



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-147>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023



# Противовирусные свойства синтетических производных гистидина, содержащих в своей молекуле мембранотропные объёмные карбоциклы, в отношении вируса SARS-CoV-2 *in vitro*

Гараев Т.М.<sup>1</sup>, Гребенникова Т.В.<sup>1</sup>, Авдеева В.В.<sup>2</sup>, Лебедева В.В.<sup>1</sup>, Ларичев В.Ф.<sup>1</sup><sup>1</sup>Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи, 123098, г. Москва, Россия;<sup>2</sup>Институт общей и неорганической химии имени Н.С. Курнакова Российской академии наук, 119991, г. Москва, Россия

**Введение.** В настоящее время разрабатывается целый ряд низкомолекулярных соединений в качестве потенциальных ингибиторов репликации CoVs, направленных на различные этапы репликационного цикла, такие как ингибиторы основной протеазы и аналоги нуклеозидов. Альтернативной белковой мишенью могут выступать виropорины.

**Цель исследования** – выявление противовирусных свойств производных гистидина с каркасными заместителями в отношении пандемического штамма коронавируса SARS-CoV-2 *in vitro*.

**Материалы и методы.** Получение соединения гистидина с аминоадаммантаном и декагидро-клозо-декаборатным анионом  $[B_{10}H_{10}]^{2-}$  проведено методами классического пептидного синтеза. Структура соединения подтверждена современными физико-химическими методами. Противовирусные свойства синтетических соединений изучены *in vitro* на монослое клеток Vero E6, инфицированных SARS-CoV-2 (штамм альфа), при одномоментном внесении соединений и вируса.

**Результаты.** Синтезированы производные аминокислоты гистидина с карбоциклами и кластерными анионами бора, и исследована их противовирусная активность в отношении коронавируса SARS-CoV-2 *in vitro*. На клеточных культурах показано, что производные гистидина с карбоциклами и кластерным анионом бора  $[B_{10}H_{10}]^{2-}$  обладают способностью подавлять репликацию вируса. Также была показана возможность увеличения растворимости субстанции в водных средах за счёт образования хлоргидрата или натриевой соли.

**Обсуждение.** Соединение I  $2HCl \cdot H-His-Rim$  проявляло некоторый эффект подавления репликации вируса SARS-CoV-2 при вирусной нагрузке 100 доз и концентрации 31,2 мкг/мл. Наиболее очевидным объяснением противовирусного действия соединения I на угнетение репликации SARS-CoV-2 в эксперименте *in vitro* могут являться слабоосновные свойства, которые проявляет это соединение.

**Заключение.** Представленные синтетические соединения проявили умеренную противовирусную активность в отношении варианта коронавируса SARS-CoV-2. Полученные соединения могут быть использованы в качестве модельных структур для создания нового препарата прямого действия против современных штаммов коронавирусов.

**Ключевые слова:** производные адамантана; аминокислота гистидин; противовирусная активность; SARS-CoV-2; кластерные анионы бора

**Для цитирования:** Гараев Т.М., Гребенникова Т.В., Авдеева В.В., Лебедева В.В., Ларичев В.Ф. Противовирусные свойства синтетических производных гистидина, содержащих в своей молекуле мембранотропные объёмные карбоциклы, в отношении вируса SARS-CoV-2 *in vitro*. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(1): 18-25. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-147>

**Для корреспонденции:** Гараев Тимур Мансурович, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи, 123098, г. Москва, Россия. E-mail: [tmgaraev@gmail.com](mailto:tmgaraev@gmail.com)

**Участие авторов:** Гараев Т.М. – идея использования производных кластеров аниона бора с аминокислотными остатками в качестве противовирусных средств, молекулярный дизайн структуры будущего ингибитора, анализ и предсказание свойств молекул карбоциклов и борного кластера, замещенных аминокислотными остатками, методами молекулярного моделирования *in silico*, синтез соединений остатка гистидина с карбоциклическими фрагментами, введение гистидинового фрагмента в борный кластер за счёт проведения реакции с замещенным производным  $[2-B_{10}H_9OC_4H_8COOH]^{2-}$ , написание текста статьи; Гребенникова Т.В. – общее руководство и разработка концепции исследования нового класса соединений, постановка задачи и контроль над выполнением эксперимента, согласование условий постановки эксперимента и анализ результатов; Авдеева В.В. – синтез исходных солей декагидро-клозо-декаборатного аниона, проведение многостадийной функционализации борного кластера: введение в кластер оксониевого заместителя с образованием  $[B_{10}H_9OC_4H_8]^-$ , его нуклеофильное раскрытие, гидролиз полученного замещенного производного  $[B_{10}H_9OC_4H_8CN]^{2-}$  с образованием клозо-декаборатного аниона с COOH группой  $[B_{10}H_9OC_4H_8COOH]^{2-}$ , редактирование текста статьи, перевод на английский язык; Лебедева В.В. – контроль за выполнением эксперимента, согласование условий постановки и результатов эксперимента по синтезу целевого соединения, определение стратегии проведения эксперимента *in vitro*, анализ результатов эксперимента,

редактирование текста статьи; Ларичев В.Ф. – разработка концепции и проведение эксперимента *in vitro*: изучение специфической активности производных в отношении пандемического штамма коронавируса SARS-CoV-2 на клетках культуры ткани Vero E6.

**Финансирование.** Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии потенциальных конфликтов интересов.

Поступила 02.11.2022  
Принята в печать 30.12.2022  
Опубликована 28.02.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-147>

## Antiviral properties of synthetic histidine derivatives containing membranotropic volumetrical carbocycles in their molecule against SARS-CoV-2 virus *in vitro*

Timur M. Garaev<sup>1</sup>, Tatyana V. Grebennikova<sup>1</sup>, Varvara V. Avdeeva<sup>2</sup>, Varvara V. Lebedeva<sup>1</sup>, Victor F. Larichev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences, 119991, Moscow, Russia

**Introduction.** Currently, low molecular-weight compounds are being developed as potential inhibitors of CoVs replication, targeting various stages of the replication cycle, such as major protease inhibitors and nucleoside analogs. Viroporins can be alternative protein targets.

