

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Дерябин П.Г.<sup>1</sup>, Гараев Т.М.<sup>1</sup>, Финогонова М.П.<sup>1</sup>, Одноров А.И.<sup>2</sup>

## Оценка противовирусной активности соединения 2НСI\*Н-His-Rim в сравнении с противогриппозным препаратом «Арбидол» в отношении высоковирулентного штамма вируса гриппа A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) (*Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae*)

<sup>1</sup> ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва, Россия

**Введение.** Возникновение штаммов вируса гриппа с лекарственной устойчивостью к противовирусным препаратам требует поиска новых соединений, потенциальных ингибиторов прямого действия. Препараты адамантанового ряда, применявшиеся с 1960-х годов, утратили свою активность ввиду возникшей резистентности. Для лечения гриппа Всемирная организация здравоохранения одобрила только препараты – ингибиторы нейраминидазы, такие как занамивир и осельтамивир. В России, Китае и в большинстве республик постсоветского пространства для лечения гриппа активно применяется российский фармацевтический препарат «Арбидол» (Umifenovirum). В данной работе представлено новое производное аминоадамантана – дихлоргидрат L-гистидил-1-адамантаилэтиламин (2НСI\*Н-His-Rim), который показал высокий уровень ингибирования штаммов вируса гриппа А *in vitro*.

**Цель исследования** – сравнение противовирусных свойств нового синтетического низкомолекулярного ингибитора репликации вируса гриппа А и отечественного препарата «Арбидол».

**Материал и методы.** Соединение 2НСI\*Н-His-Rim было получено методами классического пептидного синтеза. Идентифицировано методами масс-спектрометрии, инфракрасной спектроскопии и спектроскопии ядерного магнитного резонанса. Его противовирусные свойства *in vitro* изучены на монослое клеток Vero-E6, инфицированных высоковирулентным штаммом вируса гриппа A/duck/Novosibirsk/56/06 (H5N1) при различных схемах введения исследуемых соединений.

**Результаты.** Противовирусная активность соединения 2НСI\*Н-His-Rim в отношении высокопатогенного штамма вируса гриппа А/H5N1 была несколько выше, чем у известного аптечного препарата «Арбидол».

**Обсуждение.** Разница в противовирусной активности этих двух соединений объясняется различными механизмами действия на вирусную частицу.

**Заключение.** Соединение 2НСI\*Н-His-Rim ввиду достаточно высокой эффективности, а также экономической и синтетической доступности может быть рекомендовано в качестве кандидата на доклинические и клинические испытания с целью получения этиотропного противовирусного препарата на его основе. Синтетическое соединение 2НСI\*Н-His-Rim действует на варианты вируса гриппа А, резистентные к препаратам «Римантадин» и «Амантадин».

**Ключевые слова:** вирус гриппа А; лекарственная устойчивость; арбидол; противовирусная активность; адамантан.

**Для цитирования:** Дерябин П.Г., Гараев Т.М., Финогонова М.П., Одноров А.И. Оценка противовирусной активности соединения 2НСI\*Н-His-Rim в сравнении с противогриппозным препаратом «Арбидол» в отношении высоковирулентного штамма вируса гриппа A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) (*Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae*). *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(6): 268-273.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-268-273>

### Информация об авторах:

Дерябин П.Г., <https://orcid.org/0000-0002-8522-9554>

Гараев Т.М., <https://orcid.org/0000-0002-3651-5730>

Финогонова М.П., <https://orcid.org/0000-0002-3611-3897>

Одноров А.И., <https://orcid.org/0000-0001-9355-2522>

**Для корреспонденции:** Гараев Тимур Мансурович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; <https://orcid.org/0000-0002-3651-5730>. E-mail: [tmgaraev@gmail.com](mailto:tmgaraev@gmail.com)

Deryabin P.G.<sup>1</sup>, Garaev T.M.<sup>1</sup>, Finogenova M.P.<sup>1</sup>, Odnovorov A.I.<sup>2</sup>

## Assessment of the antiviral activity of 2HCl\*H-His-Rim compound compared to the anti-influenza drug Arbidol for influenza caused by A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) (*Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae*)

<sup>1</sup>National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia;

<sup>2</sup>Russian Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198, Russia

**Introduction.** The emergence of influenza virus strains with drug resistance to antiviral drugs requires finding new compounds, potential direct-acting inhibitors. Adamantane compounds drugs used since the 1960s have lost their activity the resulting due to resistance. Only neuraminidase inhibitors such as zanamivir and oseltamivir have been approved by WHO for influenza treatment. The Russian pharmaceutical drug Arbidol (Umifenovirum) is actively used in Russia. This drug is used to treat influenza in Russia, China and most post-Soviet republics. This work presents a new derivative of aminoadamantane - dichlorohydrate L-histidyl-1-adamantyl ethylamine (2HCl\*H-His-Rim), which showed a high level of inhibition of strains of influenza virus *A in vitro*.

