

© Коллектив авторов, 2012

*В. А. Шибнев, Т. М. Гараев, М. П. Финогенова, Е. С. Шевченко, Е. И. Бурцева*

## НЕКОТОРЫЕ ПУТИ ПРЕОДОЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ВИРУСОВ ГРИППА А К ПРЕПАРАТАМ АДАМАНТАНОВОГО РЯДА

ФГУ “НИИ Вирусологии им. Д. И. Ивановского” Минздравсоцразвития России, Москва, Россия

Впервые синтезированы производные адамантанового ряда, включающие остатки аминокислот, и исследована их противовирусная активность в отношении вирусов гриппа А (H1N1)v и А(H3N2). Установлено, что в ряду полученных производных адамантана некоторые соединения способны ингибировать резистентные к ремантадину штаммы вируса гриппа А. Таким образом, возможна реанимация противовирусных свойств ремантадина.

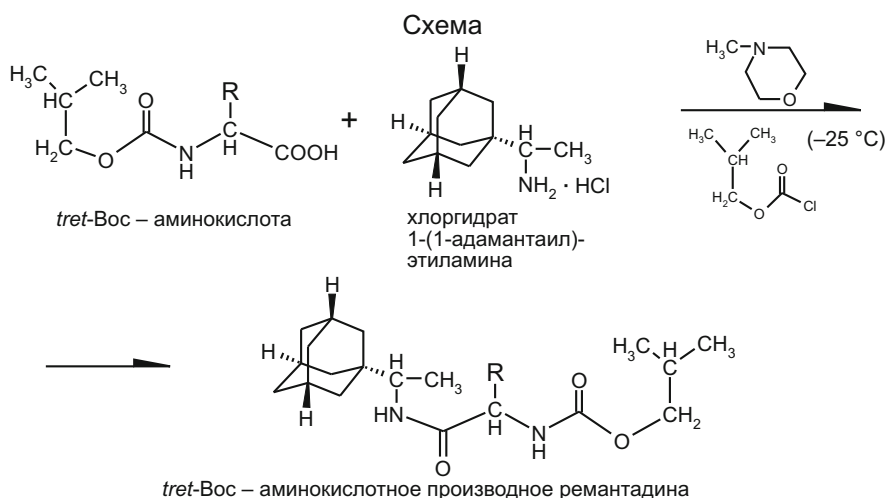
**Ключевые слова:** производные адамантана, аминокислоты, грипп А, ремантадин, резистентность, 1-адамantanкарбоновая кислота.

Биологическая активность производных адамантана обусловлена симметрией и объёмностью пространственного строения, значительной липофильностью жёсткого углеводородного каркаса, что позволяет им легко проникать через биологические мембраны. Поэтому модификация органических соединений с помощью адамантильного радикала значительно изменяет их биологическую активность, нередко усиливая её.

Первым в медицинскую практику вошёл гидрохлорид 1-аминоадаманта (мидантан), обладающий противовирусной активностью в отношении штаммов вирусов гриппа А. Ремантадин был открыт в 60-х гг. и используется с начала 80-х гг. для лечения и профилактики гриппозной инфекции. Оба препарата оказывают действие на протон проводящий канал (M2) вируса гриппа А. Препараты неэффективны в отношении вируса гриппа В.

К настоящему времени выявлено большое количество штаммов, полностью резистентных к мидантану и ремантадину. Количество резистентных форм гриппа увеличивается с каждым годом по причине спонтанных мутаций в геноме вируса. Это заставляет расширять исследования, как по выявлению причин возникновения резистентности, так и по её преодолению на уровне создания новых противовирусных препаратов [1].

Одним из подходов для “реанимации” противовирусных свойств соединений этого класса является обеспечение их дополнительными функционально активными группами, которые в процессе взаимодействия с трансмембранным доменом были бы способны нарушать процесс транспорта протонов через мембрану вируса. Источником таких функционально активных групп могут являться аминокислотные и пептид-



Общая схема получения аминокислотных производных ремантадина. R — функциональная группа аминокислоты

ные остатки, введенные в мидантан и ремантадин методами пептидного синтеза.