The **aim** of this study is to identify antiviral properties of histidine derivatives with cage substituents in relation to pandemic strain SARS-CoV-2 *in vitro*.

**Materials and methods.** Combination of histidine with aminoadamantane and boron cluster anion  $[B_{10}H_{10}]^{2-}$  (compounds **I–IV**) was carried out by classical peptide synthesis. Compounds were identified by modern physicochemical methods. Antiviral properties were studied *in vitro* on a monolayer of Vero E6 cells infected with SARS-CoV-2 (alpha strain) with simultaneous administration of compounds and virus.

**Results.** Derivatives of amino acid histidine with carbocycles and boron cluster were synthesized and their antiviral activity against SARS-CoV-2 was studied *in vitro*. Histidine derivatives with carbocycles and  $[B_{10}H_{10}]^{2-}$  have the ability to suppress virus replication. The solubility of substances in aqueous media can be increased due to formation of hydrochloride or sodium salt.

**Discussion.** 2HCl·H-His-Rim (**I**) showed some effect of suppressing replication of SARS-CoV-2 at a viral load of 100 doses and concentration 31.2 µg/ml. This is explained by the weakly basic properties of compound **I**.

**Conclusion.** The presented synthetic compounds showed moderate antiviral activity against SARS-CoV-2. The obtained compounds can be used as model structures for creating new direct-acting drugs against modern strains of coronaviruses.

**Keywords:** adamantane derivatives; histidine amino acid; antiviral activity; SARS-CoV-2; boron cluster anions

**For citation:** Garaev T.M., Grebennikova T.V., Avdeeva V.V., Lebedeva V.V., Larichev V.F. Antiviral properties of synthetic histidine derivatives containing membranotropic volumetrical carbocycles in their molecule against SARS-CoV-2 virus *in vitro*. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(1): 18-25. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-147>

**For correspondence:** Timur M. Garaev, PhD (Biol.), Lead Researcher of the Laboratory of Molecular Diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia. E-mail: [tmgaraev@gmail.com](mailto:tmgaraev@gmail.com)

**Information about the authors:**

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

Grebennikova T.V., <https://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Avdeeva V.V., <https://orcid.org/0000-0002-0655-1052>

Lebedeva V.V., <https://orcid.org/0000-0002-3088-0403>

Larichev V.F., <https://orcid.org/0000-0001-8262-5650>

**Contribution:** Garaev T.M. – the idea of using derivatives of boron anion clusters with amino acid residues as antiviral agents, molecular design of future inhibitor structure, analysis and prediction of molecular properties of carbocycles and boron cluster substituted with amino acid residues by *in silico* molecular simulations, synthesis of compounds of histidine residues with carbocyclic fragments, introduction of histidine fragment into the boron cluster by the reaction with substituted derivative  $[B_{10}H_9OC_4H_8COOH]^{2-}$ , writing the text of the article; Grebennikova T.V. – general management and development of a new class of compounds, problem setting and control of the experiment, agreement of experimental conditions and analysis of results; Avdeeva V.V. – synthesis of initial salts of decahydro-closo-decaborate anion,

multistage functionalization of boron cluster: introduction of oxonium substituent to form  $[B_{10}H_9OC_4H_8]^-$ , its nucleophilic opening, hydrolysis of resulting substituted  $[B_{10}H_9OC_4H_8CN]^{2-}$  derivative to form *closo*-decaborate anion with COOH group  $[B_{10}H_9OC_4H_8COOH]^{2-}$ , editing the text of the article, translation to English; Lebedeva V.V. – supervision of the experiment, reconciliation of the conditions of the experiment and the results of the experiment for the synthesis of the target compound, determination of the strategy of the experiment *in vitro*, analysis of the experiment results, editing the text of the article; Larichev V.F. – conception development and *in vitro* experiment: study of specific activity of derivatives against pandemic strain of coronavirus SARS-CoV-2 on tissue culture cells Vero E6.

**Funding.** The research was funded by the state budget.

**Conflict of interest.** Authors declare no potential conflicts of interest.

Received 2 November 2022

Accepted 30 December 2022

Published 28 February 2023

## Введение

Коронавирусы являются зооантропонозными вирусами, способными инфицировать человека и животных. Современные штаммы коронавируса (CoVs) способны вызывать тяжёлые и смертельные заболевания у людей. Возникновение тяжёлого острого респираторного синдрома (SARS) в 2002 г. и ближневосточного респираторного синдрома (MERS) в 2012 г. подчеркнуло способность CoVs вызывать смертельные заболевания у людей [1–4].

Во время текущей пандемии COVID-19 [5, 6], вызванной новым коронавирусом SARS-CoV-2, меры сдерживания и вакцинация замедлили распространение инфекции, но не смогли полностью предотвратить заболевание среди медицинских работников, пациентов и всего населения планеты.

В связи со вспышкой новых инфекционных заболеваний, вызываемых различными патогенными вирусами, и развитием устойчивости к классическим противовирусным препаратам, фармацевтические компании и многочисленные исследовательские группы ищут новые противовирусные агенты с уникальными химическими и физическими свойствами [7, 8]. На сегодняшний день не существует одобренного терапевтического средства против любого коронавируса человека, но ряд исследуемых противовирусных соединений в данный момент проходят клинические испытания [9–14]. Создание новых противовирусных препаратов против COVID-19 является сложной задачей и требует значительного времени и усилий для разработки и валидации.