**Objectives.** Comparison of antiviral properties of the new synthetic low-molecular inhibitor of influenza A virus replication and Arbidol drug pharmacy.

**Methods.** The compound 2HCl\*H-His-Rim was obtained by classical peptide synthesis methods. It was identified by methods of mass spectrometry, infrared spectroscopy (IR) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). Its antiviral properties have been studied in vitro for monolayer of cells Vero-E6 infected with a high-virulent strain of A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) influenza virus at various injection schemes of the investigated compounds.

**The results.** The antiviral activity of the 2HCl\*H-His-Rim compound against the highly pathogenic strain of the influenza A/H5N1 virus was slightly higher than for the known pharmacy drug arbidol.

**Discussion.** The difference in antiviral activity of these two compounds is explained by different mechanisms of action on the viral particle.

**Conclusion.** The 2HCl\*H-His-Rim compound can be recommended as a candidate for preclinical and clinical trials in order to obtain an etiotropic antiviral drug based on it, due to its high efficacy and economic and synthetic availability. The synthetic compound 2HCl\*H-His-Rim acts on influenza A virus variants resistant to Rimantadine and Amantadine.

**Keywords:** *Influenza A virus; drug resistance; arbidol; antiviral activity; adamantan*

**For citation:** Deryabin P.G., Garaev T.M., Finogenova M.P., Odnovorov A.I. Assessment of the antiviral activity of 2HCl\*H-His-Rim compound compared to the anti-influenza drug Arbidol for influenza caused by A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) (*Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae*). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(6): 268-273. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-268-273>

**For correspondence:** Timur M. Garaev, PhD., Lead Researcher of the laboratory of molecular diagnostics «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-3651-5730>. E-mail: [tmgaraev@gmail.com](mailto:tmgaraev@gmail.com)

### Information about authors:

Deryabin P.G., <https://orcid.org/0000-0002-8522-9554>

Garaev T.M., <https://orcid.org/0000-0002-3651-5730>

Finogenova M.P., <https://orcid.org/0000-0002-3611-3897>

Odnovorov A.I., <https://orcid.org/0000-0001-9355-2522>

**Acknowledgments.** The publication has been prepared with the support of the «RUDN university program 5-100».

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 03 December 2019

Accepted 24 December 2019

## Введение

Первыми эффективными противогриппозными препаратами были аминопроизводные адамантанового карбоцикла «Римантадин» (Rimantadine) и «Амантадин» (Amantadine) [1]. Соединения адамантанового ряда, а именно аминоадамантаны, использовали для лечения и профилактики гриппа А с 1980-х годов. Их экономическая и синтетическая доступность делала эти препараты идеальными для борьбы с сезонными эпидемиями гриппа во всём мире. Ингибирующее действие этих соединений направлено на протон-проводящую функцию белка М2 [2]. Однако широкое использование препаратов адамантанового ряда в результате химического прессинга на вирус гриппа А привело к генетическим перестройкам, и вирус стал нечувствителен к их действию [3, 4].

У современных циркулирующих штаммов вируса гриппа А/Н1N1pdm2009, А/Н3N2, а также у высоко-вирулентного штамма вируса гриппа А птиц – Н5N1 резистентность к препаратам адамантанового ряда превышает 90%. Согласно Руководству ВОЗ по фармакологическому лечению пандемического гриппа А(Н1N1) 2009 и других вирусов гриппа от 2010 г. [5], современные циркулирующие штаммы вируса гриппа типа А устойчивы к действию производных адамантана, а потому эти препараты больше не рекомендованы для профилактики и лечения гриппа. Стоит отметить, что римантадина гидрохлорид включён в список лекарственных препаратов Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и рекомендован для лечения гриппа А с указанием, что современные штаммы вируса гриппа устойчивы к амантадину и римантадину.

