

N-АЦИЛАМИНОКИСЛОТНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 2-НОРБОРНАНУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ, СПОСОБНЫЕ ИНГИБИРОВАТЬ ШТАММЫ ВИРУСА ГРИППА А, РЕЗИСТЕНТНЫЕ К ПРЕПАРАТАМ АДАМАНТАНОВОГО РЯДА

В.А. Шибнев

д.х.н., профессор, вед. науч. сотрудник, лаборатория онтогенеза вирусов, Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи (Москва)
E-mail: shibnev@yandex.ru

Т.М. Гараев

к.б.н., ст. науч. сотрудник, лаборатория онтогенеза вирусов, Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи (Москва)
E-mail: tmgaraev@gmail.com

М.П. Финогенова

к.х.н., вед. науч. сотрудник, лаборатория онтогенеза вирусов, Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи (Москва)
E-mail: fitara@yandex.ru

П.Г. Дерябин

д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе Института вирусологии им. Д.И. Ивановского, Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи (Москва)
E-mail: pg_deryabin@mail.ru

Продемонстрирована способность аминокислотных производных 2-норборнановой кислоты ингибировать репликацию штаммов вируса гриппа А/Н5N1 в культуре клеток Vero-E6. По сравнению с ранее используемым для лечения гриппа римантадином гидрохлоридом синтетические соединения 2-норборнануксусной кислоты являются менее токсичными и в разной степени эффективности способны ингибировать штаммы вируса гриппа А, резистентные к действию римантадина.

Ключевые слова: вирус гриппа А/Н5N1, производные аминокислот, пептиды, 2-норборнануксусная кислота, противовирусная активность.

Грипп является серьезным инфекционным заболеванием, которое представляет опасность для жизни, особенно для детей, пожилых людей и пациентов с ослабленным иммунитетом. В некоторых странах от сезонного гриппа ежегодно страдает до 40% населения. Ежегодно в мире заболевает до 500 млн человек, 2 млн из которых умирают, чаще всего от осложнений [1]. Новые штаммы высоковирулентного вируса гриппа могут появиться неожиданно и вызвать всемирные пандемии с высоким уровнем заболеваемости и смертности.

Стратегия борьбы с сезонными и пандемическими штаммами вируса гриппа включает в себя создание вакцин против гриппа [2] и разработку новых противогриппозных препаратов. В настоящее время разработка противовирусных препаратов представляется наиболее перспективной стратегией в области контроля и профилактики инфекций, вызванных сезонным и пандемическим гриппом. Противовирусные препараты могут преодолеть ограни-

чения, присущие вакцинным препаратам. В частности, затраты времени на молекулярный дизайн ежегодной вакцины, недостаточная защита для пациентов с ослабленным иммунитетом и непредсказуемые изменения антигенной структуры штаммов вируса гриппа снижают эффективность вакцинации. Основное внимание уделяется разработке ингибиторов вирусного фермента нейраминидазы. Представителями этого класса ингибиторов являются тамифлю (TamifluTM) и реленза (RelenzaTM), которые были утверждены ВОЗ в качестве основных лекарственных средств для профилактики и лечения гриппозных инфекций [3].

На сегодняшний день известны случаи формирования резистентности к озельтамивиру; к нему была резистентна практически вся популяция сезонных штаммов вируса гриппа А(Н1N1) [4, 5]. В частности, показано, что восприимчивость к озельтамивиру у штаммов вируса гриппа А(Н1N1) обусловлена мутацией в участке H275Y в после-

довательности генома, кодирующего нейраминидазу. Однако штамм А(Н1N1) оставался чувствительным к занамивиру (реленза). Вероятно, это связано со значительно меньшими объемами использования препарата релензы в качестве средства для профилактики и лечения гриппа, чем препарата тамифлю [3].