Нами были синтезированы аминокислотные и пептидные производные 1-адамтановой кислоты и ремантадина и исследована их активность в отношении вирусов гриппа А (H1N1v, H3N2). Установлено, что в ряду полученных производных адамантана некоторые соединения способны ингибировать резистентные к ремантадину штаммы вируса гриппа А. Таким образом, показано, что возможна “реанимация” противовирусных свойств ремантадина.

Образование пептидной связи между карбоциклом, содержащим аминогруппу, и аминокислотами, защищенными по аминогруппе *трет*-бутилоксикарбонильной группой (Вос-), проводили в одну стадию в условиях реакции смешанных ангидридов в эквимолярном соотношении (схема).

Производные на основе 1-адамтановой кислоты и 1,3-адамтандиуксусной кислоты синтезировали также методом смешанных ангидридов: смешанный ангидрид адамантановой кислоты взаимодействовал с эфирами соответствующих аминокислот.

#### Экспериментальная химическая часть

Использовали ремантадин (фирмы Zhejiang Kangyu Pharmaceutical Co, Китай), L-аминокислоты фирмы Nova Biochem. Идентификацию полученных соединений осуществляли с помощью ТСХ на пластинках Silufol и Dc-Rieselgel 60 (Merck) в системах втор-бутанол — 3 % аммиак (100:44) (А), метанол — хлороформ (13:60) (В), бутанол — уксусная кислота — вода — пиридин (30:3:12:10) (С), позволяющих констатировать полное отсутствие в испытуемых образцах следов ремантадина, амантадина и 1-адамтанкарбоновой кислоты, а также посредством масс-спектрометрии. Для поляриметрических определений использовали автоматический поляримерт (А1-ЕПЛ). Температуру плавления полученных соединений определяли на приборе “БОЭЦИУС” VEB Analytik. Для полученных соединений данные элементного анализа на С, Н, N соответствовали брутто-формулам. Для идентификации в полученных соединениях аминокислотных остатков проводили кислотный гидролиз в 6 н. HCl при 105 °С в течение 12 ч. Образующиеся свободные аминокислоты идентифицировали с помощью ТСХ в системах фенол — вода (50:50) и *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (3:2:2).

#### **Трет-бутилоксикарбонилсаркозил-1-адамтантилэтиламин (Вос-Sar-Rem II).**

К 1,5 г (0,0079 моль) Вос-Sar-OH в 15 мл CHCl<sub>3</sub> прибавляют 0,87 мл (0,0079 моль) N-метилморфолина (NMM). Охлаждают до –20 ...–25 °С и при перемешивании в реакционную массу добавляют 1,08 мл (0,0079 моль) *изо*-бутилхлорформиата, перемешивают 10 мин. Затем добавляют заранее приготовленный и охлажденный до –20 °С второй компонент, хлоргидрат 1-(1-адамтантил)этиламина 1,71 г (0,0079 моль) в 15 мл CHCl<sub>3</sub> с 0,87 мл (0,0079 моль) NMM. Перемешивают

в течение 30 мин, затем еще 1 ч при 0 °С и 2 ч при 24 °С.

Растворители отгоняют на ротаторном испарителе в вакууме 10 мм рт. ст. Остаток растворяют в 35 мл этилацетата. Экстрагируют последовательно 5 мл воды, 0,5 н. раствором NaHCO<sub>3</sub> (10 мл · 2), 10 % раствором лимонной кислоты (4 мл) и снова водой (5 мл). Органический слой сушат над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Этилацетат удаляют в вакууме, получают белые кристаллы. Выход: 2,55 г. (83 %).  $R_f^A = 0,86$ ;  $R_f^B = 0,68$ ;  $R_f^C = 0,91$ ,  $[\alpha]_D^{20} = -2,5$  °С, Т. пл. 115 – 117 °С.

При необходимости *трет*-бутилоксикарбонильную группу удаляли действием этилацетата насыщенного 4 н. HCl при температуре 20 – 24 °С в течение 30 мин.

