

УДК 577.21

1-(4-Феноксibenзил)-производные 5-аминоурацила и их аналоги – новые ингибиторы репликации аденовирусов человека

Н. А. Никитенко^{1*}, Е. С. Гуреева², А. А. Озеров², А. И. Тухватулин¹, Ф. М. Ижаева¹, В. С. Прасолов³, П. Г. Дерябин¹, М. С. Новиков², Д. Ю. Логунов¹

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

²Волгоградский государственный медицинский университет, 400131, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

*E-mail: nanthalia@gmail.com

Поступила в редакцию 11.10.2017

Принята к печати 26.04.2018

РЕФЕРАТ Отсутствие эффективных способов лечения широко распространенных аденовирусных инфекций делает необходимой разработку новых терапевтических средств. Нами изучено ингибиторное действие новых производных 5-аминоурацила в отношении аденовирусов человека. Выявлена противоаденовирусная активность [4-(фенокси)бензил]-5-(фениламино)-6-азаурацила, 1-[4-(фенокси)бензил]-5-(морфолино)урацила, 1-[4-(4-хлорфенокси)бензил]-5-(морфолино)урацила и 1-[4-(4-фторфенокси)бензил]-5-(морфолино)урацила.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аденовирусы человека, аденовирусная инфекция, ингибиторы репликации аденовирусов, производные 5-аминоурацила, репликация аденовирусов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ HAdV – аденовирус человека; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ГМДС – гексаметилдисульфид.

ВВЕДЕНИЕ

Аденовирусы человека (HAdV) – безоболочечные вирусы, геном которых представлен линейной несегментированной двухцепочечной ДНК [1]. Аденовирусные инфекции, которым подвержены люди всех возрастных групп, характеризуются широким распространением и высокой контагиозностью. Аденовирусы человека чаще всего поражают слизистые оболочки дыхательных путей [2, 3], глаз [4], желудочно-кишечного тракта [5] и мочеполовой системы [6]. Наибольшую опасность аденовирусные инфекции представляют для пациентов с нарушениями иммунной системы (реципиентов трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток, ВИЧ-инфицированных и др.) [7, 8], у которых аденовирусы могут вызывать развитие острых инфекционных заболеваний, приводящих к летальному исходу [9].

Селективные химиотерапевтические средства, высокоэффективные при аденовирусных инфекциях, в настоящее время отсутствуют [10]. Как правило, используют противовирусные средства широкого

спектра действия, такие, как интерферон или индукторы интерферона и препараты на основе кортикостероидов [11]. Однако лекарственные средства, относящиеся к группе индукторов интерферона, недостаточно эффективны из-за нечувствительности аденовирусов к интерферону. Невысокой активностью обладают и производные ацикло-нуклеотидов, например цидофовира – (S)-1-(3-гидрокси-2-фосфонилметоксипропил)цитозин [12], применение которого ограничивает высокая нефротоксичность [13]. Таким образом, актуальным остается поиск нетоксичных химиопрепаратов, эффективных при аденовирусных инфекциях.

Цель представленной работы состояла в изучении ингибиторных свойств новых 5-аминопроизводных урацила [14] в отношении аденовирусов человека. В результате анализа взаимосвязи структуры и биологической активности производных урацила, изученных ранее [15], были сконструированы и синтезированы новые производные 5-аминоурацила, предположительно являющиеся ингибиторами ДНК-

содержащих вирусов. Показано, что эти соединения с высокой эффективностью подавляют репликацию аденовирусов человека *in vitro*. Кроме того, изучена зависимость противоаденовирусного действия от наличия различных заместителей в структуре соединения. Так, определена ключевая роль ароматического фрагмента в выраженности ингибиторной активности исследованных соединений. Таким образом, выявлен новый тип ингибиторов репликации аденовирусов человека. Полученные данные могут послужить основой для исследований в области разработки новых средств противовирусной терапии *in vivo*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали на спектрометре Bruker Avance 400 (Bruker, Германия) (400 МГц для ^1H и 100 МГц для ^{13}C) в ДМСО- D_6 , внутренний стандарт тетраметилсилан. Тонкослойную хроматографию выполняли на пластинах TLS Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия), используя в качестве элюента этилацетат. Пластины проявляли с помощью УФ-лампы VL-6.LC (Vilber, Франция). Температуры плавления измеряли в стеклянных капиллярах на приборе Mel-Temp 3.0 (Laboratory Devices Inc., США).

Исходные 5-(фениламино)урацилы и -6-азаурацилы синтезировали согласно [16], 5-(морфолино)урацил – в соответствии с [17], 4-(фенокси)бензилбромиды получены путем бромирования исходных 4-(фенокси)толуолов молекулярным бромом при облучении светом в кипящем хлороформе в соответствии с [14]. Синтез исходных 1-[ω -(фенокси)алкил]-5-бромурацилов осуществляли путем конденсации эквимольных количеств 2,4-бис(триметилсилилокси)-5-бромпиримидина и 1-бром- ω -(фенокси)алкана при нагревании до 160–170°C в течение 1 ч согласно [18].