Помимо ингибиторов нейраминидазы существуют препараты – блокаторы функции ионного канала М2: римантадин гидрохлорид и 1-аминоадамantan (амантадин). Ингибирующее действие этих соединений направлено на угнетение функции протон-проводящего канала М2 в оболочке вируса. Белок М2, который образует тетрамерный канал в оболочке вируса гриппа, является типичным представителем семейства виropоринов. Виropорин М2 вируса гриппа А отвечает за однонаправленный транспорт протонов внутрь вирусной частицы. Высокая селективность и сродство канала М2 именно к протону обусловлены особым строением гидрофобного трансмембранного (ТМ) домена, который содержит остатки гистидина в положении 37 (His37) и триптофана в положении 41 (Trp41). Поставщиками протонов из клетки-хозяина служат ионы гидроксония (H_3O^+). Они подходят к кольцу имидазольного сопряжения гистидинов и соединяются водородными связями с атомом азота, а при изменении конфигурации кольца переходят во внутреннее пространство вирусной частицы [6]. Конформационное изменение положения остатков гистидина после протонирования имидазольных колец является результатом электростатического отталкивания, что приводит к расширению канала в районе His37 и пропускает протоны внутрь. Конформационный скачок снимает избыточный заряд ионов имидазолия, и гистидины возвращаются в нейтральное состояние [7].

Таким образом, канал М2 представляет собой мишень, на которую направлено действие препаратов адамантанового ряда. Активность молекул римантадина и амантадина была связана с образованием водородной связи между аминокислотной группой карбоцикла и гидроксильной группой остатка серина в положении 31 внутри поры канала М2. В последние годы вследствие мутационной замены Ser31 на аспарагин (S31N) циркулирующие вирусы гриппа приобрели устойчивость к препаратам адамантанового ряда, и их применение для лечения и профилактики является неэффективным [8].

Ингибиторы функции белка М2, как правило, состоят из гидрофобной части молекулы (в препа-

ратах амантадин и римантадин – адамантан), соединенной с полярной функциональной группой. В амантадине или римантадине заместитель представлен амино- или этиламиногруппой. Адамантильный остаток может быть заменен на другие гидрофобные группы, в том числе сопряженные и спиро-сопряженные мультициклические алканы, разветвленные ациклические алканы и силаны [9, 10]. Эти соединения проявляли достаточную активность в отношении дикого типа, а некоторые были весьма активны в отношении мутантов V27A и L26F [10, 11]. Однако ни одно из этих производных не показало противовирусной активности в отношении штаммов, несущих замену S31N в М2, превосходящей активность амантадина. Также блокаторами виropоринов могут быть гексаметиленамилорид и длинноцепочечные производные ацилиминосакхаров [12].

Таким образом, появление новых вариантов гриппа, устойчивых к лекарственным средствам, подчеркивает необходимость в инновационной стратегии разработки новых препаратов с улучшенным противовирусным эффектом и безопасных для организма человека. Разработка противовирусных средств, ориентированных на белки клетки хозяина, которые играют важную роль в репликации вируса, также активно развивается в последнее время. Кроме того, комбинированная терапия, основанная на применении двух или более различных противовирусных средств, представляет собой перспективный подход к борьбе с гриппозной инфекцией.

В течение ряда лет в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского (Москва) проводятся исследования по созданию синтетических препаратов пептидной природы на основе адамантанового и других карбоциклов, являющихся ингибиторами вирусных ионных каналов.

Ранее авторами был предложен способ преодоления резистентности вирусов гриппа А к препаратам адамантанового ряда путем введения новых функциональных групп (карбоксильной, гидроксильной, имидазольной, индольной и др.) в аминокислотный карбоцикл с использованием для этого аминокислот, пептидов или других физиологически важных соединений [13]. Полученный ряд адамантил-аминокислот и пептидов способен ингибировать высокопатогенные штаммы вирусов гриппа А, включая и такие как А/Н1N1pdm09, А/Н5N1, А/Н3N2 и др. (Патенты РФ RU 2461544 C1; RU 2553991 C1; RU 2572102 C1).