Аналогичным образом были получены другие аминокислотные производные ремантадина: *трет*-бутилоксикарбонилорнитил-1-адамтантилэтиламин (I), цитрулил-1-адамтантилэтиламин (III), *трет*-бутилоксикарбонилцитрулил-1-адамтантилэтиламин (IV),  $\alpha$ -ди-*трет*-бутилоксикарбониллизил- $\epsilon$ -N-карбобензоксизил-1-адамтантилэтиламин (V), 1-адамтантилэтиламид 4-N-*трет*-бутилоксикарбониламинобутановой кислоты (VI), 1-адамтантилэтиламид  $\alpha$ -липоевой кислоты (VII), гистидил-1-адамтантилэтиламин (XI), тирозил-1-адамтантилэтиламин (XII), 1-адамтантилэтиламид-2-N-*трет*-бутилоксикарбонилэтансульфоновой кислоты (*трет*-бутилоксикарбонилтаурил-1-адамтантилэтиламин, XIV), 1-адамтантилэтиламид-2-аминоэтансульфоновой кислоты (таурил-1-адамтантилэтиламин, XV), *трет*-бутилоксикарбонилгистидиладамтантиламин (XVI), гистидиладамтантиламин (XVII).

#### **Метилловый эфир $\alpha$ -трет-бутилоксикарбонил- $\epsilon$ -N-адамтантоил лизина (Вос-Lys(Ad)-OCH<sub>3</sub> IX)**

Раствор 0,9 г (0,005 моль) адамантановой кислоты и 0,55 мл (0,005 моль) NMM в 10 мл хлороформа охлаждают до –20 °С и при перемешивании вносят 0,68 мл (0,005 моль) *изо*-бутилхлорформиата. Выдерживают 10 мин и добавляют заранее охлажденный раствор 1,3 г (0,005 моль) Вос-Lys(NH<sub>2</sub>)-OCH<sub>3</sub> в 10 мл хлороформа. Перемешивают в течение 30 мин при –20 °С, 1 ч при 0 °С и 2 ч при 24 °С. Хлороформ удаляют в вакууме, остаток растворяют в 20 мл этилацетата и экстрагируют последовательно водой (5 мл), раствором 0,5 н. NaHCO<sub>3</sub> (10 мл · 2), раствором 10 % лимонной кислоты (4 мл · 1) и H<sub>2</sub>O (5 мл · 1). Органический слой сушат над безводным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Этилацетат удаляют в вакууме, получают маслообразный продукт, который сушат при 1 мм рт. ст. Выход: 2,1 г количественный (масло).  $R_f^A = 0,81$ ;  $R_f^B = 0,85$ ;  $R_f^C = 0,88$ ,  $[\alpha]_D^{20} = -10$  °С. В полученных производных лизина Вос-группа удалась в 4н. HCl как описано выше.

Аналогично были получены соединения  $\alpha$ -трет-бутилоксикарбонил- $\epsilon$ -N-адамтантоил лизин (VIII), 1,6-диаминоаминогексан-1-амидадамтантановой кислоты (X), метилловый эфир дисерил-1,3-адамтандиуксусной кислоты (XIII).

В случае соединения XIII использовалась 1,3-адамтандиуксусная кислота и соответственно хлоргидрат

рат метилового эфира серина брали в двойном эквиваленте.

При необходимости сложноэфирная группа полученных N-адамантилпептидов удалялась омылением в 0,2 н. NaOH в течение 45 мин при комнатной температуре (соединение VIII).

### Экспериментальная биологическая часть

#### Противовирусное действие

В работе использовали вирусы гриппа: пандемический штамм A/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)sw1, подобный эталонному варианту A/California/7/2009 (H1N1)sw1 [2], и A/Москва/26/2009 (H3N2), резистентные к ремантадину.

Изучение противовирусной активности проводили на 96-луночных панелях со сформировавшимся монослоем клеток культуры ткани MDCK. Одновременно с инфицированием в монослой клеток вносили ремантадин и изучаемые соединения (производные адамантана) в концентрации 5,0 мкг/мл. Панели инкубировали в течение 24 ч при 37 °С, а затем останавливали реакцию фиксированием клеток 80 % ацетоном на фосфатном буфере. Постановку метода клеточного иммуноферментного анализа (ИФА) проводили согласно [3, 4]. Процент ингибирования вирусной активности соединениями определяли как отношение (оптическая плотность (ОП)<sub>492</sub> опыта минус ОП<sub>492</sub> клеточного контроля / ОП<sub>492</sub> вирусного контроля минус ОП<sub>492</sub> клеточного контроля), умноженного на 100 %.