Общий метод получения 1-[4-(фенокси)бензил]-5-амино-производных 6-азаурацила (1), (2) и урацила (соединения (3)–(5))

Суспензию 4.90 ммоль 5-амино-6-азаурацила или 5-аминоурацила и 0.1 г (1.87 ммоль) NH_4Cl в 30 мл гексаметилдисилазана (ГМДС) кипятили в течение 12 ч до образования прозрачного раствора. Избыток ГМДС удаляли при пониженном давлении, остаток растворяли в 50 мл безводного 1,2-дихлорэтана, добавляли 4.94 ммоль 4-(фенокси)бензилбромида, после чего полученную смесь кипятили с защитой от влаги воздуха в течение 24 ч. Реакционную массу охлаждали до комнатной температуры, обрабатывали 10 мл изопропилового спирта, упаривали при пониженном давлении, остаток чистили флэш-хроматографией, элюируя смесью хлороформ–метанол (10 : 1).

Фракции, содержащие продукт, объединяли и упаривали досуха при пониженном давлении. Твердый остаток перекристаллизовывали из смеси этилацетат–гексан (2 : 1).

1-[4-(Фенокси)бензил]-5-(фениламино)-6-азаурацил (1). Выход 67%, $T_{\text{пл}}$ 264–266°C, R_f 0.76 (этилацетат). ^1H -ЯМР (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 4.95 (2H, с, CH_2); 6.89–7.03 (5H, м, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'); 7.10 (1H, т, $J = 7.1$ Гц, H-4''); 7.22 (2H, т, $J = 7.6$ Гц, H-3'', H-5''); 7.33 (2H, т, $J = 7.7$ Гц, H-3'', H-5''); 7.38 (2H, д, $J = 8.2$ Гц, H-2'', H-6''); 7.61 (2H, д, $J = 7.8$ Гц, H-2'', H-6''); 8.33 (1H, с, N^3H); ^{13}C -ЯМР (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 52.7; 119.0; 119.1; 119.3; 122.4; 123.9; 128.9; 130.3; 130.4; 132.5; 139.8; 140.0; 148.0; 154.7; 156.8; 157.3.

1-[4-(Фенокси)бензил]-5-[[3,5-дихлорфенил]амино]-6-азаурацил (2). Выход 56%, $T_{\text{пл}}$ 224.5–226°C, R_f 0.78 (этилацетат). ^1H -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 4.95 (2H, с, CH_2); 6.93–6.98 (4H, м, H-2'', H-4'', H-6'', NH); 7.10 (1H, т, $J = 6.9$ Гц, H-4'); 7.22 (2H, т, $J = 7.6$ Гц, H-3', H-5'); 7.33 (2H, д, $J = 7.5$ Гц, H-2', H-6'); 7.39 (2H, д, $J = 8.2$ Гц, H-3'', H-5''); 7.61 (2H, д, $J = 7.8$ Гц, H-2'', H-6''); 8.33 (1H, с, N^3H); ^{13}C -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 31.1; 36.1; 40.3; 51.9; 116.9; 118.9; 120.9; 123.8; 130.3; 130.5; 132.0; 134.2; 139.6; 142.1; 147.9; 154.3.

1-[4-(Фенокси)бензил]-5-(морфолино)урацил (3). Выход 68%, $T_{\text{пл}}$ 182–184°C, R_f 0.41 (этилацетат). ^1H -ЯМР (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 2.82 (4H, с, $2 \times \text{CH}_2$); 3.64 (4H, т, $J = 4.4$ Гц, $2 \times \text{CH}_2$); 4.82 (2H, с, CH_2); 6.96 (2H, д, $J = 8.3$ Гц, H-2', H-6'); 6.98 (2H, д, $J = 8.0$ Гц, H-3'', H-5''); 7.13 (1H, т, $J = 8.0$ Гц, H-4'); 7.18 (1H, с, H-6); 7.32–7.36 (4H, м, H-3', H-5', H-2'', H-6''); 11.37 (1H, с, N^3H). ^{13}C -ЯМР (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 40.3; 50.2; 50.4; 66.3; 118.9; 119.0; 123.9; 127.2; 129.7; 130.2; 130.4; 132.3; 150.1; 156.5; 156.8; 161.2.

1-[4-(4-Хлорфенокси)бензил]-5-(морфолино)урацил (4). Выход 81%, $T_{\text{пл}}$ 204–206°C, R_f 0.32 (этилацетат). ^1H -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 2.82 (4H, с, $2 \times \text{CH}_2$); 3.64 (4H, с, $2 \times \text{CH}_2$); 4.80 (2H, с, CH_2); 6.80 (2H, д, $J = 7.6$ Гц, H-2', H-6'); 7.12 (2H, д, $J = 7.4$ Гц, H-3', H-5'); 7.39 (2H, д, $J = 8.2$ Гц, H-3'', H-5''); 7.61 (2H, д, $J = 7.8$ Гц, H-2'', H-6''); 7.70 (1H, с, H-6); 11.42 (1H, с, N^3H). ^{13}C -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 50.1; 50.5; 67.0; 118.8; 121.1; 122.5; 123.2; 124.5; 134.0; 134.1; 138.5; 149.8; 154.2; 160.1; 164.2.

1-[4-(4-Фторфенокси)бензил]-5-(морфолино)урацил (5). Выход 74%, $T_{\text{пл}}$ 220–222°C, R_f 0.34 (этилацетат). ^1H -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 2.85 (4H, с, $2 \times \text{CH}_2$); 3.66 (4H, с, $2 \times \text{CH}_2$); 4.79 (2H, с, CH_2); 6.79 (2H, д, $J = 7.9$ Гц, H-2', H-6'); 7.11 (2H, д, $J = 7.4$ Гц,

H-3', H-5'); 7.36 (2H, д, $J = 8.2$ Гц, H-3'', H-5''); 7.60 (2H, д, $J = 7.9$ Гц, H-2'', H-6''); 7.69 (1H, с, H-6); 11.47 (1H, с, N³H). ¹³C-ЯМР-спектр (DMCO-D₆), δ, м.д.: 50.2; 50.6; 67.0; 118.8; 121.1; 122.5; 123.2; 124.5; 134.0; 134.1; 138.5; 149.8; 154.0; 154.2; 158.8; 160.1; 164.2.