Таким образом, есть все предпосылки полагать, что синтетические производные 2-норборнануксусной кислоты с остатками аминокислот и пептидов вследствие их значительной активности и низкой токсичности могут претендовать на модель для создания новых противовирусных препаратов против современных штаммов гриппа А.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Синтез соединений. В работе использовали 2-норборнанкарбоновую кислоту, N-метилморфолин (NMM) и L-аминокислоты («Sigma-Aldrich», США); изо-бутилхлорформиат (IBCF) («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%-ный аммиак, 100:44 (В), н-бутанол – уксусная кислота – вода – пиридин, 30:3:12:10 (С). Масс-спектры МАЛДИ получали на масс-спектрометре Bruker autoflex speed («Bruker Daltonics Inc.», Германия), оснащенный твердотельным УФ-лазером с $\lambda = 355$ нм и рефлектроном, в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Для регистрации масс-спектров МАЛДИ использовали стальную мишень MTP 384 ground steel («Bruker Daltonics Inc.», Германия). Для регистрации масс-спектров МАЛДИ образец смешивали с раствором матрицы СІN (синапиновая кислота, («Sigma-Aldrich», США)) в соотношении 1:1, наносили на стальную мишень и высушивали. Инфракрасные спектры 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%-ный раствор в этиловом спирте, длина кюветы – 0,5 дм).

Образование пептидной связи между 2-норборнанкарбоновой кислотой, содержащей карбоксильную группу, и эфирами аминокислот и пептидов с открытой аминогруппой проводили в одну стадию в условиях реакции смешанных ангидридов в эквимолярном соотношении. Для поглощения выделяющегося хлористого водорода использовали N-метилморфолин.

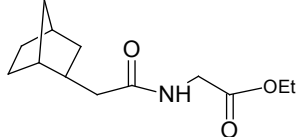
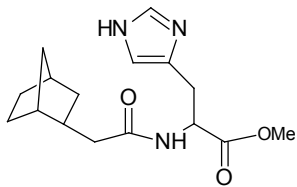
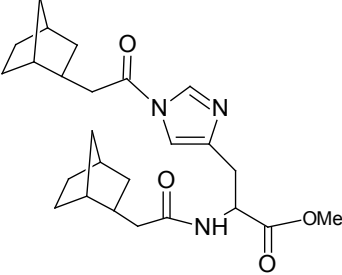
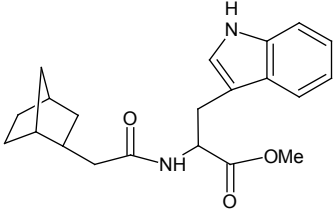
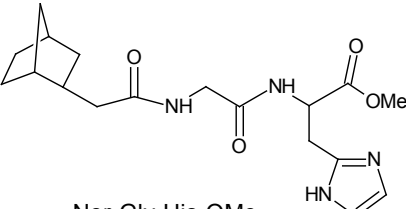
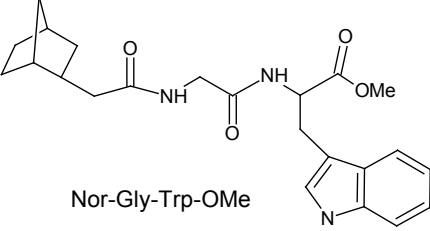
Молекула соединения III ((Nor)₂-His-OMe) содержит два остатка 2-норборнановой кислоты. Один остаток связан с α -аминогруппой гистидина,

а второй – с имидазольной группой. Для достижения полного замещения NH-групп гистидина в реакции использовали более чем двукратный избыток 2-норборнануксусной кислоты. Структурные формулы полученных производных 2-норборнанкарбоновой кислоты представлены на рисунке.

Вирус. 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) [11]. Вирусы получены из ГКВ Института вирусологии им. Д.И. Иванова (Москва). Вирусосодержащий материал представлял собой культуральную жидкость, собранную из зараженных вирусом H5N1 культур клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) на высоте развития цитопатических проявлений [14]. Инфекционный титр штаммов вируса для культур клеток колебался в пределах от 5,5 до 6,0 lg ТЦИД₅₀/мл (тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя). В опытах использовали дозу вируса H5N1, равную 0,1 ТЦИД₅₀.

Культуры клеток. Культура клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ). Изучение противовирусной активности соединений проведено на чувствительной к продукции гриппа А/H5N1 культуре СПЭВ. Культуры выращивали в виде двухдневного монослоя в 48-луночных пластиковых культуральных панелях в среде 199 (производство ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАМ) с добавлением 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина и 10%-ной сыворотки крупного рогатого скота. Контроль культуральных клеток проводили с помощью светооптического микроскопа.