#### Цитотоксическое действие

Токсичность соединений была изучена при внесении их разных концентраций на монослой клеток культуры ткани MDCK в 96-луночных панелях и инкубации при 37 °С. Состояние клеточного монослоя проверяли под микроскопом. Концентрацию вещества, вызывающую дегенерацию 50 % клеток по сравнению с контролем, принимают за среднетоксичную концентрацию (СТ<sub>50</sub>). Наименьшую концентрацию вещества, вызывающую дегенерацию клеток, считают минимально токсичной (МТК). Максимально переносимой концентрацией (МПК) считают половину концентрации соединения, которая не оказывает на клетки токсического действия. Оценка цитотоксичности проводили колориметрическим методом. После инкубации в течение 72 ч при 37 °С монослой отмывали раствором PBS. Количество жизнеспособных клеток определяли сравнением интенсивности окрашивания раствора в контрольных и опытных лунках при добавлении нейтрального красного на автоматическом спектрофотометре при длине волны 450 нм. Концентрацию препарата, ингибирующую значение ОП на 50 % по сравнению с клеточным контролем, принимают за 50 % цитотоксическую дозу (ЦД<sub>50</sub>).

#### Результаты и их обсуждение

В табл. 2 приведены испытания способности некоторых из полученных соединений ингибировать вирусы A(H1N1)v и A(H2N3) и результаты цитопатического действия препаратов на культуру клеток MDCK.

Таблица 1

Физико-химические константы полученных производных адамантана

Соединение	Выход, г	Т. пл., °С	[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	TCX R <sub>f</sub>		
				A	B	C
I (Boc) <sub>2</sub> -Orn-Rem	0,73 (91 %)	140 – 142	– 3,5	0,64	0,88	0,94
II Boc-Sar-Rem	2,55 (83 %)	115 – 117	– 2,5	0,68	0,86	0,91
III H-Cyt-Rem	0,36 (97 %)	масло	– 2 (укс)	не движется	0,48	0,57
IV (Boc) <sub>2</sub> -Cyt-Rem	0,45 (89 %)	масло	– 2,5	0,81	0,82	0,93
V (Boc) <sub>2</sub> -Lys-Lys(Z)-Rem	0,83 (83 %)	масло	– 20	0,88	0,87	0,87
VI Boc-GABA-Rem	3,62 (колич)	106	0	0,70	0,51	0,64
VII TOA-Rem	0,92 (81 %)	114	- (рацемат)	0,87	0,86	0,89
VIII NH <sub>2</sub> -Lys(Ad)-OH	0,75 (87 %)	аморфное	– 4	0,15	0,27	0,58
IX NH <sub>2</sub> -Lys(Ad)-OMe	1,09 (83 %)	аморфное	– 4	0,30	0,24	0,53
X Ad-HDA	0,23 (93 %)	95	0	0,80	0,89	0,93
XI H-His-Rem	0,98 (86 %)	210	– 6	не движется	0,50	0,75
XII H-Tyr(OH)-Rem	0,25 (90 %)	185	– 16	0,14	0,74	0,9
XIII Ad-(CH <sub>2</sub> -Ser(OMe)) <sub>2</sub>	0,23 (70 %)	аморфное	+ 8	0,26	0,76	0,75
XIV Boc-Tau-Rem	0,43 (55 %)	122	+ 10	0,45	0,54	0,95
XV H-Tau-Rem	0,33 (97 %)	213 (разл.)	0	не движется	0,37	0,70
XVI Boc-His-AmAd	0,73 (60%)	аморфное	– 3	0,88	0,85	0,73
XVII H-His-AmAd	0,45 (92 %)	масло	– 6	не движется	0,33	0,51
Remantadine		< 300	- (рацемат)	0,51	0,46	0,70

**Примечание:** Rem — остаток молекулы карбоцикла ремантадина (1-(1-адамантил)-1-аминоэтан), AmAd — остаток молекулы карбоцикла мидантана (1-аминоадамтан), Ad — остаток 1-адамтанкарбоновой кислоты, связанный с аминогруппой аминокислоты, Cyt — остаток цитрулина, GABA — остаток γ-аминомасляной кислоты, TOA — остаток тиоктовой (липовой) кислоты, HDA — остаток 1,6-гександиамина, Tau — остаток сульфаминокислоты таурина, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> — показатель вращения в этиловом спирте с концентрацией 1 мкг/мл, кроме соединения III, его растворяли в уксусной кислоте.