Резистентность к римантадину обусловлена мутацией в трансмембранном домене протон-проводящего канала, образованного белком М2 вируса гриппа А.

На данный момент Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) утверждено четыре противовирусных препарата, рекомендованных Центрами по контролю и борьбе с вирусными инфекциями (CDC) в сезоне 2018–2019 г. Три из них являются ингибиторами нейраминидазы: осельтамивир для перорального применения, занамивир для орального вдыхания с помощью ингалятора и периамибир для внутривенного введения. Четвёртый препарат, для перорального применения, балоксавир марбоксил – это ингибитор кэп-зависимой эндонуклеазы, специфического для вируса гриппа фермента в его РНК-полимеразном комплексе, требуемого для вирусной транскрипции. Балоксавир одобрен FDA для использования в США в октябре 2018 г. [6].

В 2000-х годах на протяжении нескольких лет российский фармацевтический препарат «Арбидол» (Umifenovirum) применялся при гриппе и простуде и был самым продаваемым лекарственным средством в России. Данный препарат используется для лечения гриппа в России, Китае и большинстве постсоветских республик. Препарат не включён в «Рекомендации ВОЗ по фармакологическому лечению пандемического гриппа А(H1N1) 2009 и других вирусов гриппа» по причине «недостаточных данных об эффективности или безопасности, либо по обоим причинам» [6]. Однако довольно много данных о механизме действия арбидола на вирусную частицу. Противовирусное действие арбидола направлено на угнетение функции поверхностного гликопротеина вируса гриппа – гемагглютинина (НА). Механизм действия арбидола заключается в ингибировании процесса слияния липидной оболочки вируса с мембранами эндосом. При низком рН внутри эндосомы происходит дестабилизация конформации тримера НА вируса гриппа, что приводит к слиянию мембран, высвобождению нуклеокапсида и началу транскрипции вирусного генома. Арбидол блокирует этот процесс, оставляя вирус в эндосомальных пузырьках без возможности начать размножаться в клетке хозяина [7–10]. Установлено, что арбидол способен индуцировать в клетках

организма выработку собственного (эндогенного) интерферона и активировать фагоцитоз для выделения из организма патогенов. Все эти свойства обеспечили выраженную активность арбидола в отношении антигенных типов вируса гриппа А и В на ранних стадиях репродукции вируса и высокую безопасность препарата [8].

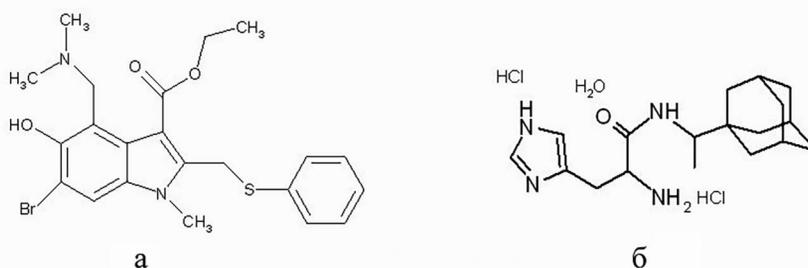
**Целью** данной работы было сравнение противовирусных свойств арбидола и нового синтетического ингибитора канала М2 класса адамантана (L-гистидил-1-адамантилэтиламин) [11] (см. рисунок) в отношении высоковирулентного штамма вируса гриппа A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) *in vitro*.

### Материал и методы

При синтезе гистидил-римантадина использовали рацемический римантадин (Zhejiang Kangyu Pharmaceutical Co, Китай), L-гистидин, изо-бутилхлорформат (IBCF), N-метилморфолин (NMM) и субстанцию арбидола гидрохлорид (Sigma-Aldrich, США). Все используемые для конденсации, выделения соединения и удаления защитных групп растворители предварительно очищали и перегоняли по стандартным методикам.

Степень полноты прохождения реакции контролировали с помощью ТСХ на пластинах Silufol (Чехия) в системах элюентов: метанол-хлороформ, 13:60 (А), втор-бутанол – 3% 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). Инфракрасные спектры были получены на ИК-спектрометре «Фурье ИнфраЛЮМ ФТ-10». Удельное оптическое вращение полученного соединения определяли в стандартных условиях на автоматическом поляриметре «А1-ЕПЛ» (1% раствор в этиловом спирте, длина кюветы 0,5 дм). Температуру плавления конечного соединения измеряли на приборе «SMP 20» (Stuart Scientific, Великобритания).

