур клеток – минимальное разведение вируса, вызывающее гибель 50% клеток монослоя, выраженное в десятичном логарифме.

Е6 во всех схемах внесения соединения: ИД₅₀ составило 1.56 мкг/мл в лечебно-профилактической схеме и несколько менее в профилактической и лечебной схемах.

Вирулицидная активность соединений в отношении вируса A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1). Вирулицидная активность соединения связана с прямым инактивирующим действием на вирионы в составе вирусной популяции, в результате чего частично или полностью утрачивается инфекционная активность вируса. Чтобы проверить вирулицидные свойства соединения достаточно провести инкубацию смеси вируса и соединения в течение определенного времени, после чего проверить инфекционные свойства вируса без исследуемого соединения методом титрования в культурах клеток. Титр вируса для культур клеток – минимальное разведение вируса, вызывающее гибель 50% клеток монослоя, выраженное в десятичном логарифме (IgТЦИД₅₀). Достоверное снижение инфекционной активности вируса в шкале десятичных логарифмов на 1.0 и более или ее полная утрата по сравнению с вирусом без вещества свидетельствует о проявлении вирулицидной активности исследуемого соединения. Вирулицидная активность синтетических соединений проиллюстрирована в табл. 2.

Из данных табл. 2 легко видеть, что соединения (I) и (II) обладают высокой вирулицидной активностью. При контакте вирусосодержащего материала с соединениями в течение 20 мин происходила полная утрата инфекционной активности вируса. Также высоким вирулицидным эффектом обладает соединение (V): снижение инфекционного титра составило четыре и более логарифмических единиц (10000 раз) по отношению к вирусному контролю IgТЦИД_{50/0.2} = 7.0 (из расчета на 200.0 мкл вирусосодержащего материала). Соединение (IV) обладает умеренной вирулицидной активностью, снижение инфекционного титра составило около четырех единиц (10000 раз) по отношению к вирусному контролю (IgТЦИД_{50/0.2} = 7.7). Вирулицидное действие соединения (III) было значительно слабее. Вирулицидных свойств у соединения (VI) обнаружить не удалось, снижение инфекционного титра составило менее одной логарифмической единицы.

Противовирусная активность производных дипептида Н-Pro-Trp-OH в отношении инфекции, вызванной ВГС в разных схемах введения. Ранее нами было показано, что пептидные производные адамантанового карбоцикла римантадина способны ингибировать репликацию ВГС *in vitro* [15]. Эти соединения представляли собой Вос-лизин, связанный с карбоциклом адамантана через спейсер из остатков глицина (от одного до трех в цепочке). Наибольшей активностью обладало соединение с тремя остатками глицина в спейсере – Вос-Lys(Вос)-Gly₃-Rim.

Как показали исследования, проведенные *in silico*, в подавляющем большинстве моделей Вос-Lys(Вос)-Gly₃-Rim связан с несколькими цепями ионного канала р7. Для моделирования взаимодействия этого лиганда с белком-мишенью р7 была использована программа Patchdock v. 1.3 Molecular Docking Algorithm (BioInfo3D), позволяющая проводить процесс докинга молекул *in silico*. Модель канала р7 получена из открытой базы данных 3D-структур белков Protein Data Bank (код структуры 2M6X), структура лиганда была сгенерирована методами молекулярного моделирования с использованием программного продукта HyperChem v. 8.0.0 (Hypercube, Inc.) (рисунков в, з). Эта модель была построена полуэмпирическим методом кванто-механического расчета РМЗ.

Результаты решения, представленные на рисунке, показывают, что образуются четыре точки связывания с аминокислотными остатками белков вирусного канала. Всего в белке 6 цепей (была использована гексамерная модель) и 4 из них участвуют в докинге, а именно: взаимодействуют остатки His57 от разных цепей, остаток His17 с α-аминогруппой лизина и остаток Gly22 с метильной группой римантадина. Остатки гистидина очень важны для действия ионного канала, они отвечают за селективность ионной помпы и однонаправленность потока ионов [4]. Соединение Вос-Lys(Вос)-Gly₃-Rim имеет изогнутую структуру, и эта стереометрия и длина спейсера из остатков глицина по-видимому способствуют образованию стабильного комплекса молекулы ингибитора с белком-мишенью.

В настоящей работе была предпринята попытка исследования влияния карбоциклического

остова пептидного производного на его способность ингибировать репликацию ВГС *in vitro*. В исследовании были использованы карбоциклические карбоновые кислоты: 1-адамантанкарбоновая (Ad-OH), 2-норборненовая (Nor-OH), 2-норборнановая (Nrb-OH), хиалин-2-карбоновая (Qln-OH), 2-тетрагидрофурановая (Tha-OH) и циклогексилкарбоновая (Cho-OH). Этими кислотами методами классического пептидно-

го синтеза в растворе был ацилирован дипептид Н-Pro-Trp-OH (схема 2). Конструкция дипептида была выбрана не случайно: уникальные электронные свойства индольной группы триптофана в сочетании с конформационными особенностями остатка пролина должны были создать многофункциональную группировку вкупе с гидрофобными свойствами карбоцикла.