Общий метод получения 1-[ω-(фенокс)алкил]-5-(морфолино)урацила (соединения (6)–(8))

Смесь 4.61 ммоль 5-бром-1-[ω-(фенокс)алкил]урацила и 1 мл (11.56 ммоль) морфолина кипятили в растворе 50 мл безводного этиленгликоля в течение 2 ч, охлаждали до комнатной температуры, добавляли к 250 мл холодной воды и оставляли на ночь при температуре 4°C. Образовавшийся осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из смеси этилацетат–гексан (3 : 1).

1-[3-(Фенокс)пропил]-5-(морфолино)урацил (6). Выход 66%, $T_{\text{пл}}$ 169–170°C, R_f 0.31 (этилацетат). ¹H-ЯМР-спектр (DMCO-D₆), δ, м.д.: 2.04 (2H, кв, $J = 6.3$ Гц, CH₂); 3.77 (2H, т, $J = 6.0$ Гц, NCH₂); 3.87 (2H, т, $J = 5.7$ Гц, CH₂); 2.82 (4H, с, 2 × CH₂); 3.69 (4H, с, 2 × CH₂); 6.82–6.86 (3H, м, H-2', H-4', H-6'); 7.19 (2H, т, $J = 8.0$ Гц, H-3', H-5'); 7.63 (1H, с, H-6); 11.37 (1H, с, N³H). ¹³C-ЯМР-спектр (DMCO-D₆), δ, м.д.: 28.0; 45.4; 50.1; 50.5; 64.6; 100.9; 112.2; 122.3; 138.6; 145.8; 151.0; 158.4; 163.9.

1-[4-(Фенокс)бутил]-5-(морфолино)урацил (7). Выход 78%, $T_{\text{пл}}$ 156–159°C, R_f 0.65 (этилацетат). ¹H-ЯМР-спектр (DMCO-D₆), δ, м.д.: 1.64 (4H, с, CH₂); 3.67 (2H, т, $J = 6.2$ Гц, CH₂); 3.89 (2H, т, $J = 6.2$ Гц, CH₂); 2.85 (4H, с, 2 × CH₂); 3.66 (4H, с, 2 × CH₂); 6.79–6.83 (3H, м, H-2', H-4', H-6'); 7.13 (2H, т, $J = 8.1$ Гц, H-3', H-5'); 7.64 (1H, с, H-6); 11.41 (1H, с, N³H). ¹³C-ЯМР-спектр (DMCO-D₆), δ, м.д.: 25.3; 25.7; 47.3; 50.4; 51.0; 66.8; 100.9; 114.4; 120.5; 129.5; 145.7; 151.0; 158.6; 165.8.

1-[5-(Фенокс)пентил]-5-(морфолино)урацил (8). Выход 71%, $T_{\text{пл}}$ 162–163.5°C, R_f 0.78 (этилацетат). ¹H-ЯМР-спектр (DMCO-D₆), δ, м.д.: 1.39 (2H, кв, $J = 5.3$ Гц, CH₂); 1.63 (2H, кв, $J = 7.2$ Гц, CH₂); 1.72 (2H, кв, $J = 7.2$ Гц, CH₂); 3.67 (2H, т, $J = 7.2$ Гц, CH₂); 3.93 (2H, т, $J = 6.5$ Гц, CH₂); 2.88 (4H, с, 2 × CH₂); 3.67 (4H, с, 2 × CH₂); 6.83–6.88 (3H, м, H-2', H-4', H-6'); 7.22 (2H, т, $J = 8.0$ Гц, H-3', H-5'); 7.55 (1H, с, H-6); 11.29 (1H, с, N³H). ¹³C-ЯМР-спектр (DMCO-D₆), δ, м.д.: 22.9; 28.6; 28.7; 47.8; 50.5; 51.0; 67.5; 101.2; 114.8; 120.8; 129.9; 146.2; 151.4; 159.0; 164.3.

Вирусы

В работе использовали рекомбинантный аденовирус человека типа 5, экспрессирующий усиленный зеленый флуоресцентный белок (HAdV5-eGFP) [19, 20].

Культура клеток

В работе использовали перевиваемые клетки эмбриона почки человека HEK293 [21]. Клетки линии HEK293 культивировали на среде DMEM (Life Technologies, Великобритания), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Life Technologies, Великобритания), 4 mM L-глутамин, 1 mM пирувата натрия, стрептомицин/пенициллин в концентрации 100 мкг/мл и 100 ед./мл соответственно при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Тест МТТ

Клетки линии HEK293 инкубировали в отсутствие (контроль) или в присутствии различных концентраций исследуемых соединений. Через 24–72 ч к клеткам добавляли 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолийбромид (МТТ); итоговая концентрация МТТ составляла 0.5 мг/мл. После 2 ч экспозиции при 37°C живые клетки восстанавливали желтый МТТ до темно-фиолетовых гранул формазана. Культуральную среду убирали. Гранулы формазана растворяли в ДМСО, количество восстановленного продукта измеряли фотометрически на мультифункциональном планшетном ридере Synergy 2 Multi-Mode Reader (BioTek Instruments, США) при длинах волн 540 и 630 нм [22].