В опытах использовали чувствительные к репродукции вируса гриппа А/H5N1 культуры клеток почки зеленой марьшшки, 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 («ПанЭко», Москва), соединённой с предварительно прогретой на водяной бане при 56 °С в течение 20 мин 7%-ной эмбриональной телячьей сывороткой («ПанЭко», Москва) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ с добавлением глутамина и антибиотиков (100 ЕД/мл пенициллина и 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).

 <p>Nor-Gly-OEt</p>	<p>I – 2-норборнилкарбокси-глицин этиловый эфир (этил{[(бицикло[2.2.1]гепт-2-ен)ацетил]амино}ацетат)</p>
 <p>Nor-His-OMe</p>	<p>II – 2-норборнилкарбокси-гистидин метиловый эфир (метил-2-{{[(бицикло[2.2.1]гепт-2-ил)ацетил]амино}-3-(1<i>H</i>-имидазол-4-ил)пропоноат)</p>
 <p>(Nor)₂-His-OMe</p>	<p>III – ди-(2-норборнилкарбокси)-гистидин метиловый эфир (метил-2-{{[(бицикло[2.2.1]гепт-2-ил)ацетил]амино}-3-[1-(3-(бицикло[2.2.1]гепт-2-ил)ацетил)-1<i>H</i>-имидазол-4-ил)пропоноат)</p>
 <p>Nor-Trp-OMe</p>	<p>IV – 2-норборнилкарбокси-триптофан метиловый эфир (метил-3-(1<i>H</i>-индол-3-ил)-2-{{[(3-(бицикло[2.2.1]гепт-2-ил)ацетил]амино}пропоноат)</p>
 <p>Nor-Gly-His-OMe</p>	<p>V – 2-норборнилкарбокси-глицил-гистидин метиловый эфир (метил-3-(1<i>H</i>-имидазол-4-ил)-2-{{[(3-(бицикло[2.2.1]гепт-2-ил)ацетил]амино}ацетил]амино}пропоноат)</p>
 <p>Nor-Gly-Trp-OMe</p>	<p>VI – 2-норборнилкарбокси-глицил-триптофан метиловый эфир (метил-3-(1<i>H</i>-индол-3-ил)-2-{{[(3-(бицикло[2.2.1]гепт-2-ил)ацетил]амино}ацетил]амино}пропоноат)</p>

Аминокислотные и пептидные производные 2-норборнануксусной кислоты

Изучение противовирусной активности.

Противовирусную активность синтезированных соединений исследовали на панелях со сформировавшимся монослоем клеток Vero-E6 и проверяли в трех схемах введения соединений в культуру

клеток: за 18 ч до заражения клеток, в момент заражения и через 18 ч после заражения культур клеток. Изначальная концентрация соединений составляла 10 мМ, которая наносилась в серии последовательных разведений 1/10.....1/640.

Таким образом соединения вносили в концентрациях 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031 0,0015 и 0,0075 мМ. В качестве контроля использовали инфицированную культуру клеток без добавления соединений. Оценку цитотоксического действия определяли колориметрическим методом после инкубации клеток с синтезированными соединениями в течение 72 ч при 37 °С.

Противовирусный эффект соединения оценивали по проценту жизнеспособных инфицированных клеток путем сравнения интенсивности окрашивания раствора в контрольных и опытных лунках при добавлении нейтрального красного на автоматическом спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Молекулярный докинг. Проведенные исследования *in silico* в подавляющем проценте решений обнаруживают лиганд непосредственно внутри протонного канала М2 вируса гриппа А. Для моделирования взаимодействия лиганда с белком-мишенью М2 использовали программу Patchdock v.1.3. Molecular Docking Algorithm (Bio-Info3D), позволяющую проводить процесс докинга молекул *in silico*.

Результатом докинга является энергия связывания лиганда с активным центром в конформации, обеспечивающей наилучшее взаимодействие лиганда с белковым сайтом связывания. Модель канала М2, полученная из открытой базы данных (Protein Data Bank), содержала мутацию S31N, которая является маркером устойчивости штамма к римантадину и амантадину (PDB структура 2MUV). Структура лиганда была сгенерирована в программном продукте HyperChem v.8.0.0 (Hypercube, Inc.)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Противовирусная активность соединения, как правило, включает как вирулицидную активность вещества, так и его противовирусные свойства, т.е. способность ингибировать ту или иную стадию репликации вируса: от адсорбции вируса на клетке и его проникновения в клетку до влияния на сборку и выход вируса из зараженной клетки. Поэтому противовирусную активность исследуемого вещества проверяют путем обработки монослоя клеток до заражения вирусом (профилактический эффект вещества), в момент заражения (лечебно-профилактический эффект) и через определенный интервал времени после заражения (лечебный эффект).