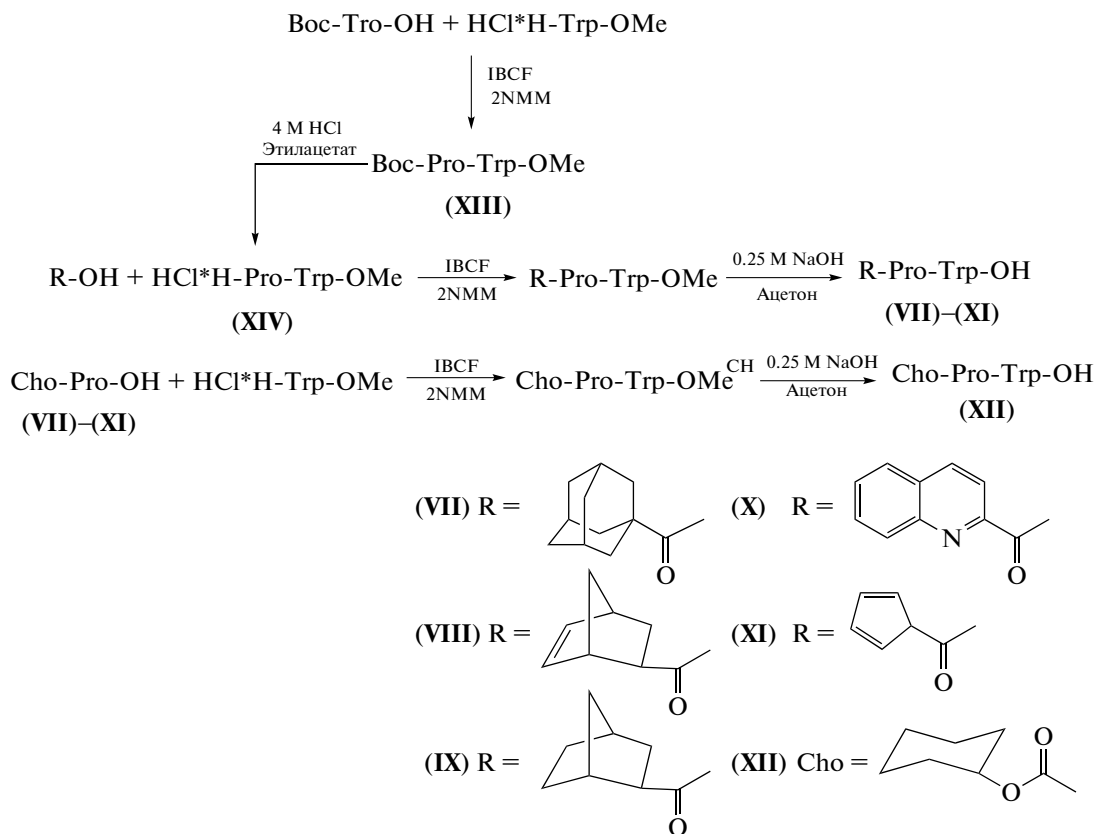
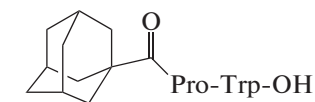
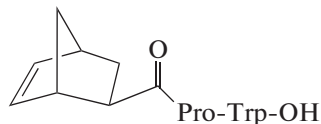


Схема 2. Общая схема синтеза карбоциклических производных дипептида Н-Pro-Trp-OH. Соединение (XII) было получено, исходя из Cho-Pro-OH (см. exper. часть).

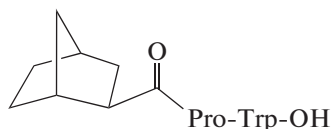
Таким образом, были получены следующие соединения:



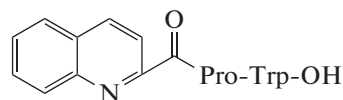
Ad-Pro-Trp-OH (VII)



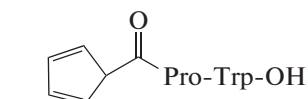
Nor-Pro-Trp-OH (VIII)



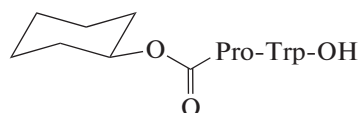
Nrb-Pro-Trp-OH (IX)



Qln-Pro-Trp-OH (X)