В настоящее время разрабатывается целый ряд низкомолекулярных соединений в качестве потенциальных ингибиторов репликации CoVs, направленных на различные этапы репликационного цикла [15]. Некоторые соединения, в частности ингибиторы основной протеазы CoVs, в данный момент проходят заключительные стадии клинических испытаний и ждут одобрения в фармацевтическом комитете. Этот класс соединений представляет собой пептидомиметики, способные ингибировать фермент 3-химотрипсин-подобную протеазу (3CLpro). 3CLpro расщепляет пептид-предшественник по 11 сайтам на отдельные вирусные белки будущего вириона CoVs [16]. Другой класс противовирусных соединений представлен аналогами нуклеозидов, имитирует встречающиеся в природе нуклеозиды для подавления вирусной РНК-зависимой ДНК-полимеразы [17].

Альтернативной белковой мишенью могут выступать небольшие вирусные белки, способные образовывать поры в мембранах клетки и оболочки вирусов – виропорины. Ингибиторы виропоринов могут составить новый класс противовирусных препаратов, способных действовать как самостоятельное лекарство, как в случае препарата Ремантадин в отношении вируса гриппа А, так и, возможно, в составе комплексной терапии. Белки E SARS-CoV-2 имеют длину полипептида 76 аминокислот и один  $\alpha$ -спиральный трансмембранный домен [18, 19]. Белки E способны к образованию пентамерных структур с функцией ионной проводимости [20]. Белок E из CoV представляется наиболее вероятной мишенью для молекул ингибиторов на основе адамантил-аминокислот. Адамантановый карбоциклический остов как липофильный агент в данном случае исполняет роль носителя для остатка аминокислоты или другого физиологически важного соединения. Адамантановый остов является высоко гидрофильным остатком, поэтому в некоторых случаях может быть заменён на другие карбоциклы, такие как норборнен или циклогексан [21].

Нами ранее было показано, что соединение дихлоргида L-гистидил-аминоэтиладамантана (2HCl\*H-His-Rim) проявляло противовирусный эффект против штаммов вируса гриппа А, резистентных к препаратам Амантадин и Ремантадин. Причём это соединение являлось ингибитором функции ионного канала M2 вируса гриппа А [22]. Виропорин M2 жизненно необходим вирусу гриппа А для инфицирования клетки. Это встроенный в вирусную оболочку ионный канал, избирательно проводящий сквозь себя ионы водорода из клетки внутрь вируса. В клетку-хозяина вирус попадает заключённым в эндосомы (мембранные структуры) – своего рода пузырьки. При определённом значении кислотности среды белок M2 активируется и начинает перекачивать ионы водорода, понижая pH внутри вирусной частицы и тем самым вызывая её распад для высвобождения генетического материала вируса в цитоплазму клетки-хозяина.

Белок M2 вируса гриппа А и белок E из CoV имеют схожую вторичную структуру, сравнимую протяжённость аминокислотной последовательности, а также играют важную роль на этапе сборки вируса. Отсюда можно предположить, что эти два виропорина должны быть чувствительны к гомологичным синтетическим соединениям. Таким образом, существуют все предпосылки к тому, что удастся достигнуть эффекта

подавления функции канала, образованного белком E коронавируса, карбоциклическими производными остатка аминокислоты гистидина.

**Цель исследования** – выявление противовирусных свойств производных гистидина с каркасными заместителями в отношении пандемического штамма коронавируса SARS-CoV-2 *in vitro*.

## Материалы и методы

### Синтетические соединения

Рассматриваемые соединения получены методами органического и пептидного синтеза, описанными нами ранее [21, 23, 24]. На **рис. 1** представлены структуры соединений, которые проявляли противовирусную активность в отношении современных штаммов вируса гриппа А. Дихлоргидрат L-гистидил-аминоэтиладамантан (соединение I – 2HCl\*H-His-Rem) [25]; производное *клозо*-декаборатного аниона с остатком метилового эфира гистидина в качестве пendantsкого заместителя, отделённого от борного кластера спейсером  $-O(CH_2)_4CO-$  (соединение II –  $Na_2[B_{10}H_9-O(CH_2)_4CO-His-OMe]$ ) [26, 27]; дихлоргидрат гистидил-дициклогексил амид (соединение III – 2HCl\*H-His-DCHA); дихлоргидрат гистидил-3-гидрокси-аминоэтиладамантан (соединение IV – 2HCl\*H-His-HyRim). Соединения III и IV являются новыми, однако получены методом, аналогичным получению соединения I.

### Вирус

В исследованиях использовали штамм коронавируса человека SARS-CoV-2, пассаж 4, с инфекционной

активностью 106 ТЦИД<sub>50</sub>/мл для клеток Vero E6, депонированный и Государственную коллекцию вирусов РФ ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России № 1301/2 ГКВ.

GISAID: 421275 EPI\_ISL

Russia/Moscow PMVL-1/2020 GISAID Clade GR Clade 20B

Вирус SARS-CoV-2 пассировали и титровали на монослойной культуре Vero E6. Инфекционный титр определяли стандартным методом титрования и рассчитывали по методу Рида и Менча. Лизат культуральной жидкости разливали по аликвотам и сохраняли до проведения исследования при  $-70 \pm 10$  °C.