Противовирусный эффект вещества оценивается по проценту жизнеспособных инфицированных клеток. В опыте изучали жизнеспособность (процент выживших клеток), инфицированных высоковирулентным штаммом вируса гриппа A/Duck/Novosibirsk/56/06 (H5N1) клеток при различных схемах введения синтезированных соединений.

Из данных таблицы видно, что производное 2-норборнануксусной кислоты с остатком глицина (Nor-Gly-ОМе соединение I эффективно защищало монослой клеток от цитопатогенного действия вируса во всех схемах внесения соединения. Ингибирующая доза 50 (ИД₅₀) составила менее 0,0015 мМ. Соединения II и III проявили наибольшую противовирусную активность из представленных соединений. Имея достаточно разные размеры молекул, они, тем не менее, оказались идентичны по своим противовирусным свойствам и эффективны во всех схемах введения соединений и вируса, ИД₅₀ < 0,0015 мМ. Соединение II имеет протяженность 9,7 Å, а соединение III имеет больший объем и протяженность, как это может показаться, однако геометрические размеры молекулы не более 10 Å в диаметре, что не превышает диаметра поры канала М2 (11 Å). Отметим, что внутренняя поверхность поры канала М2 представлена в основном гидрофобными остатками аминокислот. Поэтому липофильность молекулы ингибитора играет важную роль в закреплении синтетической структуры внутри поры канала М2.

Соединение IV также проявило высокий эффект защиты клеток в схемах внесения до инфицирования, и через 18 ч после заражения ИД₅₀ составило менее 0,0015 мМ, а для одновременного внесения вещества с вирусом ИД₅₀ составило 0,0062 мМ.

Соединения V и VI, представляющие собой удлиненные структуры соединений II и IV соответственно, при биологическом испытании сильно потеряли в противовирусной активности по сравнению с соединениями II и IV. Соединения V и VI были малоактивны в профилактической схеме введения. В схемах одномоментного внесения соединения и вируса и при введении соединения через 18 ч после заражения ИД₅₀ для соединения V составила 0,0125 мМ, а для соединения VI – менее 0,025 мМ. Поскольку ЦТ₅₀ соединения VI составила 0,05 мМ, химико-терапевтический индекс будет очень мал.

Таблица. Противовирусные свойства соединений в отношении инфекции, вызванной высокопатогенным штаммом вируса гриппа А/Н5N1

Схема введения соединения	Номер соединения	Концентрация соединений (мМ) / % погибших клеток							
		0,05	0,025	0,0125	0,0062	0,0031	0,0015	0,00075	К.в.
18 ч до заражения	I	ЦТ ₁₀₀	0	0	0	0	0	100	100
	II	ЦТ ₁₀₀	0	0	0	0	0	100	100
	III	ЦТ ₁₀₀	0	0	0	0	0	100	100
	IV	ЦТ ₁₀₀	0	0	0	0	0	100	100
	V	ЦТ ₁₀₀	0	100	100	70	70	100	100
	VI	ЦТ ₅₀	0	100	100	100	100	100	100
В момент заражения	I	0	0	0	0	0	0	100	100
	II	ЦТ ₅₀	0	0	0	0	0	100	100
	III	0	0	0	0	0	0	100	100
	IV	ЦТ ₁₀₀	0	0	50	50	50	100	100
	V	ЦТ ₅₀	0	50	50	80	75	100	100
	VI	0	0	100	100	100	100	100	100
Через 18 ч после заражения	I	0	0	0	0	0	0	100	100
	II	0	0	0	0	0	0	100	100
	III	0	0	0	0	0	0	50	100
	IV	0	0	0	50	100	100	100	100
	V	0	0	50	50	80	75	100	100
	VI	0	0	100	100	100	100	100	100

Примечание: К.в. – контроль вируса (без соединений); ЦТ₁₀₀ – цитотоксическая концентрация, при которой наступает 100%-ная гибель клеток от действия соединения; ЦТ₅₀ – цитотоксическая концентрация, при которой погибает 50% монослыа клеток.