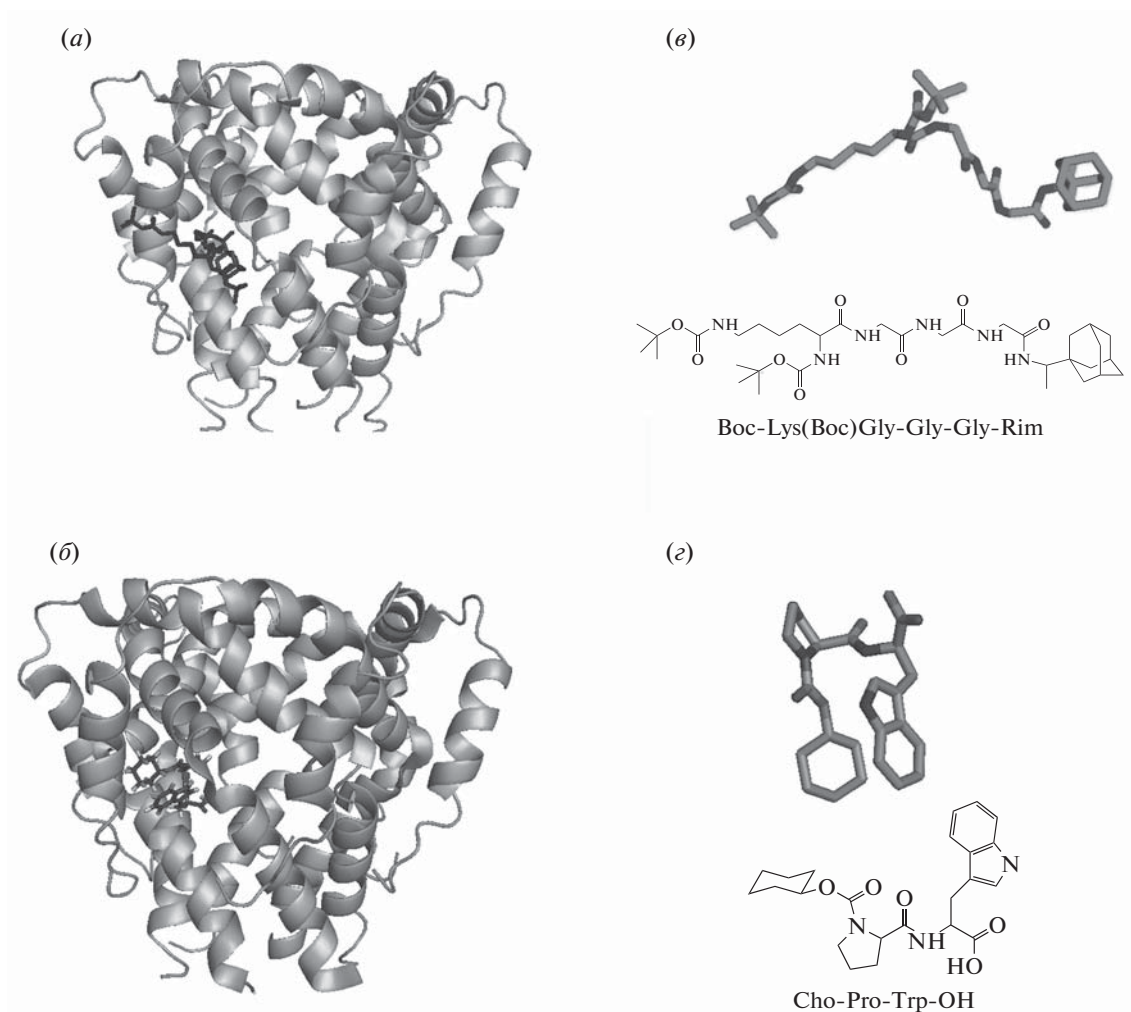


Tha-Pro-Trp-OH (XI)



Cho-Pro-Trp-OH (XII)

Из табл. 3 можно видеть, что все соединения были не эффективны или слабо эффективны в лечебной схеме внесения соединений. В профилакти-



Молекулярные модели ингибиторов Boc-Lys(Boc)-Gly₃-Rim [15] (в) и Cho-Pro-Trp-OH (г) и их комплексов с белковым гексамерным каналом p7 ВГС (соответственно (а) и (б)).

тической и лечебно-профилактической схемах внесения вируса и соединений выделяется лишь одно сочетание карбоцикла с дипептидом Cho-Pro-Trp-OH (XII). ИД₅₀ составляла 0.3; 0.6 и 12.0 мкг/200 мкл соответственно схеме внесения. Среди остальных соединений также можно отметить производное Ad-Pro-Trp-OH (VII) с ИД₅₀ 1.2; 5.0 и 5.0 мкг/200 мкл соответственно схеме внесения.

Попытки усовершенствовать соединение (XII) путем замены остатка *L*-триптофана на остатки *L*-аланина, *L*-цистеина или *L*-лизина привели к потере активности соединения, так же как и попытка введения спейсера из остатков глицина (от одного до трех остатков) между циклогексилоксикарбонильным остатком и дипептидом Н-Pro-Trp-OH.

В итоге было проведено сравнение противовирусной активности соединения (XII) с результатами, ранее полученными для адамантилэтил-

амида тетрапептида – Boc-Lys(Boc)-Gly₃-OH [15] (табл. 4).