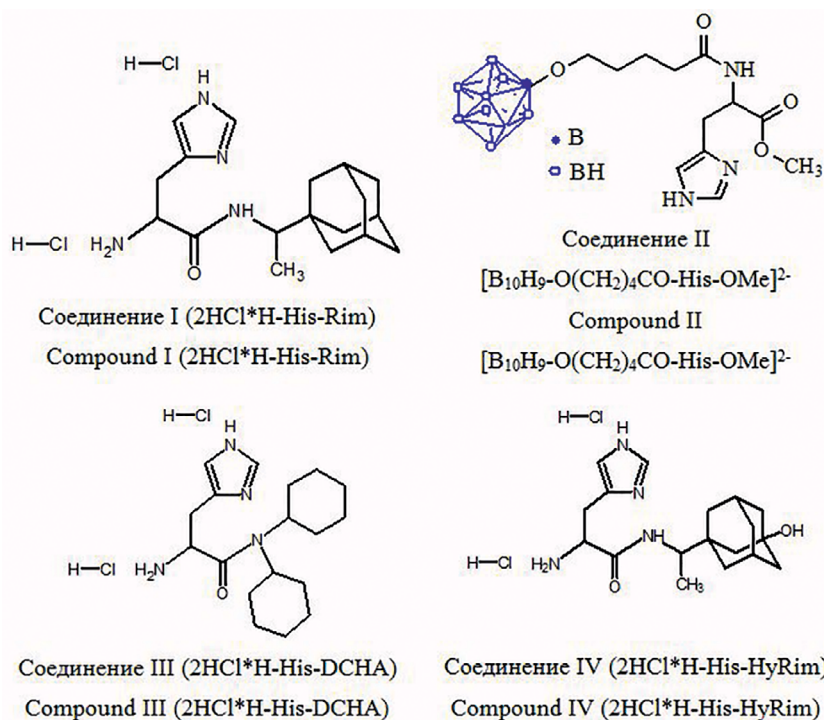
### Культура клеток

В экспериментальной работе использовали перерабатываемую линию клеток почки африканской зелёной мартышки (*Chlorocebus aethiops*) Vero E6 Всероссийской коллекции клеточных культур при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Культивирование клеток осуществляли на среде DMEM. В 96-луночные культуральные плоскодонные планшеты помещали клетки Vero E6 по 12 000 кл/луночку в объёме 100 мкл свежеприготовленной среды DMEM. Культивировали 24 ч при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

### Оценка цитотоксического действия соединений

Эксперимент по оценке цитотоксического действия на культуру клеток проводили в диапазоне 12 концентраций препарата от 2500,0 до 0,5 мкг/мл с шагом два путём разведения исходной концентрации в лунках 96-луночного планшета. После инкубации клеток



**Рис. 1.** Синтетические соединения остатка гистидина с объёмными каркасными заместителями.

**Fig. 1.** Synthetic compounds of histidine residue with bulky cage substituents.

с препаратами в течение 96 ч при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> визуально оценивали состояние клеточного монослоя, сравнивая его с клеточным контролем (без соединений) по четырёхкрестовой схеме, где четыре креста – 100%-я гибель клеток, два креста – 50%-я цитотоксическая концентрация (CC<sub>50</sub>). Таким образом, на основании сравнения состояния клеточного монослоя без препаратов с клетками, содержащими соединения в соответствующей концентрации, определяли цитотоксическое действие соединений на монослой клеток.

#### Оценка противовирусного действия соединений

Оценку вирусной продукции по цитопатическому действию (ЦПД) осуществляли на основе анализа жизнеспособности клеток при помощи микроскопирования с целью визуального определения границы вирусного повреждения клеток, а также для осуществления контроля токсичности доз субстанций.

Эксперимент по оценке жизнеспособности клеток в тесте на противовирусную эффективность проводили в диапазоне концентрации препарата 2500,0... 0,5 мкг/мл путём разведения исходной концентрации в лунках 96-луночного планшета. Противовирусную активность соединений оценивали визуально под микроскопом через 96 ч после инфицирования по ингибированию ЦПД вируса в культуре клеток Vero E6.

#### Результаты

Соединение I проявляло устойчивый эффект подавления репликации вируса SARS-CoV-2 при очень узком диапазоне нетоксичных концентраций 75,0...30,0 мкг/мл и вирусной нагрузке 100 доз. 50%-я цитотоксическая доза составила около 70 мкг/мл, концентрация достижения стабильного противовирусного эффекта – около 31 мкг/мл (таблица). Для снижения токсичности и улучшения противовирусных свойств соединения I адамантановый карбоцикл был заменён на два циклогексановых

остатка в виде дициклогексил амина (2HCl\*H-His-DCHA, соединение III). Токсичность соединения I, действительно, удалось снизить в несколько раз, CC<sub>50</sub> составила 312 мкг/мл, однако противовирусная активность соединения III значительно ниже, чем для соединения I, и составляет около 156 мкг/мл. При этом противовирусный эффект соединения III наблюдался лишь на границе между токсичными и нетоксичными концентрациями. При снижении концентрации ниже 156 мкг/мл противовирусный эффект соединения III исчезал. Причём следует отметить, что произошло ухудшение растворимости соединения III, по сравнению с полностью водорастворимым соединением I. Для растворения соединения III использовали композицию 10% ацетонитрила, 30% 4%-го раствора PEG 1150 в воде и 60% среды DMEM. Другим способом увеличения сродства вещества к белку-мишени для образования дополнительных водородных связей с аминокислотными остатками внутренней поры канала белка E было добавление гидроксильной группы в паре положение в карбоцикл адамантана (соединение IV).

Противовирусные свойства соединения IV, как и соединения III, проявлялись в более высоких концентрациях по сравнению с соединением I. Более того, соединение IV намного хуже растворялось в водной среде, чем соединение I. Такая модификация не привела к улучшению противовирусных свойств соединения I. При высокой действующей концентрации соединения нет перспектив получения высокого химико-терапевтического индекса (по крайней мере, в экспериментах *in vitro*), что является важным фактором для кандидатного соединения. Из предыдущих исследований сравнения соединения гистидина с кластерным анионом бора (соединение II) и соединения I в отношении вируса гриппа А показано, что соединение II несколько превосходило по противовирусным свойствам соединение I [23], 50%-я ингибирующая доза составляла 3,2 мкг/мл против 7,5 мкг/мл для соединения I. Важно, что соединение II имеет высокую растворимость в водной среде, как и соединение I, так как представляет собой динатриевую соль. Испытания противовирусных свойств соединения II в отношении SARS-CoV-2 показали их наличие в диапазоне концентраций 19,5...4,9 мкг/мл.