Резазуриновый метод

Клетки линии HEK293 инкубировали в отсутствие (контроль) или в присутствии различных концентраций исследуемых соединений. Через 24–72 ч к клеткам добавляли краситель резазурин (Sigma, США), который восстанавливается митохондриальными дегидрогеназами живых клеток до флуоресцирующего продукта резаруфина (при длинах волн возбуждения и эмиссии 530 и 590 нм). Интенсивность флуоресценции регистрировали на мультифункциональном планшетном ридере Synergy 2 Multi-Mode Reader (BioTek Instruments, США).

Определение количества копий генома аденовируса человека

Для оценки репликации HAdV5-eGFP через 24 ч после инфекции клетки собирали, выделяли суммарную ДНК с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия) согласно рекомендациям производителя. Количественную ПЦР проводили согласно [23] на приборе CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) с использованием реагента iTaq™ Universal Probes Supermix (Bio-Rad, США).

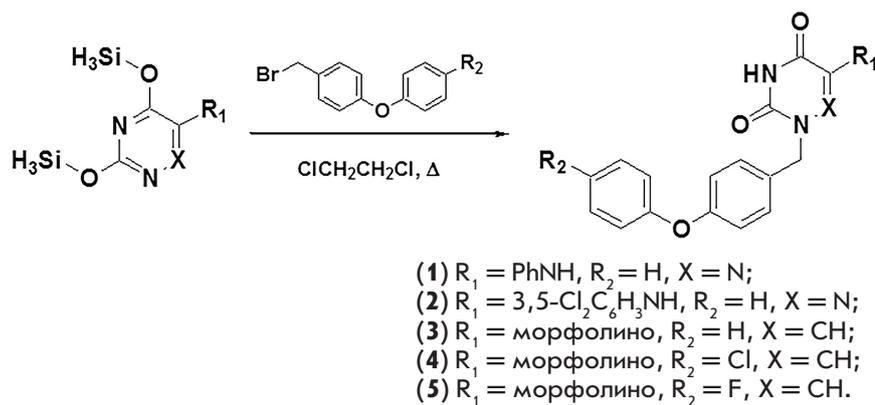


Рис. 1. Схема синтеза 1-[4-(фенокси)бензил]-производных 5-(фениламино)-6-азаурацила (1), 5-[(3,5-дихлорфенил)амино]-6-азаурацила (2), а также 1-[4-(фенокси)бензил]- (3), 1-[4-(4-хлорфенокси)бензил]- (4) и 1-[4-(4-фторфенокси)бензил]-производных 5-(морфолино)урацила (5)

Определение инфекционности аденовирусного потомства

Клетки линии HEK293 заражали HAdV5-eGFP с множественностью инфекции 1 и 10 БОЕ/клетку. Через 3 ч после инфекции добавляли растворы соединений (1) и (3) (примеры 1 и 3 соответственно) в ДМСО в концентрации 25 мкМ. В качестве контроля использовали ДМСО, конечная концентрация которого в культуральной среде не превышала 0.1%. Через 48 ч культуральную среду собирали в микропробирки и замораживали при температуре -70°C . С целью разрушения клеток вирусосодержащую среду размораживали при комнатной температуре и снова замораживали при -70°C . После повторного размораживания аликвоты 10-кратных разведений вирусосодержащих стоков добавляли к клеткам линии HEK293.

Статистическая обработка данных

Все данные представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение (СО). Статистическую значимость определяли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США). Значение $p < 0.05$ считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез соединений

Наиболее близкими по химическому строению к синтезированным соединениям являются 1-бензил-5-(ариламино)-производные урацила [15]. Эти соединения проявляют активность в отношении вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) и вируса Эпштейна–Барр. Это позволило нам предположить, что производные 5-аминоурацила и 5-амино-6-азаурацила, содержащие заместитель у N^1 и являющиеся аналогами описанных соединений, могут проявлять ингибиторную активность в отношении ДНК-содержащих вирусов, в частности аденовирусов.

Синтез 1-[4-(фенокси)бензил]-производных 5-(фениламино)-6-азаурацила (1), 5-[(3,5-дихлорфенил)амино]-6-азаурацила (2), а также 1-[4-(фенокси)бензил]- (3), 1-[4-(4-хлорфенокси)бензил]- (4) и 1-[4-(4-фторфенокси)бензил]-производных 5-(морфолино)урацила (5) был осуществлен путем конденсации 6-амино-3,5-бис(триметилсилилокси)-1,2,4-триазина или 2,4-бис(триметилсилилокси)-5-(морфолино)пиримидина с эквимольным количеством соответствующих 4-(фенокси)бензилбромидов при кипячении в растворе безводного 1,2-дихлорэтана в соответствии с ранее описанным методом [24]. При этом выход соединений (1)–(5) составил 56–81% (рис. 1).

С целью изучения закономерности структура–противовирусная активность нами были синтезированы аналоги 5-(морфолино)-производного (3), у которых 4-(фенокси)бензильный фрагмент у N^1 был заменен на ω -(фенокси)алкильный заместитель. Синтез соединений данной группы осуществлен путем аминирования морфолином 5-бром-1-[ω -(фенокси)алкил]урацила при кипячении в растворе этиленгликоля в соответствии с ранее описанным методом [15]. Выход целевых 5-(морфолино)-производных урацила (6)–(8) составил 66–78% (рис. 2).