Из данных табл. 4 можно заключить, что соединения Boc-Lys(Boc)-Gly₃-Rim и (XII), различающиеся по строению (рисунок в, г), обладают близкими значениями противовирусной активности в используемых схемах введения соединений. По результатам молекулярного докинга *in silico*, молекула соединения (XII) (аналогично расчетам для Boc-Lys(Boc)-Gly₃-Rim) была связана с несколькими спиралями белка p7 во внешней сфере проводящего канала (рисунок а, б). Возможно, присутствие карбоциклических соединений в межспиральном пространстве белка канала механически нарушает подвижность цепей для открытия или закрытия поры, что, в свою очередь, приводит к нарушению транспорта ионов. Это еще предстоит выяснить.

Таблица 3. Противовирусные свойства карбоциклических производных дипептида Н-Pro-Trp-OH в отношении инфекции, вызванной ВГС в разных схемах введения

Схема внесения соединений	Соединения	Показатели действия соединений (мкг/200 мкл)		
		ЦД ₅₀	ИД ₅₀	ИД ₉₅
За 6 ч до заражения клеток	(VII)	>10.0	1.2	2.5
	(VIII)	>10.0	2.5	5.0
	(IX)	>10.0	<10.0	10.0
	(X)	>10.0	2.5	10.0
	(XI)	>10.0	2.5	10.0
	(XII)	>10.0	<0.3	0.6
В момент заражения клеток	(VII)	>10.0	5.0	10.0
	(VIII)	>10.0	5.0	10.0
	(IX)	>10.0	5.0	10.0
	(X)	>10.0	<5.0	10.0
	(XI)	>10.0	5.0	10.0
	(XII)	>10.0	0.6	1.2
Через 6 ч после заражения клеток	(VII)	>10.0	5.0	10.0
	(VIII)	>10.0	>10.0	>10.0
	(IX)	>10.0	>10.0	>10.0
	(X)	>10.0	<5.0	10.0
	(XI)	>10.0	10.0	>10.0
	(XII)	>10.0	1.2	10.0

Обозначения те же, что и в табл. 1.

Таблица 4. Сравнение противовирусных свойств соединений Cho-Pro-Trp-OH (XII) и Boc-Lys(Boc)-Gly₃-Rim в отношении инфекции, вызванной ВГС в культурах клеток СПЭВ

Соединения и схема внесения в культуры клеток		Показатели активности соединений (в мкг/200 мкл)		
		ЦД ₅₀	ИД ₅₀	ИД ₉₅
За 24 ч до заражения	Boc-Lys(Boc)-Gly ₃ -Rim	>2.5	0.312	0.5
	(XII)	>2.5	0.312	1.0
В момент заражения клеток	Boc-Lys(Boc)-Gly ₃ -Rim	>2.5	0.156	1.0
	(XII)	>2.5	<0.5	0.5
Через 24 ч после заражения клеток	Boc-Lys(Boc)-Gly ₃ -Rim	>5.0	<0.5	0.5
	(XII)	>5.0	<0.5	0.5

Обозначения те же, что и в табл. 1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали рацемический гидрохлорид римантадина фирмы “Zhejiang Kangyu Pharmaceutical Co” (Китай), гидрохлорид амантадина, 3-(2-тиенил)пропенную, 2-норборненкарбонную, 2-норборнанкарбонную, хиолин-2-карбонную, 1-адамantanкарбонную, 2-тетрагидрофурановую кислоты, *N*-метилморфолин и *L*-аминокислоты фирмы “Sigma-Aldrich” (США); изобутилхлорформиат фирмы “Fluka” (Швейцария).

Все используемые для конденсации и удаления защитных групп растворители предварительно сушили и перегоняли по стандартным методикам. Идентификация полученных соединений осуществлялась ТСХ на пластинах Merck – Kieselgel 60 F(254) в системах: метанол–хлороформ, 13 : 60 (А), втор-бутанол–3% аммиак, 100 : 44 (Б), *n*-бутанол–уксусная кислота–вода–пиридин, 30 : 3 : 12 : 10 (В), позволяющих констатировать полное отсутствие в испытуемых образцах исход-

ных реагентов. Молекулярная масса была установлена на MALDI-TOF-времяпролетном масс-спектрометре Bruker UltraFlex II с программным обеспечением для сбора и обработки масс-спектров flexControl 1.1 и flexAnalys 2.2. ИК-спектры были получены на ИК-Фурье-спектрометре ИнфралЮМ ФТ-10. Температуру плавления измеряли на цифровом приборе SMP20 Stuart Scientific. Удельное оптическое вращение полученных соединений определяли в стандартных условиях на автоматическом поляриметре А1-ЕПЛ (1%-й раствор в этиловом спирте, длина кюветы 0.5 дм).

