

© Коллектив авторов, 2012

В. В. Зарубаев¹, О. И. Киселёв¹, А. А. Штро¹, А. Д. Зорина², Л. В. Балыкина²,
Н. А. Есипенко², В. В. Анохина², Т. В. Букреева³

СИНТЕЗ И ПРОТИВОГРИППОЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ МЕРИСТОТРОПОВОЙ И МАЦЕДОНИКОВОЙ КИСЛОТ

¹ Научно-исследовательский институт гриппа РАМН, Санкт-Петербург, Россия;

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

³ Ботанический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

Исследована противовирусная активность природных тритерпеновых кислот — меристотроповой и мацедониновой — и их синтетических производных. Активность соединений изучена в отношении вирусов гриппа А и В в клеточной культуре MDCK и на модели летальной гриппозной пневмонии у мышей. Показано, что наибольшую активность *in vitro* проявляют меристотроповая кислота и метиловый эфир мацедониновой кислоты. При этом отмечалась корреляция между активностью этих соединений в отношении вируса гриппа А и гриппа В. В то же время некоторые из изученных веществ при отсутствии активности *in vitro* проявляли протективные свойства *in vivo*. Этот факт говорит о наличии у них иного механизма активности, не связанного с воздействием на вирусспецифическую мишень. Полученные результаты позволяют рассматривать производные меристотроповой и мацедониновой кислот как перспективную группу соединений для создания новых эффективных противогриппозных препаратов.

Ключевые слова: тритерпены; меристотроповая кислота; мацедониновая кислота; грипп; противовирусная активность.

Несмотря на успехи в создании вакцин и средств химиотерапии, эпидемии гриппа по-прежнему имеют огромные масштабы. В связи с этим чрезвычайно актуальны поиск и разработка новых эффективных лекарственных средств. Известно, что ряд тритерпеновых кислот обладает выраженной противовирусной и иммуномодулирующей активностью [1, 2]. Целью настоящего исследования явилось изучение противогриппозной активности тритерпеновых соединений, имеющих скелет олеана-11,13(18)-диена, в опытах *in vitro* (в культуре клеток MDCK) и *in vivo* (на модели летальной инфекции белых мышей).

Экспериментальная химическая часть

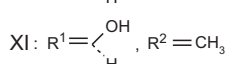
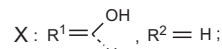
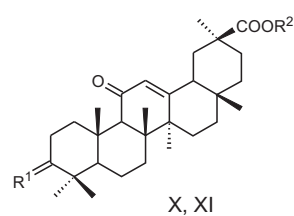
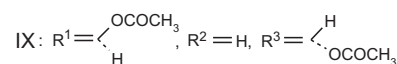
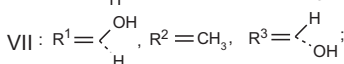
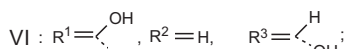
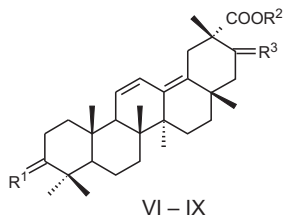
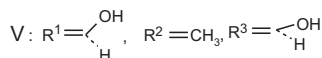
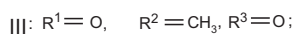
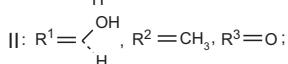
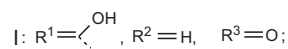
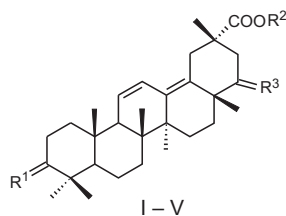
Структуры изученных соединений приведены на рисунке. Спектры ¹H ЯМР регистрировали на спектрометре AM-300 “Bruker” (300 и 75,47 МГц соответственно) в дейтерированном метиловом спирте или в дейтерохлороформе. ИК-спектры снимали на спектрофотометре UR-75 Specord в вазелиновом масле. УФ-спектры — на спектрофотометре СФ-46 в этаноле.