Цитотоксичность исследуемых соединений

Цитотоксичность соединений оценивали с помощью прижизненного окрашивания клеток линии HEK293

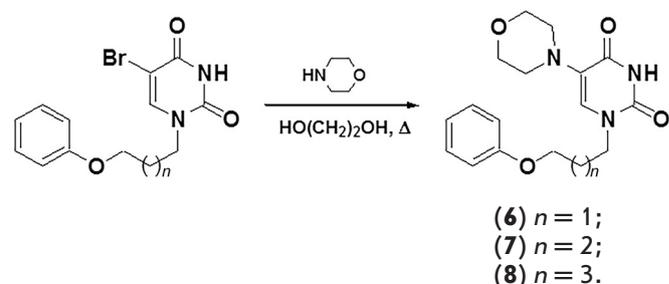


Рис. 2. Схема синтеза 5-(морфолино)-производных урацила (6)–(8)

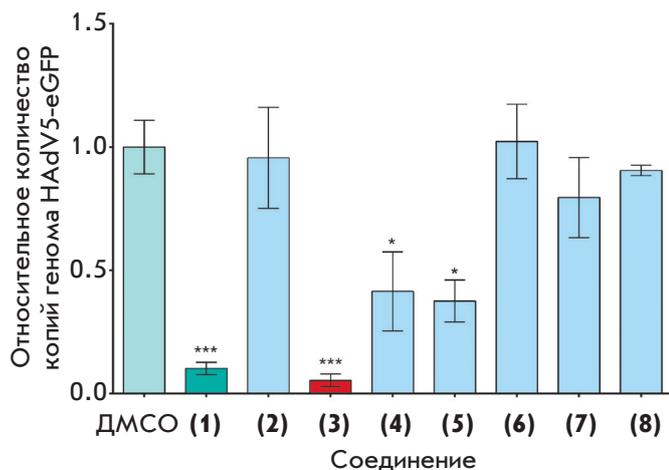


Рис. 3. Оценка относительного количества копий генома HAdV5-eGFP в клетках HEK293 в присутствии исследуемых соединений (25 мкМ). Различия между опытными и контрольными образцами статистически значимы при * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

МТТ или трипановым синим [25]. К клеткам добавляли исследуемые соединения, растворенные в диметилсульфоксиде, в диапазоне концентраций 2.5–200 мкМ. Контролем служили клетки, к которым вместо исследуемых соединений добавляли соответствующее количество ДМСО.

Прижизненное окрашивание клеток HEK293 МТТ проводили через 48 ч после внесения веществ. Токсичность различных доз препарата определяли по жизнеспособности клеток относительно контроля. Все соединения в концентрациях до 25 мкМ не оказывали токсического действия на клетки HEK293. Кроме того, была определена концентрация соединений, проявляющих ингибиторную активность в отношении аденовирусов человека, при которой количество живых клеток сокращается на 50% (TC_{50}). С этой целью подсчитывали клетки, селективно окрашенные трипановым синим, через 48 ч после добавления соединений. Результаты представлены в *табл. 1*.

Исследование противоаденовирусной активности 5-аминопроизводных урацила

В ходе оценки противоаденовирусной активности 5-аминопроизводных урацила клетки линии HEK293 заражали рекомбинантным аденовирусом человека типа 5, экспрессирующим усиленный зеленый флуоресцентный белок HAdV5-eGFP с множественностью инфекции 1 БОЕ/клетку. Через 3 ч после инфекции добавляли исследуемые соединения в концентрации 25 мкМ: этого времени достаточно для завершения начальной стадии инфекционного цикла аденовиру-

Таблица 1. Противоаденовирусная активность производных 5-аминоурацила

Соединение	IC_{50} , мкМ ^а	TC_{50} , мкМ ^б	SI ^в
(1)	9.2	53.6	5.8
(3)	0.5	47.6	95
(4)	8.7	103.1	11.9
(5)	13.1	64.8	4.9

^аКонцентрация полумаксимального ингибирования, при которой наблюдается снижение относительного количества копий генома HAdV5-eGFP на 50% по сравнению с контролем.

^бКонцентрация, при которой количество живых клеток сокращается на 50%.

^вОтношение TC_{50} соединения к его IC_{50} .

са человека (взаимодействия вируса с рецепторами клеточной поверхности и проникновения в клетку). В качестве отрицательного контроля использовали ДМСО. Концентрация ДМСО во всех образцах не превышала 0.1%. Через 24 ч ингибиторную активность соединений оценивали по количеству копий генома HAdV5-eGFP методом количественной ПЦР [23]. Показано, что соединения (1), (3), (4) и (5) проявляют выраженную ингибиторную активность в отношении репликации HAdV5-eGFP (*рис. 3*).

Для соединений (1), (3), (4) и (5), обладающих ингибиторной активностью в отношении аденовирусов человека, была определена концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}), при которой наблюдается снижение относительного количества копий генома HAdV5-eGFP на 50% по сравнению с контролем. Клетки линии HEK293 заражали HAdV5-eGFP с множественностью инфекции 1 БОЕ/клетку. Через 3 ч после инфекции добавляли исследуемые соединения в концентрации 0.5, 2.5, 5, 10, 15 и 25 мкМ. Концентрация ДМСО во всех образцах не превышала 0.1%. Через 24 ч ингибиторную активность соединений оценивали по количеству копий генома HAdV5-eGFP, которое определяли с помощью количественной ПЦР (*рис. 4*). Индекс селективности (SI) рассчитывали как отношение TC_{50} соединения к его IC_{50} (*табл. 1*). На основании количественных показателей ингибирования можно судить об эффективности противовирусного действия ряда соединений, т.е. о степени подавления репликации HAdV5-eGFP в культуре клеток HEK293.