В работе использовали высоковирулентный штамм вируса гриппа А птиц (H5N1), выделенный во время эпизоотии среди домашних птиц в июле 2005 года в Новосибирской области — A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) [16]. Вирусы получены из Государственной коллекции вирусов (ГКВ) Института вирусологии им. Д.И. Ивановского “ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России. Вирусосодержащий материал представлял собой культуральную жидкость, собранную из зараженных вирусом А(H5N1) культур клеток СПЭВ на высоте развития цитопатических проявлений. Инфекционный титр штаммов вируса для культур клеток колебался в пределах от 5.5 до 6.0 lgТЦИД₅₀. В опытах использовали дозу вируса H5N1, равную 0.1 ТЦИД₅₀.

Вирус гепатита С, штамм Д-1, был получен из рабочей коллекции изолированных от больных гепатитом С цитопатогенных штаммов ВГС лаборатории ГКВ ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского “ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России. Вирусный материал представлял собой пробу культуральной жидкости, собранной из инфицированных культур клеток СПЭВ, содержащую ВГС, инфекционный титр которого составлял 7.0 lgТЦИД₅₀/мл для данного вида клеток.

Культуру клеток СПЭВ выращивали в виде двухдневного монослоя в 48-луночных пластиковых культуральных панелях в среде 199 (производство НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН) с добавлением 100 ед./мл пенициллина и 100 ед./мл стрептомицина и 10%-ной сыворотки крупного рогатого скота. Контроль культуральных клеток проводили с помощью светооптического микроскопа.

В опытах использовали чувствительную к репродукции вируса гриппа А/H5N1 клональную линию Vero-E6, рекомендованную ВОЗ в качестве субстрата для получения культуральных инактивированных вакцин. Культуры клеток Vero-E6 выращивали до полного монослоя в 96-луночных пластиковых планшетах с использованием ростовой среды Игла МЭМ (предприятие “ПанЭко”, Москва), соединенной с предварительно прогретой на водяной бане при 56°C в течение 20 мин 7% эмбриональной телячьей сывороткой (предприятие “ПанЭко”, Москва) при

37°C в атмосфере 5% CO₂ с добавлением глутамин и антибиотиков (100 ед./мл пенициллина и 100 ед./мл стрептомицина). Средой поддержки после адсорбции вируса служила среда Игла МЭМ, содержащая глутамин и антибиотики в той же концентрации и 1% сыворотки эмбриона телят (Sigma, США).

Образование пептидной связи проводили в одну стадию в эквимолярном соотношении в условиях реакции смешанных ангидридов (схема 1).

Вос-Met(O₂)-ОН (IVa). К раствору 1.0 г (5.5 ммоль) метионинсульфона и 0.22 г (5.5 ммоль) NaOH в 5.0 мл H₂O и 4.0 мл Bu^t-ОН при перемешивании при 45°C тремя порциями в течение 1 ч прибавляли 1.4 г (6.42 ммоль) Вос₂O. По окончании реакции отгоняли Bu^t-ОН, остаток разбавляли H₂O в 1.5 раза, промывали гексаном (15.0 мл × 3) и подкисляли раствором 1 М КНСO₄ до pH 3–3.5. Продукт выделяли экстракцией этилацетатом (15.0 мл × 4). Экстракт сушили безводным Na₂SO₄, растворитель удаляли в вакууме. Оставшееся масло самопроизвольно кристаллизовалось. Выход 1.37 г (88%); т. пл. 112°C; R_f 0.55 (А), 0.81 (Б), 0.78 (В); [α]_D²⁰ +8°.

Вос-Met(O₂)-Rim (IV). К 1.0 г (3.5 ммоль) соединения (IVa) в 25.0 мл смеси СНCl₃ и THF (1 : 1.5) прибавляли 0.40 мл (3.5 ммоль) NMM и, при перемешивании при –25°C, 0.47 мл (3.5 ммоль) ИВСФ. Перемешивали 10 мин и добавляли охлажденный до –20°C раствор 0.77 г (3.5 ммоль) гидрохлорида римантадина в 10.0 мл СНCl₃ с 0.40 мл (3.5 ммоль) NMM. Перемешивали 30 мин при –20°C, затем 1 ч при 0°C и 10 ч при 20°C. Растворитель удаляли в вакууме, остаток растворяли в 35.0 мл этилацетата и 10.0 мл H₂O и последовательно промывали 4.0 мл 0.25 М H₂SO₄, дважды по 10.0 мл 0.25 М КНСO₃ и 5.0 мл H₂O. Органический слой отделяли и сушили безводным Na₂SO₄. Этилацетат удаляли в вакууме, получали маслянистый продукт. Выход 1.31 г (83%); R_f 0.90 (А), 0.89 (Б), 0.91 (В); [α]_D²⁰ +7°; ИК ν(NH) при 3356 см^{–1} ν(C=O) 1668 см^{–1}; m/z найдено [M + Na]⁺: 465.22; [M + K]⁺: 481.185; вычислено M (C₂₂H₃₈N₂O₅S) 442.61.