ВЫВОДЫ

1. Предложенный способ присоединения функциональных групп к молекуле 2-норборнануксусной кислоты открывает новые пути для создания эффективных препаратов прямого действия. При появлении новых генотипов вируса гриппа А со структурно измененными белками вируса позволит быстро, а главное синтетически и экономически доступно вносить изменения в имеющееся 2-норборнанпроизводное для преодоления резистентности.

2. Предлагаемые соединения аминокислот с 2-норборнануксусной кислотой ввиду их значительной активности и низкой токсичности могут претендовать на модель для создания новых противовирусных препаратов на их основе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мальшев Н.А., Базарова М.В., Кареткина Г.Н. и др. Особенности пандемического гриппа А (H1N1) pdm09 // Инфекционные болезни. 2013. № 2. С. 12–17.
2. Васильев Ю. Направления совершенствования вакцин против гриппа // Врач. 2014. № 8. С. 12–14.

3. Eyer L., Hruska K. Antiviral agents targeting the influenza virus: a review and publication analysis // Veterinarni Medicina. 2013. V. 58, № 3. P. 113–185.
4. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Галегов Г.А. и др. Чувствительность эпидемических и пандемических штаммов вирусов гриппа к занамивиру (Релензе™) в опытах *in vitro* // Вопросы вирусологии. 2010. Т. 55. № 6. С. 10–14.
5. Смирнов В.С., Гаршинина А.В., Штро А.А., Аникин В.Б., Галочкина А.В., Беляевская С.В., Зарубаев В.В. Протективная активность комбинации глутамил-триптофана и глицирризиновой кислоты при пероральном введении на модели экспериментальной летальной гриппозной инфекции у белых мышей, вызванной осельтамивирустойчивым штаммом вируса // Вопросы вирусологии. 2014. Т. 59. № 5. С. 31–38.
6. Miao Y., Fu R., Zhou H.X., et al. Dynamic Short Hydrogen Bonds in Histidine Tetrad of Full-Length M2 Proton Channel Reveal Tetrameric Structural Heterogeneity and Functional Mechanism // Structure. 2015. V. 23, № 12. P. 2300–2308.
7. Wei C., Pohorille A. M2 proton channel: toward a model of a primitive proton pump // Orig Life Evol. Biosph. 2015. V. 45. № 2. P. 241–248.
8. Chuang G.Y., Kozakov D., Brenke R., et al. Binding hotspots and amantadine orientation in the influenza A virus M2 proton channel // Biophys. J. 2009. V. 97. № 10. P. 2846–2853.
9. Wang J., Ma C., Jo H., Balannik V., et al. Discovery of novel dual inhibitors of the wild-type and the most prevalent drug-resistant mutant, S31N, of the M2 proton channel from influenza A virus // J. Med. Chem. 2013. V. 56. № 7. P. 2804–2812.
10. Wang C.Ma, Fiorin G., Carnevale V., et al. Molecular Dynamics Simulation Directed Rational Design of Inhibitors Targeting Drug-Resistant Mutants of Influenza A Virus M2 // J. Am. Chem. Soc. 2011. № 133. P. 12834–12841.
11. Balannik V., Wang J., Ohigashi Y., Jing X.H., Magavern E., et al. Design and Pharmacological Characterization of Inhibitors of Amantadine-Resistant Mutants of the M2 Ion Channel of Influenza A Virus // Biochemistry. 2009. № 48. P. 11872–11882.
12. Griffin S.D., Beales L.P., Clarke D.S., et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine // FEBS Lett. 2003. № 535. P. 34–38.
13. Shibnev V.A., Garaev T.M., Finogenova M.P., Shevchenko E.S., Burtseva E.I. New adamantane derivatives capable of overcoming the resistance of influenza A (H1N1) pdm2009 and A (H3N2) for «rimantadine» // Bull. Exp. Biol. Med. 2012. V. 153. № 2. P. 233–235.
14. Дерябин П.Г., Львов Д.К., Исаева Е.И., и др. Спектр клеточных линий позвоночных, чувствительных к высокопатогенным вирусам гриппа А/крачка/Южная Африка/61 (H5N3) и А/крачка/Новосибирск/56/05 (H5N1) // Вопросы вирусологии. 2007. Т. 52. № 1. С. 45–47.