Меристотроповая кислота (3β-гидрокси-22-оксоолеана-11,13(18)-диен-29-овая) кислота (I). Получена при экстракции этанолом сухих корней *Glycyrrhiza triphylla* Fich et Mey, syn. *Meristotropis xanthioides* Vass. [3]. Структура кислоты установлена ранее [4–6]. Т. пл. 355–358 °С, ИК-спектр, ν_{\max} , см⁻¹: 3630(–OH), 1700(C=O), 1610 (HC=C<), УФ-спектр (этанол), λ_{\max} ,

нм: 242, 250, 258 (lg > 4). Спектр ¹H ЯМР (CDCl₃), δ, м.д.: 0,78 (3H, CH₃, с), 0,80 (3H, CH₃, с), 0,90 (3H, CH₃, с), 0,95 (3H, CH₃, с), 0,99 (3H, CH₃, с), 1,29 (3H, CH₃, с), 1,34 (3H, CH₃, с), 1,96 (1H, H-9 широкий с), 2,22 (1H, H-19 экв., д, J 14,5 Гц), 2,41 (1H, H-21экв, д, J 16,1 Гц), 2,74 (1H, H-21акс., дд, J₁ 16 Гц, J₂ 2,4 Гц), 3,24 дд (1H, H-19 акс., J₁ 14,5 Гц, J₂ 2,4 Гц), 3,26 (1H, H-3, дд, J₁ 11 Гц, J₂ 5 Гц), 5,65 (1H, H-12, д, J 10,5 Гц), 6,36 (1H, H-11, дд, J₁ 10,5 Гц, J₂ 3 Гц).

Метиловый эфир 3β-гидрокси-22-оксоолеана-11,13(18)-диен-29-овой кислоты (II). 3 г меристотроповой кислоты (I) метилируют эфирным раствором diazometана, полученным из 3 г нитрозометилмочевины [7], метиловый эфир кислоты (II) перекристаллизовывают из этанола Т. пл. 280–282 °С (4), ИК-спектр, ν_{\max} , см⁻¹: 3620 (–OH), 1731, 1715 (C=O), 1610 (HC=C<). Спектр ¹H ЯМР, (CDCl₃), δ, м.д.: 0,75 (3H, CH₃, с), 0,79 (3H, CH₃, с), 0,87 (3H, CH₃, с), 0,91 (3H, CH₃, с), 1,00 (3H, CH₃, с), 1,27 (3H, CH₃, с), 1,34 (3H, CH₃, с), 1,91 (1H, H-9, широкий с), 2,18 (1H, H-19экв., д, J 14,5 Гц), 2,37 (1H, H-21экв., д, J 16,1 Гц), 2,75 (1H, H-21 акс., дд, J₁ 16 Гц, J₂ 2,4 Гц), 3,24 (1H, H-19 акс., дд, J₁ 14,5 Гц, J₂ 2,4 Гц), 3,26 (1H, H-3, дд, J₁ 11 Гц, J₂ 5 Гц), 3,55 (3H, CH₃, с) 5,66 (1H, H-12, д, J 10,5 Гц), 6,36 (1H, H-11, дд, J₁ 10,5 Гц, J₂ 3 Гц).

Метиловый эфир 3,22-диоксоолеана-11,13(18)-диен-29-овой кислоты (III). 2 г метилового эфира (II) в 8 мл пиридина окисляют реактивом Джонса (3 г CrO₃ в 50 мл пиридина) [7]. По окончании реакции до-



Производные тритерпеновых кислот, использованные в исследовании.

бавляют 20 мл метанола и 150 мл воды. Продукт реакции экстрагируют этилацетатом. Этилацетатный раствор промывают трижды водой (по 30 мл), сушат, упаривают и после хроматографирования сухого остатка методом flash-хроматографии получают 1,4 г диоксо-соединения III. Т. пл. 218 – 220 °С, ИК-спектр, ν_{\max} , см⁻¹: 1731, 1715 (C=O), 1610 (HC=C<). Спектр ¹H ЯМР, (CDCl₃), δ , м.д.: 0,77 (3H, CH₃, с), 0,87 (3H, CH₃, с), 1,01 (3H, CH₃, с), 1,04 (3H, CH₃, с), 1,10 (3H, CH₃, с), 1,27 (3H, CH₃, с), 1,34 (3H, CH₃, с), 1,80 (1H, H-16 акс., дд, J₁ 14 Гц, J₂ 2,9 Гц), 1,81 (1H, H-16экв., широкий с), 2,00 (1H, H-9, широкий с), 2,18 (1H, H-19экв., д, J 13,8 Гц), 2,36 (1H, H-21экв., д, J 16 Гц), 2,47 (1H, H-2экв., м), 2,56 (1H, H-2акс., м), 2,74 (1H, H-21акс., дд, J₁ 16 Гц, J₂ 2,9 Гц), 3,22 (1H, H-19 акс., дд, J₁ 14,5 Гц, J₂ 2,5 Гц), 3,52 (3H, CH₃, с), 5,63 (1H, H-12, д, J 10 Гц), 6,39 (1H, H-11, дд, J₁ 11 Гц, J₂ 3 Гц).