НСI*H-Met(O₂)-Rim (III). К раствору 1.0 г (2.26 ммоль) соединения (IV) в 10.0 мл этилацетата при 5°C прибавляли 4.4 мл 4 М НСI в этилацетате. Реакционную смесь выдерживали в течение 1 ч при 20°C, периодически помешивая. Продукт осаждали и промывали эфиром. Остаток сушили в вакууме. Оставшееся масло при растирании в эфире кристаллизуется. Выход 0.85 г (96%); т.пл. 138–140°C; R_f 0.53 (А), 0.63 (В); [α]_D²⁰ +6; m/z: найдено [M + Na]⁺: 443.25; вычислено M (C₂₂H₃₈N₂O₅S) 442.61.

ТЕА-Amt (I) был получен аналогично (IV), исходя из 3-(2-тиенил)пропеновой кислоты и гид-

рохлорида амантадина. Выход 1.68 г (90%); R_f 0.90 (А), 0.81 (Б), 0.93 (В); ИК $\nu(\text{NH})$ при 3304 см^{-1} ; $\nu(\text{C}=\text{O})$ 1652 см^{-1} ; m/z : найдено $[M + \text{H}]^+$: 288.15; вычислено $M(\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NOS})$ 287.42 Да.

TEA-Rim (II) был получен аналогично (IV), исходя из 3-(2-тиенил)пропеновой кислоты и гидрохлорида римантадина. Выход: 1.98 г; (97%); R_f 0.90 (А), 0.83 (Б), 0.92 (В); ИК $\nu(\text{NH})$ при 3304 см^{-1} ; $\nu(\text{C}=\text{O})$ 1652 см^{-1} ; m/z : найдено $[M + \text{H}]^+$: 316.19; вычислено $M(\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{NOS})$ 315.47 Да.

Z-Trp-Rim (V) был получен аналогично (IV) исходя из Z-Trp-OH и гидрохлорида римантадина. Выход 1.31 г (83%); R_f 0.85 (А), 0.93 (Б), 0.69 (В); $[\alpha]_D^{20} +5^\circ$; ИК $\nu(\text{NH})$ при 3388 см^{-1} ; $\nu(\text{C}=\text{O})$ 1668 см^{-1} ; m/z : найдено $[M + \text{Na}]^+$: 522.34; вычислено $M(\text{C}_{31}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_3)$ 499.64 Да.

Qln-Ala-Pro-Rim (VI) был получен аналогично (IV), исходя из Qln-Ala-Pro-OH и гидрохлорида римантадина. Выход: 0.66 г (90.4%), т. пл. $145\text{--}147^\circ\text{C}$, R_f 0.81 (А), 0.92 (Б), 0.88 (В); $[\alpha]_D^{20} +16^\circ$. ИК $\nu(\text{NH})$ $3386, 3290 \text{ см}^{-1}$; $\nu(\text{CH})$ CH_3 -группы $2974, 2900, 2850 \text{ см}^{-1}$; $\nu(\text{C}=\text{O})$ $1675, 1628 \text{ см}^{-1}$; $\nu(\text{C}=\text{C})$ $1620\text{--}700 \text{ см}^{-1}$; m/z : найдено $[M + \text{H}]^+$: 503.33; вычислено $M(\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_3)$ 502.64 Да.

Ad-Pro-Trp-OH (VII). К раствору 0.34 г (0.69 ммоль) Ad-Pro-Trp-OMe в 10.0 мл ацетона прибавляли 16.0 мл (4.0 ммоль) 0.25 М NaOH. Выдерживали при 20°C в течение 45 мин. Ацетон удаляли в вакууме, водную фракцию подкисляли 10% лимонной кислотой до pH 4, продукт экстрагировали 20.0 мл этилацетата, и промывали водой (2×4 мл). Сушили безводным Na_2SO_4 . Этилацетат удаляли в вакууме до образования маслянистого продукта. Выход: 0.33 г (97%), R_f 0.59 (А), 0.47 (Б), 0.59 (В); $[\alpha]_D^{20} -23^\circ$. $\nu(\text{NH})$ при 3298 см^{-1} ; $\nu(\text{C}=\text{O})$ $1708, 1663$ и 1618 см^{-1} ; m/z : найдено $[M + \text{H}]^+$: 464.25; вычислено $M(\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_4)$ 463.56 Да.

Методом смешанных ангидридов аналогично (IV), исходя из соответствующих карбоциклических кислот и $\text{HCl}^*\text{H-Pro-Trp-OMe}$ (XIV) с последующим омылением эфирной группы, как это показано для (VII), были получены соединения (VII)–(XI) (Схема 2).

Nor-Pro-Trp-OH (VIII). Выход: 0.29 г (83%); R_f 0.42 (А), 0.47 (Б), 0.51 (В); $[\alpha]_D^{20} -8^\circ$; ИК $\nu(\text{NH})$ при 3368 и 3324 см^{-1} ; $\nu(\text{C}=\text{O})$ $1725, 1657$ и 1619 см^{-1} ; m/z : найдено $[M + \text{H}]^+$: 422.20; вычислено $M(\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4)$ 421.48 Да.