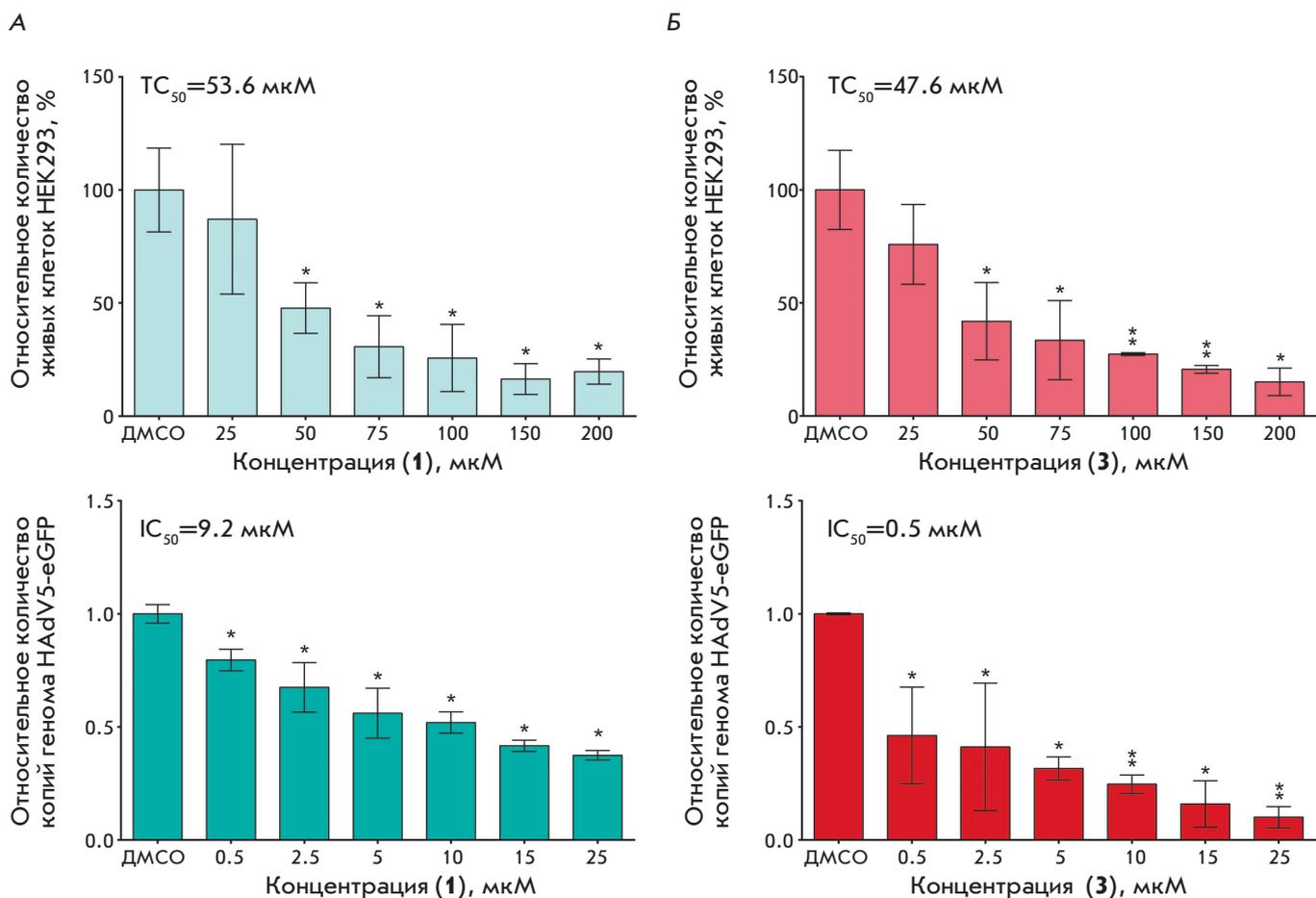


Рис. 4. Противoadеновирусная активность производных 5-аминоурацила. TC_{50} и IC_{50} соединений (1) (А) и (3) (Б). Различия между опытными и контрольными образцами статистически значимы при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Обнаружено, что наибольший противовирусный эффект проявляет 5-(морфолино)-производное (3), IC_{50} которого составила 0.5 мкМ, а $SI = 95$. Производные 6-азаурацила оказались либо на порядок менее активны (соединение (1)), либо вообще не проявляли ингибиторных свойств (соединение (2)). Также показано, что введение атома хлора (соединение (4)) или атома фтора (соединение (5)) в *para*-положение 4-(фенокси)бензильного фрагмента существенно понижает ингибиторную активность. В то же время замена бензила в 4-(фенокси)бензильном фрагменте на алифатическую цепь привела к получению соединений (6)–(8), у которых полностью отсутствует противoadеновирусное действие. Данный факт свидетельствует о высокой значимости ароматического фрагмента в обеспечении противовирусных свойств исследованного ряда соединений.

Кроме того, было оценено влияние наиболее эффективных производных 5-аминоурацила – соединений (1) и (3), на инфекционность аденовирусного

Таблица 2. Титр потомства HAAdV5-eGFP в клетках линии HEK293

Множественность инфекции	Соединение		
	DMCO	(1)	(3)
MOI 1	1×10^4	5.1×10^3	2.3×10^3
MOI 10	2.7×10^6	1.7×10^5	3.7×10^5

потомства HAAdV5-eGFP. Наблюдали снижение титра вирусного потомства под воздействием указанных веществ (табл. 2).