3,22-Диоксоолеана-11,13(18)-диен-29-овая кислота (IV). 1 г соединения III кипятят в 100 мл 1 % этанольного раствора KOH в течение 3 ч. Реакционную смесь разбавляют 4-кратным объемом воды, подкисляют HCl до pH 2, фильтруют, осадок промывают водой и сушат. Выход продукта 0,9 г. Т. пл. 285 – 287° С, ИК-спектр, ν_{\max} , см⁻¹: 1731, 1715 (C=O), 1610 (HC=C<), Спектр ¹H ЯМР, (CDCl₃), δ , м.д.: 0,80 (3H, CH₃, с), 0,85 (3H, CH₃, с), 1,03 (3H, CH₃, с), 1,05 (3H, CH₃, с), 1,11 (3H, CH₃, с), 1,29 (3H, CH₃, с), 1,37 (3H, CH₃, с), 1,81 (1H, H-16 экв., д, J 3,6 Гц), 1,82 (1H, H-16 акс., дд, J₁ 7,3 Гц, J₂ 2,9 Гц), 1,99 (1H, H-9 широкий с), 2,21 (1H, H-19экв., д, J 15 Гц), 2,37 (1H, H-21экв., д, J 16 Гц), 2,48 (1H, H-2 экв., м), 2,58 (1H, H-2акс., м), 2,77 (1H, H-21 акс., д, J₁ 16 Гц, J₂ 2,2 Гц), 3,28 (1H, H-19акс., дд, J₁ 14,5 Гц, J₂ 2,2 Гц), 5,63 (1H, H-12, д, J 10 Гц), 6,45 (1H, H-11, дд, J₁ 10,5 Гц, J₂ 3 Гц).

Метилловый эфир 3 β ,22 β -дигидроксиолеана-11,13(18)-диен-29-овой кислоты (V). 1 г соединения II растворяют в 50 мл пропанола-2 и добавляют раствор 1 г NaBH₄ в 10 мл пропанола-2 и 10 мл воды. Реакционную смесь кипятят 4 ч, охлаждают, разбавляют водой и экстрагируют хлороформом. Хлороформные вытяжки промывают водой, сушат, хроматографируют методом flash-хроматографии и элюируют хлороформом. Выход соединения V- 0,4 г. Т. пл. 263 – 265 °С (4), ИК-спектр, ν_{\max} , см⁻¹: 3630, 1735 (C=O). Спектр ¹H ЯМР, (CDCl₃), δ , м.д.: 0,74 (3H, CH₃, с), 0,80 (3H, CH₃, с), 0,89 (3H, CH₃, с), 0,91 (3H, CH₃, с), 1,01 (3H, CH₃, с), 1,06 (3H, CH₃, с), 1,25 (3H, CH₃, с), 1,92 (1H, H-9 широкий с), 2,26 (1H, H-19экв., дд, J₁ 11,6 Гц, J₂ 3 Гц), 3,16 (1H, H-19акс, д, J 14,5 Гц), 3,26 (1H, H-3, дд, J₁ 11 Гц, J₂ 5 Гц), 3,41 (1H, H-22акс., дд, J₁ 12 Гц, J₂ 4 Гц), 3,60 (3H, CH₃, с), 5,64 (1H, H-12, д, J 11 Гц), 6,36 (1H, H-11, дд, J₁ 11,1 Гц, J₂ 3 Гц).