#### Обсуждение

Соединение I 2HCl\*H-His-Rem проявляло противовирусный эффект против штаммов вируса гриппа А, резистентных к препаратам Амантадин и Ремантадин. Это соединение являлось ингибитором функции ионного канала M2 вируса гриппа А [22]. Существовали некоторые предпосылки к тому, что удастся достигнуть эффекта подавления функции канала, образованного белком E коронавируса. Белок E слабо представлен на поверхности вириона, зато в инфицированных клетках содержится в большом количестве. Белок E в основном распространён во внутриклеточных мембранах между эндоплазматическим ретикулом (ER) и цистерна-

Таблица. Биологические свойства соединений гистидина с каркасными заместителями

Table. Biological properties of histidine derivatives with cage substituents

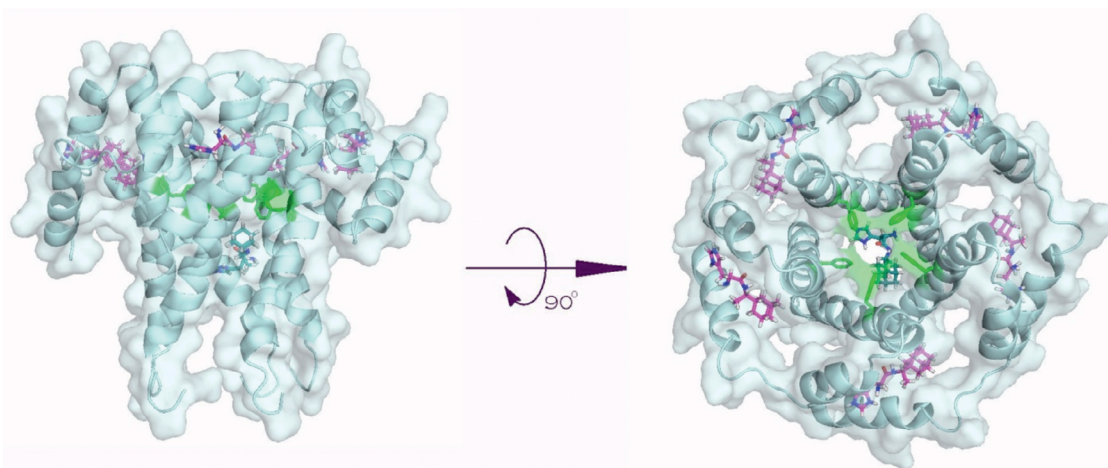
№	Соединение Compound	CC <sub>50</sub> <sup>*</sup> мкг/мл CC <sub>50</sub> <sup>*</sup> mkg/ml	IC <sub>50</sub> <sup>*</sup> мкг/мл IC <sub>50</sub> <sup>*</sup> mkg/ml	SI
1	Соединение I Compound I 2HCl*H-His-Rem	78,1	31,2	2,5
2	Соединение II Compound II Na <sub>2</sub> [B <sub>10</sub> H <sub>9</sub> -O(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CO-His-OMe]	19,5	9,8	2
3	Соединение III Compound III 2HCl*H-His-DCHA,	312,5	156,3	2
4	Соединение IV Compound IV 2HCl*H-His-HyRim	312,5	156,3	2

ми комплекса Гольджи. В этих местах он участвует в сборке вируса и внутриклеточном транспорте. Соединение I проявляло некоторый эффект подавления репликации вируса SARS-CoV-2 при вирусной нагрузке 100 доз и концентрации 31,2 мкг/мл. J.S. Kim и соавт. [28] в своих исследованиях *in silico* с известным блокатором ионных каналов амантадином (1-аминоадамantan) высказали гипотезу, что амантадин блокирует ионный канал SARS-CoV-2, предотвращая выход вирусного ядра в цитоплазму клетки. Для проведения молекулярного компьютерного моделирования стыковки соединения I и кристаллографической структуры белкового канала E был использован онлайн-сервис BIO-NPC Achilles Blind Docking Server. Этот инструмент выполняет исчерпывающую серию расчётов стыковки по всей поверхности белка, чтобы найти места с наилучшей аффинностью к белку мишени. После расчёта сходства этот сервис группирует результаты в соответствии с пространственным перекрытием полученных положений. Структурная модель лиганда (лекарства) была сгенерирована в программном продукте NuragChem 8.0.8 (Nuragcube). Проведя молекулярное моделирование стыковки поверхностей белка и лиганда на модели трансмембранной области виropорина E (PDB: 5X29), удалось получить положительное решение, а именно обнаружение соединения I в сайте сужения канала в окружении остатков Phe26 и Ala22 (рис. 2). Соединение I стерически блокирует пору канала, составленную из пяти субъединиц белка E, образуя нековалентное взаимодействие с кольцом сопряжения фенильных радикалов от остатков Phe26. Соединение-ингибитор также обнаруживается между спиралями отдельных цепей. На рис. 2 представлены пять положений молекул со-

единения I в межспиральном пространстве, и эти решения не эквивалентны для каждой цепи.

Другим объяснением противовирусного действия соединения I на угнетение репликации SARS-CoV-2 в эксперименте *in vitro* могут являться слабоосновные свойства, которые проявляет соединение I. Известно, что повышение pH эндосомального содержимого препятствует распаковке вирусных частиц. Открытая аминогруппа и имидазольная группа действуют как слабое основание, а карбоцикл способен мигрировать через мембраны как гидрофобный агент. В этом случае механизм действия соединения I, скорее, сходен с действием препарата гидроксихлорохин сульфат, который применяли для лечения заболевших в первые месяцы пандемии COVID-19 [29]. Важно отметить, что в результате молекулярного моделирования для соединения III на той же модели виropорина E удалось получить положительное решение, а именно обнаружение молекулы в сайте сужения насосного механизма (Phe26). Но эксперименты, проведённые *in vitro* для соединения I и III, не подтверждают равноценного действия этих соединений на репликацию вируса. Скорее всего, противовирусный эффект достигается лишь за счёт слабоосновных свойств остатка гистидина и поэтому проявляется лишь в высоких концентрациях соединений в лунке планшета.