На основании приведенных данных можно предположить, что механизм действия соединений исследуемого класса связан с ингибированием ключевых факторов репликации аденовирусов человека, таких,

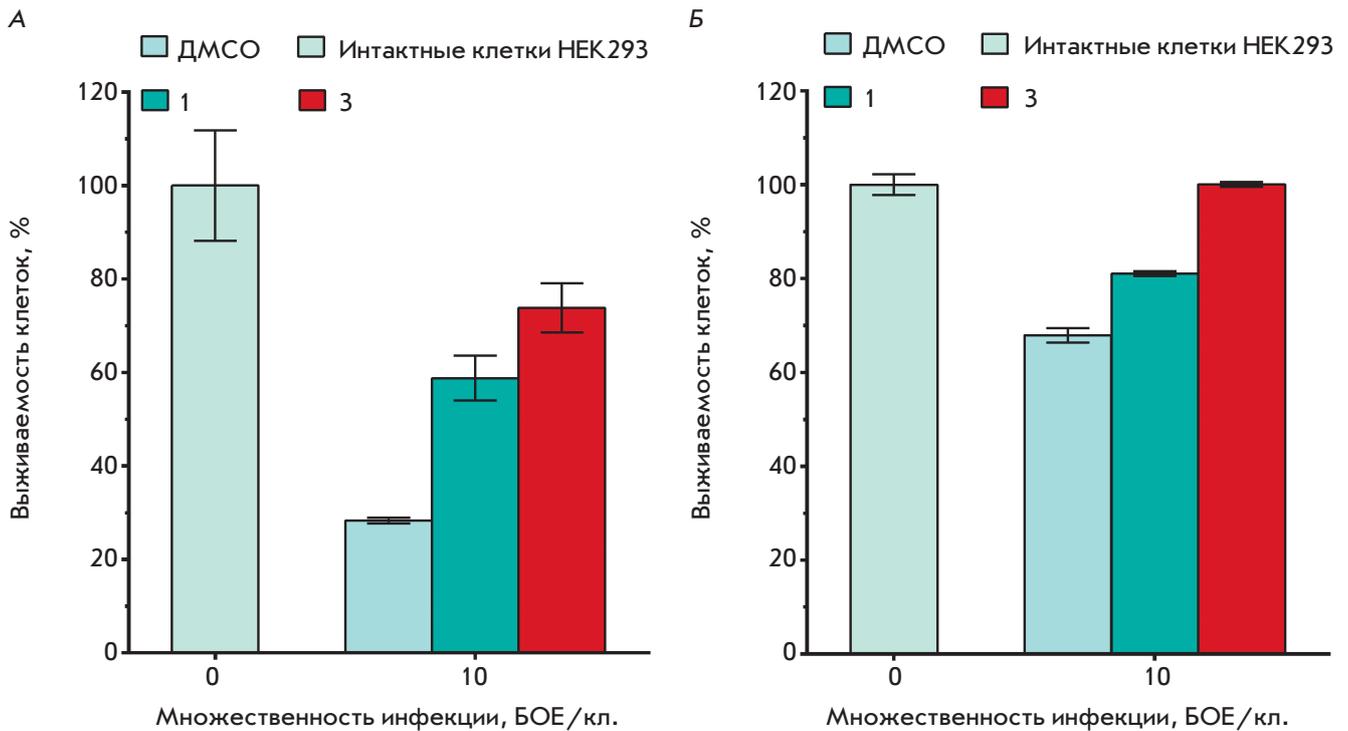


Рис. 5. Выживаемость клеток линии HEK293, инфицированных HAdV5-eGFP, в присутствии 5-аминопроизводных урацила (1) и (3). А – данные, полученные с помощью МТТ-теста. Величина оптической плотности в контрольном образце интактных клеток линии HEK293 принята за 100%. Все данные получены в ходе трех независимых экспериментов. Различия между опытными и контрольными образцами статистически значимы во всех случаях ($p < 0.05$). Б – данные, полученные резазуриновым методом. Интенсивность флуоресценции в контрольном образце интактных клеток линии HEK293 принята за 100%. Все данные получены в ходе трех независимых экспериментов. Различия между образцами группы «ДМСО» и остальными образцами статистически значимы во всех случаях ($p < 0.05$). Статистически значимые различия между образцами интактных клеток и образцами группы «3» отсутствуют

как вирусная ДНК-полимераза и продукты гена *E1A* [26, 27].

В ходе эксперимента была оценена также выживаемость клеток линии HEK293, зараженных HAdV5 с множественностью инфекции 10 БОЕ/клетку, в присутствии веществ (1) и (3) (рис. 5). Через 3 ч после заражения к клеткам добавляли растворы соединений (1) и (3) в ДМСО в концентрации 25 мкМ. Через 48 ч по данным теста МТТ выживаемость клеток при множественности инфекции 10 БОЕ/клетку составляла 74 и 59% в присутствии веществ (1) и (3) соответственно по сравнению с контролем. Эти данные согласуются с результатами, полученными при аналогичном анализе выживаемости клеток в ходе аденовирусной инфекции (МОИ 10 БОЕ/клетку) с использованием резазурина. Так, под действием соединений (1) и (3) доля живых клеток не отличалась статистически значимо от доли в контрольном