Метилловый эфир 3 β ,21 α -дигидроксиолеана-11,13(18)-диен-29-овой кислоты (VII). Из корней *Glycyrrhiza macedonica* Boiss et Orph. экстракцией метанолом по методу [1] выделяют македониковую (3 β , 21 α -дигидроксиолеана-11,13(18)-диен-29-овую) ки-

Таблица 1

Противовирусные свойства тритерпеновых кислот в отношении вирусов гриппа *in vitro*

Соединение	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	Показатели активности <i>in vitro</i> против вирусов гриппа			
		А		В	
		ЭД ₅₀	ХТИ	ЭД ₅₀	ХТИ
I	320	15	21	30	11
II	34	8	4		н/т*
III	255	146	<2		н/т
IV	170	100	<2		н/т
V	329	68	5		н/т
VI	137	71	2		н/т
VII	320	30	11	30	11
VIII	280	> 150	<2		н/т
IX	176	91	2		2
X	18	9	2	9	2
XI	210	103	2	> 150	<2
Ремантадин	68	10	7	> 40	<2

* не тестировали.

слоту (VI). Т. пл. 340–343 °С. М⁺ (*m/z*) 470. УФ-спектр (этанол), ν , см⁻¹: 239, 248, 259 (lg ϵ 4,4, 4,5, 4,3). Кислоту VI метилируют эфирным раствором диазометана [7] по той же методике, что и меристотроповую кислоту. Полученный метиловый эфир VII имел Т. пл. 252–254 °С [4, 5]. ИК-спектр, ν_{\max} , см⁻¹: 3620, 1730 (C=O). Спектр ¹H ЯМР (CDCl₃), δ , м.д.: 0,69 (3H, CH₃, с), 0,77 (3H, CH₃, с), 0,87 (3H, CH₃, с), 0,89 (3H, CH₃, с), 0,98 (3H, CH₃, с), 1,11 (3H, CH₃, с), 1,39 (3H, CH₃, с), 3,24 (2H, м), 3,59 (3H, CH₃, с), 5,60 (1H, H-12, д, J 10,5 Гц), 6,46 (1H, H-11, дд, J₁ 10,5 Гц, J₂ 3 Гц).

Метиловый эфир 3,21-диоксоолеана-11,13(18)-диен-29-овой кислоты (VIII). 0,53 г метилового эфира VII окисляют реактивом Джонса аналогично окислению соединения II. Продукты окисления разделяют методом flash-хроматографии и элюируют смесью гексан — этилацетат, 1:1. Выход продукта VIII 0,45 г. Т. пл. 240–242 °С (2). ИК-спектр, ν_{\max} , см⁻¹: 1730, 1710 (C=O). Спектр ¹H ЯМР (CDCl₃), δ , м.д.: 0,76 (3H, CH₃, с), 0,91 (3H, CH₃, с), 1,03 (3H, CH₃, с), 1,06 (3H, CH₃, с), 1,12 (3H, CH₃, с), 1,15 (3H, CH₃, с), 1,42 (3H, CH₃, с), 2,02 (1H, H-9, широкий с), 3,18 (1H, H-19акс., д, J 14,5 Гц), 3,62 (3H, CH₃, с), 5,60 (1H, H-12, д, J 10,2 Гц), 6,53 (1H, H-11, дд, J₁ 10,2 Гц, J₂ 3 Гц).

Дицетокси 3 β ,21 α -дигидроксиолеана-11,13(18)-диен-29-овая кислота (IX). 1 г мацедониновой кислоты (VI), 10 мл пиридина и 12 мл уксусного ангидрида кипятят в течение 4 ч. Реакционную смесь разбавляют 3-кратным объемом воды, осадок фильтруют, промывают водой и перекристаллизовывают из этилацетата. Т. пл. 290–292 °С [5]. ИК-спектр, ν_{\max} , см⁻¹: 1730, 1710, 1620, 1255. Спектр ¹H ЯМР (CDCl₃), δ , м.д.: 0,72 (3H, CH₃, с), 0,86 (3H, CH₃, с), 0,88 (3H, CH₃, с), 0,91 (3H, CH₃, с), 0,92 (3H, CH₃, с), 1,21 (3H, CH₃, с), 1,27 (3H, CH₃, с), 1,92 (1H, H-9, широкий с), 1,96 (1H, H-19 акс., дд, J₁ 15,2 Гц, J₂ 3 Гц), 2,07 (3H, CH₃, с), 2,08 (3H, CH₃, с), 3,12 (1H, H-19 экв., д, J 15,2 Гц), 4,53 (1H, H-3, дд, J₁ 10,2 Гц, J₂ 6,5 Гц), 5,06 (1H, H-21, дд, J₁ 12,3 Гц, J₂ 4,7 Гц), 5,58 (1H, H-12, д, J 11 Гц), 6,38 (1H, H-11, дд, J₁ 11 Гц, J₂ 3 Гц).