Синтез соединения был осуществлен методами классического пептидного синтеза с использованием метода смешанных ангидридов. Аминокислоту гистидина защищали по аминогруппе трет-бутилоксикарбонильной (Boc-) защитой, которая впоследствии удалялась в мягких условиях.



Структурные формулы соединений ингибиторов современных штаммов вируса гриппа.

а – препарат «Арбидол»; б – соединение 2HCl\*H-His-Rim.

(*Вос*)<sub>2</sub>-*His-OH* (*ди-трет-бутилоксикарбонил-L-гистидин*). 4,0 г (25,78 мМ) гидрохлорида гистидина и 1,13 г (28,25 мМ) NaOH растворяли в смеси 5,0 мл H<sub>2</sub>O и 4,0 мл трет-бутилового спирта. При перемешивании при температуре 45–50 °С тремя порциями в течение 2 ч добавляли 12,37 г (56,69 мМ) ди-трет-бутилдикарбоната (пирокарбонат). Вносили 5,0 мл трет-бутилового спирта и оставляли на 18 ч при 5 °С. Реакционную массу разбавляли водой в 1,5 раза и промывали гексаном (15,0 мл × 3). Затем водный раствор подкисляли раствором 3,0 г KHSO<sub>4</sub> в 10,0 мл H<sub>2</sub>O до pH 3–3,5.

Полученный продукт экстрагировали этилацетатом (25,0 мл × 3). Этилацетатные вытяжки объединяли и сушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, растворитель удаляли в вакууме (50 °С / 15 мм рт.ст.). Оставшееся масло сушили в вакууме до получения сухой белой пены. Выход аморфного продукта 7,55 г (92,8%), R<sub>f</sub> 0,41 (А), R<sub>f</sub> 0,67 (В), R<sub>f</sub> 0,64 (С), [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +26° (с 1, СН<sub>3</sub>ОН).

(*Вос*)<sub>2</sub>-*His-Rim* (*ди-трет-бутилоксикарбонил-L-гистидил-1-адамантаилэтиламин*). К 1,77 г (5 мМ) (*Вос*)<sub>2</sub>-*His-OH* в 10,0 мл СНCl<sub>3</sub> добавляли 0,55 мл (5,0 мМ) NMM. Смесь охлаждали до -25 °С затем добавляли 0,65 мл (5,0 мМ) IBCF. Перемешивали 5 мин и вносили раствор 1,08 г (5,0 мМ) гидрохлорида 1-(1-адамантаил)этиламина в 10 мл СНCl<sub>3</sub> с 0,55 мл (5,0 мМ) NMM. Перемешивали 30 мин при -15 °С, затем ещё 1 ч при 0 °С и оставляли на 18 ч при комнатной температуре.

Растворитель удаляли в вакууме (50 °С / 15 мм рт.ст.). Остаток растворяли в смеси 35,0 мл этилацетата и 10,0 мл H<sub>2</sub>O. Раствор последовательно промывали 10% лимонной кислотой (4,0 мл × 1), 0,5н NaHCO<sub>3</sub> (10,0 мл × 2), H<sub>2</sub>O (5,0 мл × 1). Органический слой отделяли и сушили безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Растворитель удаляли на ротонном испарителе (50 °С / 15 мм рт.ст.), получали вспененное масло, которое при растирании в гексане кристаллизуется.

Выход: 3,13 г (83%), R<sub>f</sub> 0,86 (А), R<sub>f</sub> 0,64 (В), R<sub>f</sub> 0,94 (С), [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 6° (с 1, СН<sub>3</sub>ОН).

*HCl\*H-His-Rim* (*гидрохлорид L-гистидил-1-адамантаилэтиламина*). К раствору 0,15 г (0,36 мМ) (*Вос*)<sub>2</sub>-*His-Rim* в 2,0 мл этилацетата при 5 °С добавляли 2,4 мл этилацетата, насыщенного 4н HCl. Реак-

ционную смесь выдерживали в течение 1 ч при 20 °С, периодически помешивая. Прохождение реакции контролировали по ТСХ. По завершении реакции продукт высаждали диэтиловым эфиром. Растворители декантировали. Остаток сушили в вакууме. Полученное масло при растирании в смеси диэтиловый эфир – этиловый спирт (9 : 1) кристаллизовалось. Кристаллы растворяли в минимуме этилового спирта и хроматографировали на колонке с силикагелем (элюент MeOH – СНCl<sub>3</sub> 13 : 66).