образце (рис. 5). Полученные данные указывают на наличие противовирусного эффекта у исследуемых соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, открыт новый тип противоаденовирусных агентов ненуклеозидной природы, которые проявляют ингибирующий эффект в отношении аденовирусов человека. Возможно, соединения данного ряда окажутся перспективными в плане создания на их основе лекарственных средств, эффективных при аденовирусных инфекциях. ●

Работа поддержана грантами Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (гранты МК-1746.2017.7 и МК-2480.2017.7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ghebremedhin B. // *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 2014. V. 4. № 1. P. 26–33.
2. Gupta P, Tobias J.D., Goyal S., Hervie P., Harris J.B., Sadot E., Noviski N. // *J. Intensive Care Med.* 2011. V. 26. № 4. P. 267–272.
3. Lu X., Trujillo-Lopez E., Lott L., Erdman D.D. // *J. Clin. Microbiol.* 2013. V. 51. № 4. P. 1089–1093.
4. Gonzalez-Lopez J.J., Morcillo-Laiz R., Munoz-Negrete F.J. // *Arch. Soc. Esp. Ophthalmol.* 2013. V. 88. № 3. P. 108–115.
5. Eckardt A.J., Baumgart D.C. // *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2011. V. 6. № 1. P. 54–63.
6. Lynch J.P., 3rd, Fishbein M., Echavarria M. // *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2011. V. 32. № 4. P. 494–511.
7. Echavarria M. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2008. V. 21. № 4. P. 704–715.
8. Florescu D.F., Hoffman J.A., the AST Infectious Diseases Community of Practice // *Am. J. Transplant.* 2013. V. 13 Suppl 4. P. 206–211.
9. Robinson C.M., Seto D., Jones M.S., Dyer D.W., Chodosh J. // *Infect. Genet. Evol.* 2011. V. 11. № 6. P. 1208–1217.
10. Pihos A.M. // *J. Optometry.* 2013. V. 6. № 2. P. 69–74.
11. Meyer-Rusenber B., Loderstadt U., Richard G., Kaulfers P.M., Gesser C. // *Dtsch Arztebl. Int.* 2011. V. 108. № 27. P. 475–480.
12. De Clercq E. // *Antiviral Res.* 2007. V. 75. № 1. P. 1–13.
13. Piscitelli S.C., Penzak S.R., Flexner C. // *AIDS and Other Manifestations of HIV Infection* / Ed. Wormser G. San Diego: Acad. Press, 2004. P. 913–930.
14. Новиков М.С., Никитенко Н.А., Озеров А.А., Гуреева Е.С., Прасолов В.С., Прокофьева М.М., Джаруллаева А.Ш., Тухватулин А.И., Логунов Д.Ю. // Пат. 2628456 Российская Федерация. С07D 239/545 (2006.01), А61К 31/513 (2006.01), А61Р 31/14 (2006.01) 2016.
15. Novikov M.S., Buckheit R.W., Jr., Temburnikar K., Khandazhinskaya A.L., Ivanov A.V., Seley-Radtke K.L. // *Bioorg. Med. Chem.* 2010. V. 18. № 23. P. 8310–8314.
16. Gerns F.R., Perrotta A., Hitchings G.H. // *J. Med. Chem.* 1966. V. 9. № 1. P. 108–115.
17. Phillips A.P. // *J. Am. Chem. Soc.* 1951. V. 73. № 3. P. 1061–1062.
18. Novikov M.S., Babkov D.A., Paramonova M.P., Khandazhinskaya A.L., Ozerov A.A., Chizhov A.O., Andrei G., Snoeck R., Balzarini J., Seley-Radtke K.L. // *Bioorganic Med. Chem.* 2013. V. 21. № 14. P. 4151–4157.
19. Шмаров М.М., Черенова Л.В., Шашкова Е.В., Логунов Д.Ю., Верховская Л.В., Капитонов А.В., Неугодова Г.Л., Доронин К.К., Народицкий Б.С. // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.* 2002. № 2. P. 30–35.
20. Logunov D.Y., Zubkova O.V., Karyagina-Zhulina A.S., Shuvalova E.A., Karpov A.P., Shmarov M.M., Tutykhina I.L., Alyapkina Y.S., Grezina N.M., Zinovieva N.A., et al. // *J. Virol.* 2007. V. 81. № 18. P. 9641–9652.
21. Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R. // *J. Gen. Virol.* 1977. V. 36. № 1. P. 59–74.
22. Mosmann T. // *J. Immunol. Methods.* 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.
23. Heim A., Ebnet C., Harste G., Pring-Akerblom P. // *J. Med. Virol.* 2003. V. 70. № 2. P. 228–239.
24. Babkov D.A., Chizhov A.O., Khandazhinskaya A.L., Corona A., Esposito F., Tramontano E., Seley-Radtke K.L., Novikov M.S. // *Synthesis.* 2015. V. 47. № 10. P. 1413–1422.
25. Strober W. // *Curr. Protoc Immunol.* 2001. Appendix 3. Appendix 3B.
26. Nikitenko N.A., Speiseder T., Lam E., Rubtsov P.M., Tonaeva K.D., Borzenok S.A., Dobner T., Prassolov V.S. // *Acta Naturae.* 2015. V. 7. № 3. P. 100–107.
27. Nikitenko N.A., Speiseder T., Groitl P., Spirin P.V., Prokofjeva M.M., Lebedev T.D., Rubtsov P.M., Lam E., Riecken K., Fehse B., et al. // *Biochimie.* 2015. V. 113. P. 10–16.