Nrb-Pro-Trp-OH (IX). Выход: 0.36 г (73%); R_f 0.45 (А), 0.53 (Б), 0.53 (В); $[\alpha]_D^{20} -8^\circ$; ИК $\nu(\text{NH})$ при 3305 см^{-1} ; $\nu(\text{C}=\text{O})$ $1707, 1652$ и 1620 см^{-1} ; m/z : найдено $[M + \text{H}]^+$: 424.22; вычислено $M(\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4)$ 423.50 Да.

Qln-Pro-Trp-OH (X). Выход: 0.25 г (47%); R_f 0.57 (А), 0.68 (Б), 0.57 (В); $[\alpha]_D^{20} -36^\circ$; ИК $\nu(\text{NH})$ при 3288 см^{-1} ; $\nu(\text{C}=\text{O})$ $1728, 1663, 1617 \text{ см}^{-1}$; m/z : найдено $[M + \text{H}]^+$: 457.19; вычислено $M(\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_4)$ 456.49 Да.

Tha-Pro-Trp-OH (XI). Выход: 0.28 г (93%); R_f 0.42 (А), 0.48 (Б), 0.51 (В); $[\alpha]_D^{20} -30^\circ$; ИК $\nu(\text{NH})$ при 3368 и 3324 см^{-1} ; $\nu(\text{C}=\text{O})$ $1726, 1659$ и 1618 см^{-1} ; m/z : найдено $[M + \text{H}]^+$: 394.17; вычислено $M(\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_4)$ 399.43 Да.

Cho-Pro-Trp-OH (XII) синтезировали аналогично (IV), исходя из Cho-Pro-OH, полученному по методике [17] и $\text{HCl}^*\text{H-Trp-OMe}$ с последующим омылением аналогично (VII). Выход: 1.05 г (91%); R_f 0.80 (А), 0.58 (Б), 0.60 (В); $[\alpha]_D^{20} -32^\circ$; ИК $\nu(\text{NH})$ при 3312 см^{-1} ; $\nu(\text{C}=\text{O})$ 1739 и 1675 см^{-1} ; m/z : найдено $[M + \text{H}]^+$: 428.21; вычислено $M(\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_5)$ 427.49 Да.

Woc-Pro-Trp-OMe (XIII) синтезировали аналогично (IV) исходя из Woc-Pro-OH и $\text{HCl}^*\text{H-Trp-OMe}$. Выход: 4.58 г (95%); R_f 0.89 (А), 0.88 (Б), 0.84 (В); $[\alpha]_D^{20} -41^\circ$; ИК $\nu(\text{NH})$ при 3397 и 3143 см^{-1} ; $\nu(\text{C}=\text{O})$ $1729, 1679 \text{ см}^{-1}$; m/z : найдено $[M + \text{H}]^+$: 417.16; вычислено $M(\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3)$ 415.48 Да.

HCl*H-Pro-Trp-OMe (XIV) получили аналогично (III). Выход: 0.21 г (96%); R_f 0.46 (А), 0.49 (Б), 0.57 (В); $[\alpha]_D^{20} -36^\circ$; ИК $\nu(\text{NH})$ при 3374 и 3196 см^{-1} ; $\nu(\text{C}=\text{O})$ $1741, 1679 \text{ см}^{-1}$; m/z : найдено $[M + \text{H}]^+$: 316.16; вычислено $M(\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3)$ 315.37 Да.

Противовирусная активность синтезированных соединений

Противовирусную активность изучали в трех схемах введения соединений в культуру клеток: за 6 ч до заражения клеток, в момент заражения и через 6 часов после заражения культур клеток Vero-E6 и СПЭВ. Множественность заражения клеток вирусами гриппа А/Н5N1 и вируса гепатита С составляла 0.1–0.01 ТЦИД₅₀/клетка. Соединения в концентрациях 100.0; 50.0; 25.0; 12.5; 6.25; 3.12; 1.56; и 0.8 мкг/мл вносили по 25.0 мкл в лунки 96-луночных панелей с монослоем клеток СПЭВ или Vero-E6, содержащих 200 мкл среды-поддержки. Культуры клеток, инфицированные вирусом и обработанные соединениями, инкубировали при 37°C в CO_2 -инкубаторе. Через 72 ч инкубации монослой клеток окрашивали метиленовой синькой, подсчитывали процент жизнеспособных клеток и используя цитометр фирмы “Инвитроген”, рассчитывали цитотоксический эффект (ЦД₅₀) – минимальную концентрацию препарата, которая вызывает гибель 50% клеток монослоя. Во второй части опыта, к 6-му дню после инфекции, когда в контрольных лунках при отсутствии соединений наступала полная деструкция клеток монослоя,

учитывали ингибирующую дозу (ИД₅₀) – концентрацию соединений, способных защитить 50% клеток монослоя от цитопатогенного действия вируса и ИД₉₅ – минимальную концентрацию соединений, способных защитить 95% и более клеток монослоя.