Выход 0,11 г (92%). Тпл. 210 °С (с разл.); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 6°, R<sub>f</sub> 0,50 (В), R<sub>f</sub> 0,75 (С). Инфракрасная спектроскопия (ИК): ν(NH) – 3248 см<sup>-1</sup>; ν(NH<sup>im</sup>) – 3139 см<sup>-1</sup>; ν(C=O) – 167 см<sup>-1</sup>. Методом масс-спектрометрии (МС) найдено [M+H]<sup>+</sup>: 317,746; [M+Na]<sup>+</sup>: 339,761; вычислено М (C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O) 316,441. Методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР): 1H ЯМР (D<sub>2</sub>O, м.д.), δ: 8.77 C2(д. 1H J=16.1 Гц), 7.48 C4(д. 1H J=17.1 Гц), 4.29 C5(м. 1H), 3.47 C6(м. 1H), 3.29 C11(м. 2H), 1.79 C10(м. 3H), 1.6-1.3 C7,C8(м. 12H), 0.79 C12(д. 3H J=17.1 Гц). 13C ЯМР (D<sub>2</sub>O, м.д.), δ: 166.9(C1), 134.1(C2), 126.3(C3), 118.4(C4), 54.7(C5), 52.5(C6), 37.7(C7), 36.3(C8), 35.1(C9), 27.8(C10), 26.2(C11), 13.1(C12).

*Вирус*. Вирус получен из Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Иванова «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. В работе использовали высоковирулентный штамм вируса гриппа А птиц (H5N1), A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) [12]. Вирусосодержащий материал представлял собой культуральную жидкость, собранную из заражённых вирусом А(H5N1) культур клеток почки эмбриона свиней (СПЭВ) на высоте развития цитопатических проявлений. Инфекционный титр штаммов вируса для культур клеток Vero-V 4,0 lg 50% тканевой цитопатической инфекционной дозы (ТЦИД<sub>50</sub>/100 мкл). Множественность заражения составляла около 0,1 ТЦИД<sub>50</sub>/кл.

*Клетки*. Опыты по выявлению противовирусных свойств соединений проводили на 96-луночных планшетах со сформировавшимся монослоем клеток линии Vero (клетки эпителия почки африканской зеленой маргаритки (*Chlorocebus aethiops*)). Клеточная линия Vero-E6 была чувствительна к репродук-

Подавление репликации вируса гриппа А/H5N1 соединениями в условиях *in vitro*

Время внесения соединений	Соединение	Рабочие концентрации соединений, мкг/мл											Без препаратов
		250,0	125	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9	1,9	0,9	0,45	0,22	
		количество погибших клеток, %											
За 6 ч до заражения	Арбидол	ЦД <sub>75</sub>	0	0	0	50	100	100	100	100	100	100	100
	H-His-Rim	ЦД <sub>100</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	25	50	100
В момент заражения	Арбидол	ЦД <sub>75</sub>	0	0	0	50	100	100	100	100	100	100	100
	H-His-Rim	ЦД <sub>100</sub>	0	0	0	0	0	0	0	0	50	100	100
Через 6 ч после заражения	Арбидол	ЦД <sub>75</sub>	0	0	50	100	100	100	100	100	100	100	100
	H-His-Rim	ЦД <sub>50</sub>	5	15	10	5	15	20	40	50	75	100	100

Примечание. ЦД – цитотоксическая доза, при которой погибает 50, 75, или 100% клеточного монослоя в результате токсического действия вещества.

ции вируса гриппа А/Н5N1. Выращивали монослой в пластиковых планшетах с использованием ростовой среды Игла МЭМ («ПанЭко», Москва), соединённой с 7% эмбриональной телячьей сывороткой («ПанЭко», Москва) при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> с добавлением глутамина 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).