Цитотоксический эффект соединения II был выше, чем для соединения I, с другой стороны, действующая концентрация была ниже. Полное подавление ЦПД вируса соединением II наблюдалось при концентрации 9,8 мкг/мл против 31,2 мкг/мл для соединения I. Механизм действия соединения II не установлен. Можно предположить, что обнаруженные противовирусные свойства соединения II, вероятно, связаны со стерическими особенностями молекулы,



**Рис. 2.** Комплекс соединения I с трансмембранным доменом пентамера белка E (виropорина) коронавируса SARS-CoV-2 (PDB: 5X29). Представлены виды сверху и сбоку, показаны положения лиганда в поре канала и межспиральном пространстве отдельных субъединиц, сопряжение фенильных колец от остатков Phe26 каждой цепи, которое закрывает и открывает канал для направленного транспорта одновалентных ионов.

**Fig. 2.** Complex of compound I with the transmembrane domain of the E protein pentamer (viroporin) of the SARS-CoV-2 coronavirus (PDB: 5X29). Top and side views are shown. The figure shows the positions of the ligand in the channel pore and in the intercoil space of individual subunits. The conjugation of phenyl rings from the Phe26 residues of each chain is shown, which closes and opens the channel for directed transport of monovalent ions.

позволяющими заблокировать функцию виropорина. Известно, что виropорин E SARS-CoV обладает активностью ионного канала для одновалентных катионов с 10-кратным предпочтением к ионам натрия, по сравнению с ионами калия [30]. Находясь внутри поры канала, анион соединения II обладает способностью захвата в координационную сферу положительно заряженных ионов, что нарушает функцию виropорина, направленную на создание благоприятного гомеостаза, созревания и внутриклеточного транспорта белков вируса.

### Заключение

Представленные синтетические соединения проявили умеренную противовирусную активность в отношении варианта коронавируса SARS-CoV-2. Полученные соединения могут быть использованы в качестве модельных структур для создания нового препарата прямого действия против современных штаммов коронавируса. Белок E коронавируса представляется наиболее вероятной мишенью для молекул ингибиторов на основе адамантил-аминокислот. Потенциально полученные результаты можно применить для других виropоринов РНК-содержащих вирусов, таких как V<sub>ри</sub> из вируса иммунодефицита человека 1-го типа, p7 из вируса гепатита С, E5 из папилломавируса и вируса бычьей диареи (BVDV), NSP-4 из ротавируса и других вирусных ионных каналов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ksiazek T.G., Erdman D., Goldsmith C.S., Zaki S.R., Peret T., Emery S., et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348(20): 1953–66. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030781>
2. McIntosh K., Kapikian A.Z., Turner H.C., Hartley J.W., Parrott R.H., Chanock R.M. Seroepidemiologic studies of coronavirus infection in adults and children. *Am. J. Epidemiol.* 1970; 91(6): 585–92. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a121171>
3. Gaunt E.R., Hardie A., Claas E.C.J., Simmonds P., Templeton K.E. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(8): 2940–7. <https://doi.org/10.1128/JCM.00636-10>
4. Walsh E.E., Shin J.H., Falsey A.R. Clinical impact of human coronaviruses 229E and OC43 infection in diverse adult populations. *J. Infect. Dis.* 2013; 208(10): 1634–42. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit393>
5. Yao N., Wang S.N., Lian J.Q., Sun Y.T., Zhang G.F., Kang W.Z., et al. Clinical characteristics and influencing factors of patients with novel coronavirus pneumonia combined with liver injury in Shaanxi region. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2020; 28(3): 234–9. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn501113-20200226-00070> (in Chinese)
6. Hu L.L., Wang W.J., Zhu Q.J., Yang L. Novel coronavirus pneumonia related liver injury: etiological analysis and treatment strategy. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2020; 28(2): 97–9. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2020.02.001> (in Chinese)
7. Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramirez J.T., et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2005; 16(10): 2346–53. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
8. Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J., et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine.* 2007; 3(1): 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
9. Brown A.J., Won J.J., Graham R.L., Dinno K.H. 3<sup>rd</sup>, Sims A.C., Feng J.Y., et al. Broad spectrum antiviral remdesivir inhibits human endemic and zoonotic deltacoronaviruses with a highly divergent RNA dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.* 2019; 169: 104541. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104541>
10. de Wit E., Feldmann F., Cronin J., Jordan R., Okumura A., Thomas T., et al. Prophylactic and therapeutic remdesivir (GS-5734)

treatment in the rhesus macaque model of MERS-CoV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020; 117(12): 6771–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922083117>