Таблица 2
Противовирусные свойства тритерпеновых кислот в отношении вирусов гриппа *in vivo*

Соединение	Показатели активности <i>in vivo</i>		
	Смертность, %	Средняя продолжительность жизни, сут	ИЗ, %
I	40	11,3 ± 1,2	25,0
VII	33	12,3 ± 1,0	37,5
IX	47	10,7 ± 1,2	12,5
X	33	12,0 ± 1,1	37,5
XI	47	10,9 ± 1,2	12,5
Ремантадин	13	13,9 ± 0,8*	75,0
Контроль	53	9,8 ± 1,3	0,0

* Жирным шрифтом выделены отличия от контроля при $p < 0,05$

Глицирретовая (3 β -гидрокси-11-оксоолеан-12-ен-30-овая) кислота (X). Глицирретовую кислоту (X) выделяют из корней *Glycyrrhiza glabra* L. методом [6]. Т. пл. 293–296 °С. Спектр ¹H ЯМР (CD₃OD), δ , м.д.: 0,82 (3H, CH₃, с), 0,85 (3H, CH₃, с), 1,01 (3H, CH₃, с), 1,16 (6H, CH₃, с), 1,19 (3H, CH₃, с), 1,44 (3H, CH₃, с), 2,47 (1H, H-9, с), 2,74 (1H, H-18 дд, J₁ 13,8 Гц, J₂ 3,6 Гц), 3,19 (1H, H-13 дд, J₁ 11,6 Гц, J₂ 5 Гц), 5,6 (1H, H-12, с).

Метиловый эфир глицирретовой кислоты (XI). Глицирретовую кислоту (X) метилируют эфирным раствором диазометана [7]. Метиловый эфир (XI) имеет т. пл. 248–251 °С. Спектр ¹H ЯМР (CDCl₃), δ , м.д.: 0,82 (3H, CH₃, с), 0,83 (3H, CH₃, с), 1,01 (3H, CH₃, с), 1,13 (3H, CH₃, с), 1,14 (3H, CH₃, с), 1,16 (3H, CH₃, с), 1,37 (3H, CH₃, с), 2,35 (1H, H-9, с), 2,80 (1H, H-18, дд J₁ 13 Гц, J₂ 3,3 Гц), 3,24 (1H, H-3, дд, J₁ 10,2 Гц, J₂ 5,8 Гц), 3,70 (3H, с), 5,67 (1H, H-12, с).

Экспериментальная биологическая часть

В работе были использованы следующие вирусы гриппа из коллекции вирусов НИИ гриппа МЗ РФ: A/Puerto Rico/8/34 (H1N1), A/Aichi/2/68 (H3N2), B/Lee/40.

Вирусы гриппа были пассированы в аллантаоидной полости 10–12 дневных куриных эмбрионов в течение 48 ч при 36 °С (вирусы гриппа А) или 72 ч при 34 °С (вирус гриппа В).

Определение цитотоксичности и противовирусной активности препаратов в культуре клеток. Для определения токсичности соединений их двукратные разведения инкубировали с клетками МДСК в течение 48 ч при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. По истечении срока инкубации клетки промывали 2 раза по 5 мин фосфатно-солевым буфером, и количество живых клеток в лунках оценивали при помощи микротетразолиевого теста (МТТ) [8]. С этой целью в лунки планшетов добавляли по 100 мкл раствора (5 мг/мл) 3-(4,5-диметилтиазол-2)-2,5-дифенилтетразолия бромид (ICN Biochemicals Inc., Aurora, Ohio) на физиологическом растворе. Клетки инкубировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в течение 2 ч и промывали 5 мин фосфатно-солевым буфером. Осадок растворяли в 100 мкл лунку ДМСО, после чего оптическую плотность в лунках планшетов измеряли на многофункциональном ридере Victor 1420 (Perkin Elmer, Finland) при длине волны 535 нм. По результатам теста для каждого соединения определяли 50 % цитотоксическую дозу (ЦТД₅₀), т.е. концентрацию, вызывающую гибель 50 % клеток в культуре.