Поступила 30 мая 2017 г.

N-ACYL AMINO ACID DERIVATIVES OF 2-NORBORNANACETIC ACID, CAPABLE INHIBIT VIRUSES OF INFLUENZA A STRAIN RESISTANT TO ADAMANTAN DRUGS

© Authors, 2018

V.A. Shibnev

Dr.Sc. (Chem.), Professor, Leading Researcher, Laboratory of Ontogenesis Viruses, N.F. Gamaleya FRCM Russian Ministry of Health (Moscow)
E-mail: shibnev@yandex.ru

T.M. Garaev

Ph.D., Senior Researcher, Laboratory of Ontogenesis Viruses, N.F. Gamaleya FRCM Russian Ministry of Health (Moscow)
E-mail: gtim@fmradi.ru

M.P. Finogenova

Ph.D., Leading Researcher, Laboratory of Ontogenesis Viruses, N.F. Gamaleya FRCM Russian Ministry of Health (Moscow)
E-mail: fimapa@yindex.ru

P.G. Deryabin

Dr.Sc. (Med.), Professor, Deputy Director for Scientific Work, Ivanovsky Institute of Virology, N.F. Gamaleya FRCM Russian Ministry of Health (Moscow)
E-mail: pg_deryabin@mail.ru

Voporin M2 is vital to the influenza virus for infection of the cell. It is an ion channel built into the viral envelope that selectively conducts protons from the cell through the interior of the virus. At a certain acidity value of the medium, the protein M2 is activated and begins to pump protons, lowering the pH inside the virus particle and thereby causing its decay. Thus, the genetic material of the virus is released into the cytoplasm of the host cell. Channel M2 is the target on which the action of preparations of the adamantane (rimantadine and amantadine) is directed. In recent years, due to the mutational substitution of serine at position 31 for asparagine (S31N) in the M2 channel protein, circulating influenza viruses have become resistant to adamantane drugs and their use for treatment and prevention is ineffective.

There are all reasons to believe that synthetic derivatives of 2-norbornane acetic acid with amino acid residues and peptides can claim a model for the creation of new antiviral drugs as structural analogues of aminoadamantanes. Synthesized compounds have an-

ti-influenza activity and act on strains of influenza A virus, resistant to the action of rimantadine and amantadine. The compounds of the invention inhibit the reproduction of pathogenic influenza virus strains A / IIV-Orenburg / 83/2012 (H1N1) pdm09 and A / H5N1, with a number of compounds having a less toxic effect on the monolayer of MDCK and Vero-E6 cells than rimantadine. Synthesis and biological properties of compounds that are derivatives of 2-norbornane acetic acid are presented in the article:

- 2-norbornyl acetycarboxylic acid ethyl ester ((ethyl {[(bicyclo [2.2.1] hept-2-ene) acetyl] amino} acetate);
- 2-norbornyl acetycarboxy-histidine methyl ester ((methyl-2 - {[(bicyclo [2.2.1] hept-2-yl) acetyl] amino} -3- (1H-imidazol-4-yl) propanoate);
- 2-norbornylcarboxy-tryptophan methyl ester (methyl-3- (1H-indol-3-yl) -2 - [(3- (bicyclo [2.2.1] hept-2-yl) acetyl) amino] propanoate);
- 2-norbornylcarboxy-glycyl-histidine methyl ester (methyl-3- (1H-imidazol-4-yl) -2- ([(3- (bicyclo [2.2.1] hept-2-yl) acetyl) amino] acetyl} amino) propanoate);
- 2-norbornylcarboxy-glycyl-tryptophan methyl ester (methyl-3- (1H-indol-3-yl) -2- ([(3- (bicyclo [2.2.1] hept-2-yl) acetyl) amino] acetyl} amino) propanoate).

These compounds can be used to create new drugs against the influenza A virus, using either as an individual drug or as an active ingredient in the formulation.