11. Sheahan T.P., Sims A.C., Graham R.L., Menachery V.D., Gralinski L.E., Case J.B., et al. Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. *Sci. Transl. Med.* 2017; 9(396): eaal3653. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal3653>
12. de Wilde A.H., Jochmans D., Posthuma C.C., Zevenhoven-Dobbe J.C., van Nieuwkoop S., Bestebroer T.M., et al. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(8): 4875–84. <https://doi.org/10.1128/aac.03011-14>
13. Choy K.T., Wong A.Y., Kaewpreedee P., Sia S.F., Chen D., Hui K.P.Y., et al. Remdesivir, lopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro. *Antivir. Res.* 2020; 178: 104786. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104786>
14. Sanders J.M., Monogue M.L., Jodlowski T.Z., Cutrell J.B. Pharmacologic treatments for coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *JAMA.* 2020; 323(18): 1824–36. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6019>
15. Mestres J. The target landscape of N4-hydroxycytidine based on its chemical neighborhood. *bioRxiv.* 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.016485v1>
16. Zhu J., Zhang H., Lin Q., Lyu J., Lu L., Chen H., et al. Progress on SARS-CoV-2 3CLpro Inhibitors: Inspiration from SARS-CoV 3CLpro Peptidomimetics and Small-Molecule Anti-Inflammatory Compounds. *Drug Des. Devel. Ther.* 2022; 16: 1067–82. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S359009>
17. Zhou S., Hill C.S., Sarkar S., Tse L.V., Woodburn B.M.D., Schnitz R.F., et al.  $\beta$ -d-N4-hydroxycytidine inhibits SARS-CoV-2 through lethal mutagenesis but is also mutagenic to mammalian cells. *J. Infect. Dis.* 2021; 224(3): 415–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab247>
18. Parthasarathy K., Lu H., Surya W., Vararattanavech A., Pervushin K., Torres A. Expression and purification of coronavirus envelope proteins using a modified beta-barrel construct. *Protein Expr. Purif.* 2012; 85(1): 133–41. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.07.005>
19. Li Y., Surya W., Claudine S., Torres J. Structure of a conserved Golgi complex-targeting signal in coronavirus envelope proteins. *J. Biol. Chem.* 2014; 289(18): 12535–49. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.560094>
20. Cao Y., Yang R., Lee I., Zhang W., Sun J., Wang W., et al. Characterization of the SARS-CoV-2 E protein: sequence, structure, viroporin, and inhibitors. *Protein Sci.* 2020; 30(6): 1114–30. <https://doi.org/10.1002/pro.4075>
21. Шибнев В.А., Дерябин П.Г., Гараев Т.М., Финогонова М.П., Ботиков А.Г., Мишин Д.В. Пептидные производные карбоциклов как ингибиторы функции виropоринов РНК-содержащих вирусов. *Биоорганическая химия.* 2017; 43(5): 491–500. <https://doi.org/10.7868/S0132342317050153>
22. Garaev T.M., Odnorov A.I., Grebennikova T.V., Finogenova M.P., Sadykova G.K., Prilipov A.G., et al. Studying the effect of amino acid substitutions in the M2 ion channel of the influenza virus on the antiviral activity of the aminoadamantane derivative in vitro and in silico. *Adv. Pharm. Bull.* 2021; 11(4): 700–11. <https://doi.org/10.34172/apb.2021.079>
23. Avdeeva V.V., Garaev T.M., Breslav N.V., Burtseva E.I., Grebennikova T.V., Zhdanov A.P., et al. New type of RNA virus replication inhibitor based on decahydro-closo-decaborate anion containing amino acid ester pendant group. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2022; 27(4-5): 421–9. <https://doi.org/10.1007/s00775-022-01937-4>
24. Дерябин П.Г., Гараев Т.М., Финогонова М.П., Оdnorov A.I. Оценка противовирусной активности соединения 2HCl\*H-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): 268–73. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-268-273>
25. Шибнев В.А., Гараев Т.М., Финогонова М.П., Шевченко Е.С., Бурцева Е.И. Производные 1-(1-адамантил)этиламина и их противовирусная активность. Патент РФ RU 2461544 C1; 2011.
26. Гараев Т.М., Гребенникова Т.В., Авдеева В.В., Малинина Е.А., Кузнецов Н.Т., Жижин К.Ю. и др. Аминокислотное производное декагидро-клозо-декаборатного аниона и его противовирусная активность в отношении вируса гриппа А. Патент РФ RU 2749006 C1; 2020.

27. Авдеева В.В., Гараев Т.М., Малинина Е.А., Жижин К.Ю., Кузнецов Н.Т. Пептидные производные карбоциклов как ингибиторы функции виropopинов РНК-содержащих вирусoв. *Биоорганическая химия*. 2017; 43(5): 491–500. <https://doi.org/10.7868/S0132342317050153>
28. Abreu G.E.A., Aguilar M.E.H., Covarrubias D.H., Durán F.R. Amantadine as a drug to mitigate the effects of COVID-19. *Med Hypotheses*. 2020; 140: 109755. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109755>
29. Yao X., Ye F., Zhang M., Cui C., Huang B., Niu P., et al. In vitro antiviral activity and projection of optimized dosing design of hydroxychloroquine for the treatment of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15): 732–9. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa237>
30. Wilson L., McKinlay C., Gage P., Ewart G. SARS Coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. *Virology*. 2004; 330(1): 322–31. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.09.033>