Для определения противовирусной активности препаратов в лунки планшетов с монослоем клеток вносили препарат в соответствующей концентрации, инкубировали 1 ч при 37 °С и заражали культуру серийными десятикратными разведениями вируса от 10⁻¹ до 10⁻⁵. После заражения клетки инкубировали в термостате при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в течение 48 ч (вирусы гриппа А) или 72 ч (вирус гриппа В). Контроль

лями служили культура клеток, зараженная вирусом (позитивный контроль), и интактная культура клеток, в которую вместо раствора препаратов вносили поддерживающую среду (негативный контроль). По окончании срока инкубации 50 мкл культуральной среды переносили в соответствующие лунки 96-луночных планшетов с круглым дном (Медполимер, Санкт-Петербург) и добавляли по 50 мкл 1 % взвеси куриных эритроцитов в физиологическом растворе. Планшеты инкубировали 1 ч при комнатной температуре и учитывали наличие вируса по агглютинации эритроцитов в лунках. За гемагглютинирующий титр вируса принимали величину, противоположную десятичному логарифму разведения исходного материала, способного вызвать положительную реакцию гемагглютинации в лунке. Титр выражали в логарифмах 50 % инфекционной дозы ($Ig ID_{50}$). По результатам теста для каждого соединения определяли 50% эффективную дозу ($ЭД_{50}$), т.е. концентрацию, снижающую репликацию вдвое, и химиотерапевтический индекс (ХТИ, отношение $ЦТД_{50}$ к $ЭД_{50}$). О противовирусной активности соединений судили по величине ХТИ.

Экспериментальная гриппозная инфекция. Белых беспородных мышей (самки) массой 14 – 16 г получали из питомника “Рапполово” (Ленинградская обл.) и содержали на стандартном рационе в регламентированных условиях вивария НИИ гриппа РАМН. Подбор животных в группы опыта проводили методом случайной выборки. До начала испытаний животные находились под наблюдением 2 недели. Перед экспериментом 5 мышей заражали 0,05 мл аллантоисной жидкости, содержащей вирус гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) (5×10^7 ИД₅₀/мл). На 3 сут после заражения их легкие изолировали, гомогенизировали в 10-кратном объеме стерильного физиологического раствора, после чего активность вируса в гомогенате определяли в отдельном эксперименте при помощи титрования по летальности на животных. Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча [9].

Для каждого препарата определяли 50 % летальную дозу ($ЛД_{50}$), т.е. дозу, вызывающую гибель 50 % животных. Исследуемые соединения вводили животным внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл по лечебно-профилактической схеме: за 24 и 1 ч до заражения и через 24, 48 и 72 ч после заражения в дозе, составляющей 1/3 $ЛД_{50}$. Контрольной группе животных вводили физиологический фосфатный буфер. В качестве препарата сравнения использовали ремантадин (Aldrich Chem. Co.) в концентрации 50 мг/кг. Ремантадин вводили животным внутрибрюшинно по той же схеме, что и исследуемые препараты. В качестве отрицательного контроля использовали интактных животных, которые содержались в тех же условиях, что и опытные группы.

Вирус вводили животным интраназально под легким эфирным наркозом в дозе 1 $ЛД_{50}$. В каждую группу наблюдения брали по 15 мышей. Наблюдение за животными осуществляли в течение 14 дней, т.е. срока, в течение которого при экспериментальном гриппе отмечается смертность животных. Ежедневно фикси-

ровали смертность животных в контрольной и опытной группах. На основании полученных показателей смертности в каждой группе рассчитывали процент смертности (отношение числа павших за 14 дней животных к общему числу зараженных животных в группе), среднюю продолжительность жизни животных и индекс защиты (ИЗ, отношение разницы процентов смертности в контрольной и опытной группах к проценту смертности в контрольной группе). О противовирусной активности соединений судили по величине ИЗ.

Результаты и их обсуждение

Результаты проведенных опытов суммированы в табл. 1, 2.

Как следует из результатов изучения активности соединений в отношении вируса A(H1N1), наибольшую активность проявили меристотроповая кислота (I) и метиловый эфир мацедониновой кислоты (VII). Их активность превышала таковую для препарата сравнения — ремантадина. Известно, что использованный в работе вирус гриппа A/PR/8/34 (H1N1) является ремантадин-устойчивым, и высокие показатели активности веществ I и VII говорят о перспективности их дальнейшей разработки как средств защиты от гриппа. Остальные соединения не обладали сколько-нибудь выраженными вирусингибирующими свойствами. При этом отмечалась корреляция между активностью этих соединений против вируса гриппа A и гриппа B.