### Результаты

Оценка противовирусной активности соединения 2HCl\*H-His-Rim по сравнению с противогриппозным препаратом «Арбидол» в отношении вируса A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1). Противовирусную активность исследуемых соединений тестировали *in vitro* в трёх схемах внесения соединений и вируса на монослой клеток: за 6 ч до заражения вирусом (профилактический эффект соединения), в момент заражения (лечебно-профилактический эффект) и через 6 ч после заражения (лечебный эффект). Противовирусную активность соединений определяли по состоянию клеточного монослоя после окрашивания метиленовой синькой с помощью цитометра. В опыте изучали способность соединений защищать клеточный монослой (% выживших клеток) Vero-E6 от цитопатического действия высоковирулентного штамма вируса гриппа A/duck/Novosibirsk/56/06 (H5N1) [12] при различных схемах введения и концентрациях исследуемых соединений.

Готовили растворы соединений: H-His-Rim 10 мг в 1 мл H<sub>2</sub>O, арбидол 10 мг в DMSO, после чего делали 10-кратные разведения каждого соединения на среде Игла МЭМ и получали концентрацию препаратов, равную 1,0 мг/мл. Затем делали двукратные разведения препаратов и в опытах использовали разведения соединений от 1 : 4 до 1 : 4096, что соответствовало концентрациям препаратов от 250 до 0,22 мкг/мл. По 50 мкл каждой из полученных концентраций вносили в лунки с монослоем клеток. Данные представлены в таблице.

Видно, что производное римантадина гидрохлорида с остатком гистидина эффективно защищало монослой клеток Vero-E6, в предложенных схемах внесения соединения ИД<sub>50</sub> составила:

0,22 мкг/мл (0,00094 μM) до инфицирования;

0,45 мкг/мл (0,0014 μM) для одномоментного введения;

0,9 мкг/мл (0,0028 μM) для лечебной схемы введения.

Препарат «Арбидол» достигал ИД<sub>50</sub> при более высоких концентрациях. ИД<sub>50</sub> составила 15,6 мкг/мл (0,032 μM) для схем до инфицирования и одномоментного введения и 31,2 мкг/мл (0,065 μM) для лечебной схемы введения.

Токсичность ЦД<sub>50</sub> соединений в отношении клеточного монослоя Vero-E6 оказалась соизмеримой, несколько менее 250 мкг/мл или около 0,5 μM (см. табли-

цу). Аналогичные результаты ЦД<sub>50</sub> для арбидола в отношении клеточной линии Vero получили авторы [13].

### Обсуждение

Экономически доступный и выгодный путь, позволяющий восстановить противовирусную активность карбоцикла адамантана, это присоединение к его аминогруппе дополнительных функционально-активных групп (имдазольной, гуанидиновой и др.), используя аминокислоты или пептиды. Аминокислоты и другие физиологически активные соединения конденсировали с римантадином методами классического пептидного синтеза и в результате биологического скрининга было отобрано соединение-лидер 2HCl\*H-His-Rim [14].

В результате сравнения противовирусных свойств *in vitro* в отношении высоковирулентного штамма А/Н5N1 предложенного соединения и коммерческого препарата «Арбидол» были получены различные значения. Разница в уровне противовирусной активности этих двух соединений объясняется различными механизмами действия на вирусную частицу. Предположительный механизм действия H-His-Rim, вероятно, сходен с механизмом действия римантадина, т.е. он является блокатором протон-селективного канала M2 в оболочке вируса гриппа А.

### Заключение

Полученные значения эффективных концентраций для соединения 2HCl\*H-His-Rim в отношении высокопатогенного штамма вируса гриппа А/Н5N1 были несколько меньше, чем для известного лекарственного препарата «Арбидол». Таким образом, предложенное синтетическое соединение проявляло противовирусный эффект при меньших концентрациях, чем арбидол. Соединение 2HCl\*H-His-Rim ввиду его достаточно высокой эффективности, а также экономической и синтетической доступности может быть рекомендовано в качестве кандидата на доклинические и клинические испытания с целью получения этиотропного противовирусного препарата на его основе. Такой препарат может быть использован и для профилактики, и для лечения заболевания, вызванного современными штаммами вирусов гриппа А, как самостоятельное средство, так и в составе комплексной терапии.