## REFERENCES

1. Ksiazek T.G., Erdman D., Goldsmith C.S., Zaki S.R., Peret T., Emery S., et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348(20): 1953–66. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030781>
2. McIntosh K., Kapikian A.Z., Turner H.C., Hartley J.W., Parrott R.H., Chanock R.M. Seroprevalence studies of coronavirus infection in adults and children. *Am. J. Epidemiol.* 1970; 91(6): 585–92. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a121171>
3. Gaunt E.R., Hardie A., Claas E.C.J., Simmonds P., Templeton K.E. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(8): 2940–7. <https://doi.org/10.1128/JCM.00636-10>
4. Walsh E.E., Shin J.H., Falsey A.R. Clinical impact of human coronaviruses 229E and OC43 infection in diverse adult populations. *J. Infect. Dis.* 2013; 208(10): 1634–42. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit393>
5. Yao N., Wang S.N., Lian J.Q., Sun Y.T., Zhang G.F., Kang W.Z., et al. Clinical characteristics and influencing factors of patients with novel coronavirus pneumonia combined with liver injury in Shaanxi region. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2020; 28(3): 234–9. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn501113-20200226-00070> (in Chinese)
6. Hu L.L., Wang W.J., Zhu Q.J., Yang L. Novel coronavirus pneumonia related liver injury: etiological analysis and treatment strategy. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2020; 28(2): 97–9. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2020.02.001> (in Chinese)
7. Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramirez J.T., et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005; 16(10): 2346–53. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
8. Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J., et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007; 3(1): 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>
9. Brown A.J., Won J.J., Graham R.L., Dinnon K.H. 3<sup>rd</sup>, Sims A.C., Feng J.Y., et al. Broad spectrum antiviral remdesivir inhibits human endemic and zoonotic deltacoronaviruses with a highly divergent RNA dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.* 2019; 169: 104541. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104541>
10. de Wit E., Feldmann F., Cronin J., Jordan R., Okumura A., Thomas T., et al. Prophylactic and therapeutic remdesivir (GS-5734) treatment in the rhesus macaque model of MERS-CoV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020; 117(12): 6771–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922083117>
11. Sheahan T.P., Sims A.C., Graham R.L., Menachery V.D., Gralinski L.E., Case J.B., et al. Broad-spectrum antiviral GS-5734 inhibits both epidemic and zoonotic coronaviruses. *Sci. Transl. Med.* 2017; 9(396): eaal3653. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal3653>
12. de Wilde A.H., Jochmans D., Posthuma C.C., Zevenhoven-Dobbe J.C., van Nieuwkoop S., Bestebroer T.M., et al. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(8): 4875–84. <https://doi.org/10.1128/aac.03011-14>
13. Choy K.T., Wong A.Y., Kaewpreedee P., Sia S.F., Chen D., Hui K.P.Y., et al. Remdesivir, Iopinavir, emetine, and homoharringtonine inhibit SARS-CoV-2 replication in vitro. *Antivir. Res.* 2020; 178: 104786. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104786>
14. Sanders J.M., Monogue M.L., Jodlowski T.Z., Cutrell J.B. Pharmacologic treatments for coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *JAMA*. 2020; 323(18): 1824–36. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.6019>
15. Mestres J. The target landscape of N4-hydroxycytidine based on its chemical neighborhood. *bioRxiv*. 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.016485v1>
16. Zhu J., Zhang H., Lin Q., Lyu J., Lu L., Chen H., et al. Progress on SARS-CoV-2 3CLpro Inhibitors: Inspiration from SARS-CoV 3CLpro Peptidomimetics and Small-Molecule Anti-Inflammatory Compounds. *Drug Des. Devel. Ther.* 2022; 16: 1067–82. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S359009>
17. Zhou S., Hill C.S., Sarkar S., Tse L.V., Woodburn B.M.D., Schinazi R.F., et al.  $\beta$ -d-N4-hydroxycytidine inhibits SARS-CoV-2 through lethal mutagenesis but is also mutagenic to mammalian cells. *J. Infect. Dis.* 2021; 224(3): 415–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab247>
18. Parthasarathy K., Lu H., Surya W., Varattanavech A., Peruvushin K., Torres A. Expression and purification of coronavirus envelope proteins using a modified beta-barrel construct. *Protein Expr. Purif.* 2012; 85(1): 133–41. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.07.005>
19. Li Y., Surya W., Claudine S., Torres J. Structure of a conserved Golgi complex-targeting signal in coronavirus envelope proteins. *J. Biol. Chem.* 2014; 289(18): 12535–49. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.560094>
20. Cao Y., Yang R., Lee I., Zhang W., Sun J., Wang W., et al. Characterization of the SARS-CoV-2 E protein: sequence, structure, viroporin, and inhibitors. *Protein Sci.* 2020; 30(6): 1114–30. <https://doi.org/10.1002/pro.4075>
21. Shibnev V.A., Deryabin P.G., Garaev T.M., Finogenova M.P., Botikov A.G., Mishin D.V. Peptide carbocyclic derivatives as inhibitors of the viroporin function of RNA-containing viruses. *Bioorganicheskaya khimiya*. 2017; 43(5): 491–500. <https://doi.org/10.7868/S0132342317050153> (in Russian)
22. Garaev T.M., Odnovorov A.I., Grebennikova T.V., Finogenova M.P., Sadykova G.K., Prilipov A.G., et al. Studying the effect of amino acid substitutions in the M2 ion channel of the influenza virus on the antiviral activity of the aminoadamantane derivative in vitro and in silico. *Adv. Pharm. Bull.* 2021; 11(4): 700–11. <https://doi.org/10.34172/apb.2021.079>
23. Avdeeva V.V., Garaev T.M., Breslav N.V., Burtseva E.I., Grebennikova T.V., Zhdanov A.P., et al. New type of RNA virus replication inhibitor based on decahydro-closo-decaborate anion containing amino acid ester pendant group. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2022; 27(4-5): 421–9. <https://doi.org/10.1007/s00775-022-01937-4>
24. 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*. 2019; 64(6): 268–73. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-268-273> (in Russian)
25. Shibnev V.A., Garaev T.M., Finogenova M.P., Shevchenko E.S., Burtseva E.I. Derivatives of 1-(1-adamantyl)ethylamine and their antiviral activity. Patent RF 2461544 C1; 2011. (in Russian)
26. Garaev T.M., Grebennikova T.V., Avdeeva V.V., Malinina E.A., Kuznetsov N.T., Zhizhin K.Yu., et al. Amino acid derivative of decahydrocloso-decaborate anion and its antiviral activity against influenza A virus. Patent RF 2749006 C1; 2020. (in Russian)
27. Avdeeva V.V., Garaev T.M., Malinina E.A., Zhizhin K.Yu., Kuznetsov N.T. Peptide carbocyclic derivatives as inhibitors of the viroporin function of RNA-containing viruses. *Bioorganicheskaya khimiya*. 2017; 43(5): 517–525. <https://doi.org/10.7868/S0132342317050153>
28. Abreu G.E.A., Aguilar M.E.H., Covarrubias D.H., Durán F.R. Amantadine as a drug to mitigate the effects of COVID-19. *Med Hypotheses*. 2020; 140: 109755. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109755>
29. Yao X., Ye F., Zhang M., Cui C., Huang B., Niu P., et al. In vitro antiviral activity and projection of optimized dosing design of hydroxychloroquine for the treatment of severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15): 732–9. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa237>
30. Wilson L., McKinlay C., Gage P., Ewart G. SARS Coronavirus E protein forms cation-selective ion channels. *Virology*. 2004; 330(1): 322–31. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.09.033>