В целом следует отметить, что практически все использованные модификации природных соединений приводили к потере противовирусной активности (соединение I и его производные II – V, X и XI). Исключением является появление активности у метилового эфира мацедониновой кислоты (VII) при ее отсутствии у самой кислоты (VI). По результатам анализа значений $ЭД_{50}$, соединения II и X обладали противовирусной активностью, однако их высокая токсичность приводила к резкому снижению ХТИ.

В то же время некоторые из изученных тритерпеновых кислот (IX, X, XI) проявляли протективные свойства *in vivo*. Эти свойства проявлялись в снижении специфической смертности и увеличении продолжительности жизни по сравнению с контрольными группами. Наибольшую активность проявили соединения VII и X (индекс защиты 37,5 %). Тем не менее ни одно из изученных соединений не было более активным, чем препарат сравнения ремантадин (индекс защиты 75 %). Увеличение продолжительности жизни животных достигало достоверных отличий от контроля также только при использовании ремантадина.

Обнаруженная в настоящем исследовании комбинация суммарной протективной активности *in vivo* с прямой противовирусной активностью, как это имеет место у соединений I и VII, свидетельствует об их потенциале в качестве средств профилактики и/или терапии гриппозной инфекции у человека. Актуальнейшей задачей в этой связи является тестирование их активно-

сти в отношении современных эпидемических вирусов, в том числе пандемического штамма гриппа A(H1N1)pdm09.

Полученные результаты позволяют говорить о перспективности дальнейшей разработки меристотропной, мацедониковой кислот и их производных для создания новых эффективных противогриппозных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. Г. Толстикова, И. В. Сорокина, Г. А. Толстиков и др., *Био-орган. химия*, **32**(1), 42 – 55 (2006).
2. Г. А. Толстиков, Л. А. Балтина, Н. Г. Сердюк, *Хим.-фарм. журн.*, **42**(8), 5 – 14 (2008).

3. Н. П. Кирьялов, Т. Н. Наугольная, *Ж. общей химии*, **33**, 697 – 700 (1963).
4. А. Д. Зорина, И. А. Салтыкова, В. Ф. Мартынова, Л. Г. Матюхина, *Ж. общей химии*, **60**, 1395 – 1401 (1990).
5. A. D. Zorina, L. G. Matyukhina, A. A. Ryabinin, *International Symposium on the Chemistry of Natural Products*, **4**, 77 – 78 (1966).
6. В. Г. Платонов, А. Д. Зорина, М. А. Гордон и др., *Хим.-фарм. журн.* **29**(2), 42 – 46 (1995).
7. А. Д. Зорина, Л. Г. Матюхина, И. А. Салтыкова, А. Г. Шавва, *Ж. орган. химии*, **IX**(8), 1673 – 1678 (1973).
8. T. J. Mosmann, *Immunol. Methods*, No. 65, 55 – 59 (1983).
9. L. J. Reed, H. Muench, *Am. J. Hyg.*, **27**, 493 – 497 (1938).

Поступила 21.04.10

SYNTHESIS AND ANTI-INFLUENZA ACTIVITY OF DERIVATIVES OF MERISTOTROPIC AND MACEDONIC ACIDS

V. V. Zarubaev¹, O. I. Kiselev¹, A. A. Shtro¹, A. D. Zorina², L. V. Balykina², N. V. Esipenko², V. V. Anokhina², and T. V. Bukreeva³

¹ Research Institute of Influenza, Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, 197376 Russia;

² St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia;

³ Institute of Botany, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

Antiviral activity of natural triterpenoid acids (meristotropic and macedonic) and their synthetic derivatives has been investigated with respect to influenza viruses A and B in MDCK cell culture and on the model of lethal influenza pneumonia in mice. Meristotropic acid and methyl ester of macedonic acid were found to exhibit the maximum virus-inhibiting activity *in vitro*. Correlation between the activity of compounds against influenza A and influenza B viruses was observed. At the same time, several compounds, despite being inactive *in vitro*, exhibited protective activity *in vivo*. This fact suggests that there is an alternative mechanism of activity which is not related to the interaction with a virus-specific target. Based on the results obtained, derivatives of meristotropic and macedonic acids should be considered as a prospective group of compounds for the development of new effective anti-influenza drugs.

Key words: Triterpenes, meristotropic acid, macedonic acid, influenza, antiviral activity