Изучение противовирусной активности соединений проводили в концентрации 5 мкг/мл. Приведенный в табл. 2 процент ингибирования соединений является средним арифметическим, представлены лишь наиболее интересные результаты, так как многие соединения оказались мало активными, а некоторые обладали токсическим действием на клетки.

Из анализа полученных данных можно сделать вывод, что наличие свободной аминогруппы у линейных молекул не способствует закреплению адамантановой конструкции в поре М2-канала вирусов А(Н1N1)ν и А(Н3N2). Это справедливо и для аминоадамантанов — ремантадина и мидантана. Однако при защите аминогрупп *трет*-бутилоксикарбонильной группой (Вос-) эффект ингибирования вируса проявляется. Такими соединениями являются основные аминокислоты орнитин (соединение I) и саркозин (соединение II). Присутствие сильно гидрофобного участка в сумме с липофильным карбоциклом адамантана создает оптимальную структуру для проникновения в мембранный бислой оболочки вируса, которая нарушает процессы, связанные с репликацией. Производное цитрулина (соединение III) ведет себя аналогичным образом, только его противовирусное действие слабее, и нет корреляции между данными по 2 вирусам, при действии на А(Н3N2) эффект почти минимален в отличие от эффекта действия на А(Н1N1)ν.

Опираясь на активность орнитинового производного, мы синтезировали близкое по строению соединение Вос-GABA-Rem (VI). Молекула этого соединения представляет собой ремантадин, сшитый с  $\alpha$ -*трет*-бутилоксикарбонил  $\gamma$ -аминомасляной кислотой. Таким образом, мы оставили только 1 аминогруппу и соответственно только 1 Вос-группу. Активность соедине-

ния несколько уменьшается по сравнению с соединением I.

Наряду с  $\gamma$ -аминомасляной кислотой аналогом орнитина может выступить лизин. Производное лизина с ремантадином не приводит к существенному ингибированию вирусов ни с открытыми аминогруппами, ни с блокированными. Напротив, использование 1-адамантановой кислоты в синтезе с Вос-Lys(NH<sub>2</sub>)-ОМе привносит новую пространственную конфигурацию в эти соединения (VIII и IX);  $\alpha$ -аминогруппа лизина закрыта *трет*-бутилоксикарбонильной группой, а  $\epsilon$ -группа в то же время открыта для связи с 1-адамантановой кислотой. Причем омыление сложноэфирной (метокси) группы лизина (соединение IX) практически никак не отразилось на активности в отношении обоих штаммов (соединение VIII).

Соединение V, представляет собой ремантадин, сшитый с дипептидом лизина, в котором  $\epsilon$ -аминогруппа 1 остатка закрыта карбобензоксигруппой, а обе аминогруппы второго остатка *трет*-бутилоксикарбонильными группами, проявляет ингибирующую активность лишь для А(Н1N1)ν, которая для А(Н3N2) весьма мала.

Молекула, содержащая остаток гистидина (соединение XVI), проявляет стабильный эффект подавления репликации вирусов гриппа А.

Производные гистидина, как с ремантадином (соединение XI), так и с аминоадамантаном (мидантаном) (соединение XVI и XVII) проявляют положительный эффект. Объяснить это можно тем, что наличие еще одного (пятого) остатка гистидина в поре канала делает затруднительной работу протонного насоса, возможно, ввиду конкурентных процессов протонирования имидазольных колец.