Исследование вирулицидной активности соединений. В опыте использовали растворы соединений с концентрацией 1.0 мг/мл в физиологическом растворе, которые смешивали с вирусом следующим образом: к 200.0 мкл раствора соединения добавляли 100.0 мкл вирусосодержащего материала в исходной концентрации (8.0 lgТЦИД_{50/0.2}). Экспозицию с вирусосодержащим материалом проводили при 24°C в течение 20 мин после чего титровали остаточную инфекционную активность вируса в каждом варианте опыта в культурах клеток СПЭВ. По разнице титров вируса в контрольных и опытных экспериментах судили о вирулицидной активности соединения – его способности подавлять инфекционную активность вирусов гриппа A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) или ВГС.

Таким образом, полученные результаты можно применить для других виропоринных таких как Vpu вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1), поробразующие белки 2В вируса полиомиелита и 6К альфавируса, белок Е коронавируса, Е5 из вируса папилломы или виропорина вируса бычьей диареи (BVDV) и других вирусных ионных каналов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gonzalez M.E., Carrasco L.* // *Viroporins*. FEBS Lett. 2003. V. 552. P. 28–34.
2. *Ewart G.D., Sutherland T., Gage P.W., Cox G.B.* // *J. Virol.* 1996. V. 70. P. 7108–7115.
3. *Premkumar A., Wilson L., Ewart G.D., Gage P.W.* // *FEBS Lett.* 2004. V. 557. P. 99–103.
4. *Gazzarrini S., Kang M., Abenavoli A., Romani G., Olivari C., Gaslini D., Ferrara G., Etten J.L., Kreim M., Kast S.M., Thiel G., Moroni A.* // *Biochem. J.* 2009. V. 420. P. 295–303.
5. *Okada A., Miura T., Takeuchi H.* // *Biochemistry.* 2001. V. 40(20). P. 6053–6060.
6. *Oxford J.S., Galbraith A.* // *Pharmacol. Ther.* 1980. V. 11. P. 181–262.
7. *Hay A.J., Wolstenholme A.J., Skehel J.J., Smith M.H.* // *EMBO J.* 1985. V. 4. P. 3021–3024.
8. *Kendal A.P., Klenk H.D.* // *Arch. Virol.* 1991. V. 119. P. 265–273.
9. *Griffin S.D., Beales L.P., Clarke D.S., Worsfold O., Evans S.D., Jaeger J., Harris M.P., Rowlands D.J.* // *FEBS Lett.* 2003. V. 535. P. 34–38.
10. *Griffin S., Stgelais C., Owsianka A.M., Patel A.H., Rowlands D., Harris M.* // *Hepatology.* 2008. V. 48. P. 1779–1790.
11. *Lin C., Lindenbach B.D., Prágai B.M.* // *J. Virol.* 1994. V. 68. P. 5063–5073.
12. *Griffin S.D.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 12567–12568.
13. *Шибнев В.А., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Шевченко Е.С., Бурцева Е.И.* // *Хим. фарм. журнал.* 2012. Т. 46. № 1. С. 3–4.
14. *Шибнев В.А., Гараев Т.М., Дерябин П.Г., Финогенова М.П., Ботиков А.Г., Мишин Д.В.* // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2016. Т. 161(2). С. 247–251.
15. *Шибнев В.А., Дерябин П.Г., Финогенова М.П., Гараев Т.М., Мишин Д.В.* Патент РФ RU 2524216 С1. 2014
16. *Львов Д.К., Шелканов М.Ю., Дерябин П.Г., Гребенникова Т.В., Прилипов А.Г.* Патент РФ RU 2309983 С1. 2005
17. *Порошин К.Т., Шибнев В.А., Гречишко В.С.* // *Изв. акад. наук (сер. хим.).* 1956. № 7. С. 1294–1295.

Peptide Derivatives of Adamantane as Inhibitors of the Viroporins Functions of RNA Viruses

V. A. Shibnev, P. G. Deryabin, T. M. Garaev[#], M. P. Finogenova, A. G. Botikov, and D. V. Mishin

[#]Phone: +7(499)190-30-43; e-mail: tmgaraev@gmail.com

Ivanovsky Institute of Virology of Gamaleya FRCM of the Ministry of Health of Russia, ul. Gamaleya 18, Moscow, 123098 Russia

The novel derivatives of amino acids and peptides with various carbocyclic compounds were synthesized and investigated their antiviral activity against influenza A/H5N1 and hepatitis C viruses *in vitro*. It has been demonstrated that amino acid derivatives of amino adamantanes have the ability to inhibit the replication of the high virulent strains of the virus avian influenza A (H5N1), is resistant to amantadine and rimantadine. The influence of carbocyclic moiety configuration in dipeptide H-Pro-Trp-OH over antiviral properties against hepatitis C virus (HCV) was studied. The compound containing at N-terminal of dipeptide H-Pro-Trp-OH cyclohexanecarbonyl group actively inhibited HCV replication *in vitro*. Some compounds show high virucidal against influenza A/H5N1 or HCV virus particles.

Keywords: influenza virus A/H5N1, adamantane derivatives, peptides, hepatitis C virus, antiviral activity