**Финансирование.** Публикация подготовлена при поддержке «Университетской программы РУДН 5-100».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-10, 13 см. REFERENCES)

11. Дерябин П.Г., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Ботиков А.Г., Шибнев В.А. Аминокислотные производные адамантанового карбоцикла способны ингибировать репликацию высоковирулентного вируса птичьего гриппа А/Н5N1. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2014; 157(1): 73-6.
12. Прилипов А.Г., Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Алипер Т.И., Дерябин П.Г., Непоклонов Е.А. и др. Метод первичной изоляции штаммов вируса гриппа А, штамм virus A/duck/Novosibirsk/56/05 H5N1 для приготовления диагностических,

профилактических и лечебных препаратов, для оценки противовирусной активности различных соединений. Патент РФ 2309983; 2005.

14. Шибнев В.А., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Шевченко Е.С., Бурцева Е.И. Некоторые пути преодоления резистентности вирусов гриппа А к препаратам адамантанового ряда. *Химико-фармацевтический журнал*. 2012; 46(1): 36-40.

## REFERENCES

1. Stouffer A.L., Acharya R., Salom D., Levine A.S., Di Costanzo L., Soto C.S., et al. Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature*. 2008; 451(7178): 596-9. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature06528>
2. Duong-Ly K.C., Nanda V., Degrado W.F., Howard K.P. The conformation of the pore region of the M2 proton channel depends on lipid bilayer environment. *Protein Sci*. 2005; 14(4): 856-61. DOI: <https://doi.org/10.1110/ps.041185805>
3. Bright R.A., Medina M.J., Xu X., Perez-Oronoz G., Wallis T.R., Davis X.M., et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet*. 2005; 366(9492): 1175-81. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67338-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67338-2)
4. Wang C., Takeuchi K., Pinto L.H., Lamb R.A. Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. *J. Virol*. 1993; 67(9): 5585-94.
5. WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 and other Influenza Viruses: Part I. Geneva: WHO; 2010.
6. Centers for Disease Control and Prevention Recommendations: CS HCVG-15-FLU-107; 2018.
7. Boriskin Y., Leneva I., Pécheur E.I., Polyak S.J. Arbidol: a broad-spectrum antiviral compound that blocks viral fusion. *Curr. Med. Chem*. 2008; 15(10): 997-1005. DOI: <https://doi.org/10.2174/092986708784049658>
8. Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S., Hay A.J. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral Res*. 2009; 81(2): 132-40. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.10.009>
9. Nasser Z.H., Swaminathan K., Müller P., Downard K.M. Inhibition of influenza hemagglutinin with the antiviral inhibitor arbidol using a proteomics based approach and mass spectrometry. *Antiviral Res*. 2013; 100(2): 399-406. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.08.021>
10. Brancato V., Peduto A., Wharton S., Martin S., More V., Di Mola A., et al. Design of inhibitors of influenza virus membrane fusion: synthesis, structure-activity relationship and in vitro antiviral activity of a novel indole series. *Antiviral Res*. 2013; 99(2): 125-35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.05.005>
11. Deryabin P.G., Garaev T.M., Finogenova M.P., Botikov A.G., Shibnev V.A. Amino Acid Derivatives of Adamantane Carbocycle are Capable of Inhibiting Replication of Highly Virulent Avian Influenza A/H5N1 Virus. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2014; 157(1): 73-6. (in Russian)
12. Prilipov A.G., L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Aliper T.I., Deryabin P.G., Nepoklonov E.A., et al. Method of primary isolation of strains of influenza A virus, strain virus A/duck/Novosibirsk/56/05 H5N1 for preparation of diagnostic, prophylactic and medical preparations, for evaluation of antiviral activity of different compounds. Patent RF 2309983; 2005. (in Russian)
13. Haviernik J., Štefánik M., Fojtíková M., Kali S., Tordo N., Rudolf I., et al. Arbidol (Umifenovir): A Broad-Spectrum Antiviral Drug That Inhibits Medically Important Arthropod-Borne Flaviviruses. *Viruses*. 2018; 10(4): E184. DOI: <https://doi.org/10.3390/v10040184>
14. Shibnev V.A., Garaev T.M., Finogenova M.P., Shevchenko E.S., Burtseva E.I. Some Pathways to Overcoming Drug Resistance of Influenza a Virus. *Xhimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2012; 46(1): 36-40. (in Russian)

Поступила 03.12.19

Принята в печать 24.12.19