Таблица 2

Противовирусное и цитопатическое действие производных адамантана

Соединение	Активность, %		МПК, мкг/мл
	А(Н1N1)ν	А(Н3N2)	
I Вос-Orn-Rem	71,06	66	40
II Вос-Sar-Rem	70,8	64	40
III Н-Cyt-Rem	36	н/э *	40
IV Вос-Cyt-Rem	53	25	> 80
V (Вос) <sub>2</sub> -Lys-Lys(Z)-Rem	69	30	> 80
VI Вос-GABA-Rem	48	52	40
VII TOA-Rem	78	89	80
VIII NH <sub>2</sub> -Lys(Ad)-OH	54	25	> 80
IX NH <sub>2</sub> -Lys(Ad)-ОМе	47	25	> 80
X Ad-HDA	74	63	> 80
XI Н-His-Rem	91	94	40
XII Н-Тур(OH)-Rem	29	38	> 80
XIII Ad-(CH <sub>2</sub> Ser(OMe)) <sub>2</sub>	98	90	> 80
XIV Вос-Tau-Rem	35	69	> 80
XV Н-Tau-Rem	76	72	> 80
XVI Вос-His-AmAd	98	60	40
XVII Н-His-AmAd	н/э	26,8	40
Remantadine	н/э	н/э	40

\* н/э — нет эффекта ингибирования вируса.

Производное тирозина (соединение XII) вызывает умеренное (30 – 40 %) подавление вирусной продукции.

Блокирование гидроксила тирозина бензилокси- группой приводит к очень активному соединению H-Tyr(Obzl)-Rem при концентрации 5 мкг/л. Однако при увеличении концентрации этого соединения до 40 мкг/мл возникает токсический эффект.

Наиболее активным против обоих штаммов вируса и при этом нетоксичным оказалось производное 1,3-адамантидиуксусной кислоты с метиловым эфиром серина (соединение XIII). Даже при достижении концентрации 80 мкг/мл клеточная культура не пострадала от действия этого соединения.

При использовании аминосульфоновой кислоты таурин, *трет*-бутилоксизащищенное производное (XIV) малоактивно в отношении A(H1N1)v (30 – 41 %), однако проявляло эффект ингибирования в отношении сезонного A(H3N2). С другой стороны, соединение таурина со свободной аминогруппой (XV) подавляет развитие вирусов обоих штаммов более чем на 70 %.

Другое серусодержащее производное ремантадина, в состав которого входит липоевая кислота (3-(4-кар-

боксibuтил)-1,2-дитиолан, тиоктовая кислота) (соединение VII), циклический дисульфид, обладает значительным эффектом подавления (~ 80 %) в отношении обоих штаммов вируса гриппа А.

Таким образом, на основании изучения противовирусных свойств аминокислотных производных адамантанового ряда установлено, что в ряде полученных соединений введение функциональных групп приводит к восстановлению противовирусных свойств, т.е. к преодолению резистентности.

Адамантановый цикл в качестве мембранотропного носителя способен транспортировать функционально активные группы к белку М2 вируса гриппа А.

## ЛИТЕРАТУРА

1. К. Н. Козелецкая, Л. Л. Стоцкая, А. В. Сербии, и др., *Вопр. вирусол.*, **48**(5), 19 – 25 (2003).
2. Д. К. Львов, Е. И. Бурцева, А. Г. Прилипов, *Вопр. вирусол.*, **54**(5), 10 – 14 (2009).
3. Е. И. Бурцева, Е. С. Шевченко, И. А. Ленева, *Вопр. вирусол.*, **52**(2), 24 – 29 (2007).
4. И. А. Ленева, Н. И. Фадеева, И. Т. Федякина, *Хим.-фарм. журн.*, **28**(9), 4 – 15 (1994).

Поступила 27.10.10

## SOME PATHWAYS TO OVERCOMING DRUG RESISTANCE OF INFLUENZA A VIRUS TO ADAMANTANE DERIVATIVES

V. I. Shibnev, T. M. Garaev, M. P. Finigenova, E. S. Shevchenko, and E. I. Burtseva

Ivanovsky Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 123098 Russia

A series of adamantane derivatives involving amino acid residues have been synthesized for the first time and their antiviral activity with respect to A(H1N1)v and A(H1N2) subtypes of influenza A virus has been studied. It is established that some of the synthesized compounds can inhibit influenza A virus strains resistant to rimantadine. Thus, restoration of the antiviral activity of rimantadine with respect to resistant influenza strains is possible.

**Key words:** Adamantane derivatives, amino acids, influenza A, rimantadine, drug resistance, 1-adamantanecarboxylic acid