Key words: influenza virus A/H5N1, amino acid derivatives, peptides, 2-norbornaneacetic acid, antiviral activity.

REFERENCES

1. Malyshev N.A., Bazarova M.V., Karetkina G.N. i dr. Osobennosti pandemicheskogo grippa A (H1N1) pdm09 // Infekcionnye bolezni. 2013. № 2. S. 12–17.
2. Vasil'ev Ju. Napravleniya sovershenstvovaniya vakcin protiv grippa // Vrach. 2014. № 8. S. 12–14.
3. Eyer L., Hruska K. Antiviral agents targeting the influenza virus: a review and publication analysis // Veterinarni Medicina. 2013. V, 58, № 3. P. 113–185.
4. L'vov D.K., Burceva E.I., Galegov G.A. i dr. Chuvstvitel'nost' jepidemicheskikh i pandemicheskikh shtammov virusov grippa k zanamiviru (Relenze™) v opytah in vitro // Voprosy virusologii. 2010. T. 55. № 6. S. 10–14.
5. Smirnov V.S., Garshinina A.V., Shtro A.A., Anikin V.B., Galochkina A.V., Beljaevskaja S.V., Zarubaev V.V. Protektivnaja aktivnost' kombinacii glutamil-triptofana i glicirrizinovoj kisloty pri peroral'nom vvedenii na modeli jeksperimental'noj letal'noj grippoznoj infekcii u belyh myshej, vyzvannoj osel'tamivirustojchivym shtammom virusa // Voprosy virusologii. 2014. T. 59. № 5. S. 31–38.
6. Miao Y., Fu R., Zhou H.X., et. al. Dynamic Short Hydrogen Bonds in Histidine Tetrad of Full-Length M2 Proton Channel Reveal Tetrameric Structural Heterogeneity and Functional Mechanism // Structure. 2015. V. 23, № 12. P. 2300–2308.
7. Wei C., Pohorille A. M2 proton channel: toward a model of a primitive proton pump // Orig Life Evol. Biosph. 2015. V. 45. № 2. P. 241–248.
8. Chuang G.Y., Kozakov D., Brenke R., et. al. Binding hotspots and amantadine orientation in the influenza A virus M2 proton channel // Biophys. J. 2009. V. 97. № 10. P. 2846–2853.
9. Wang J., Ma C., Jo H., Balannik V., et. al. Discovery of novel dual inhibitors of the wild-type and the most prevalent drug-resistant mutant, S31N, of the M2 proton channel from influenza A virus // J. Med. Chem. 2013. V. 56. № 7. P. 2804–2812.
10. Wang C.Ma, Fiorin G., Carnevale V., et. al. Molecular Dynamics Simulation Directed Rational Design of Inhibitors Targeting Drug-Resistant Mutants of Influenza A Virus M2 // J. Am. Chem. Soc. 2011. № 133. P. 12834–12841.
11. Balannik V., Wang J., Ohigashi Y., Jing X.H., Magavern E., et. al. Design and Pharmacological Characterization of Inhibitors of Amantadine-Resistant Mutants of the M2 Ion Channel of Influenza A Virus // Biochemistry. 2009. № 48. P. 11872–11882.
12. Griffin S.D., Beales L.P., Clarke D.S., et. al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine // FEBS Lett. 2003. № 535. P. 34–38.
13. Shibnev V.A., Garaev T.M., Finogenova M.P., Shevchenko E.S., Burtseva E.I. New adamantane derivatives capable of overcoming the resistance of influenza A (H1N1) pdm2009 and A (H3N2) for «rimantadine» // Bull. Exp. Biol. Med. 2012. V. 153. № 2. P. 233–235.
14. Derjabin P.G., L'vov D.K., Isaeva E.I., i dr. Spektr kletochnyh linij pozvonochnyh, chuvstvitel'nyh k vysokopatogennym virusam grippa A/krachka/Juzhnaja Afrika/61 (H5N3) i A/krachka/Novosibirsk/56/05 (H5N1) // Voprosy virusologii. 2007. T. 52. № 1. S. 45–47.

ВНИМАНИЕ !

Изменилась дата проведения
Международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития»
и Международной специализированной выставки «Мир биотехнологии 2018»
на 23-25 мая 2018 г.