

УДК 577.2:616-006:578.828

# Антиретровирусная активность нового производного пиримидил-ди(дiazодиспироалкана)

Е. А. Новоселова<sup>1\*</sup>, О. Б. Рябова<sup>2</sup>, И. А. Ленева<sup>3</sup>, В. Г. Нестеренко<sup>1</sup>, Р. Н. Болгарин<sup>1</sup>, В. А. Макаров<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС», 125252, Москва, ул. Авиаконструктора Микояна, 12

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии, лаборатория биомедицинской химии, 119071, Москва, Ленинский просп., 33-26

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, лаборатория экспериментальной вирусологии, 105064, Москва, Малый Казенный пер., 5

\*E-mail: helen.novoselova@gmail.com

Поступило в редакцию 01.02.2017

Принято к печати 16.02.2017

**РЕФЕРАТ** Синтезирован 3,3'-(2-метил-5-нитропиримидин-4,6-диил)бис-3,12-диаза-6,9-дiazониадиспиро[5.2.5.2]гексадекан тетрагидрохлорид дигидрохлорида, соединение, ингибирующее репликацию вирусов различных семейств, использующих гепарансульфатпротеогликаны для прикрепления к клетке хозяина. Это соединение показало высокую эффективность в отношении ряда штаммов ВИЧ.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** HIV, ВИЧ, гепарансульфат, диспироединения, противовирусная активность.

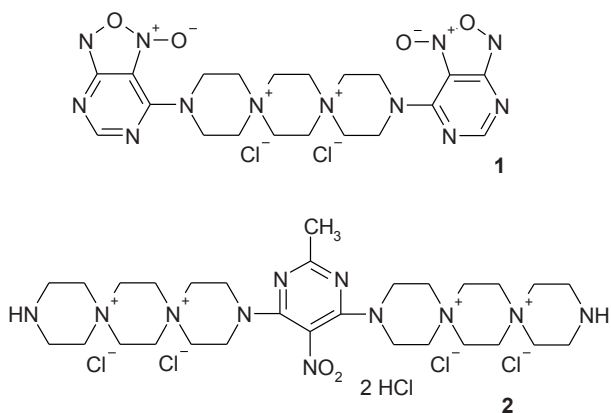
## ВВЕДЕНИЕ

Считается, что наиболее перспективным направлением в области поиска как противовирусных, так и противомикробных лекарственных препаратов, является поиск соединений, блокирующих взаимодействие между патогеном и клеткой хозяина. Этот подход имеет ряд преимуществ, особенно в случае противовирусных средств, поскольку активному соединению нет необходимости проникать внутрь клетки, что позволяет резко снизить как цитотоксичность, так и общую токсичность используемого вещества.

Действительно, на первом этапе развития вирусной инфекции происходит адгезия вируса к клетке, что реализуется через связывание специфических вирусных белков с определенными молекулами клеточной поверхности. Наиболее часто адгезия осуществляется за счет специфического присоединения к гепарансульфатпротеогликанам (HSPG), находящимся на поверхности клетки. Известно, что этот механизм используют такие вирусы, относящиеся к разным семействам, как герпесвирусы типа 1 и 2 (HSV-1, -2) [1], папилломавирусы (HPV) [2], цитомегаловирус человека (HCMV) [3], некоторые штаммы вируса иммунодефицита человека (HIV) [4], респираторно-синцитиальный вирус человека (HRSV) [5], вирусы гепатита В и С (HBV и HCV) [6] и др.

Наиболее известным и подробно изученным ингибитором процесса адгезии является N,N-бис(1-оксидо[1,2,5]оксадиазоло[3,4d]пиримидин-7-ил)-3,12-диаза-6,9-дiazония(5,2,5,2)диспирогексадекана дихлорид **1** (рисунки), ранее синтезированный нами. Показано, что данное соединение **1** и его аналоги, включающие диспиротрипиперазиновый фрагмент, эффективно обратимо связываются с HSPG клетки и таким образом препятствуют прикреплению вирусов [7]. Диспироединение **1** ингибирует репликацию у представителей семейства вирусов герпеса [8], а также вирусов других семейств, использующих HS в качестве рецептора либо корецептора [3]. Однако метаболическая нестабильность соединения **1**, обусловленная разложением с выделением оксида азота, не позволила изучить его биологические свойства [9].

Поэтому нами была предпринята попытка получения нового производного диспиротрипиперазиния: проведен дизайн оптимального соединения, способного связываться с известными HSPG с учетом потенциальной метаболической стабильности целевого соединения, и осуществлен синтез 3,3'-(2-метил-5-нитропиримидин-4,6-диил)бис-3,12-диаза-6,9-дiazониадиспиро[5.2.5.2]гексадекан тетрагидрохлорид дигидрохлорида **2**. Предполагалось, что диспиропиперазин **2**, представляя собой химически более стабильную структуру, будет так же эффективно бло-



Строение N,N-бис(1-оксидо[1,2,5]окса-  
дiazоло[3,4d]-пиримидин-7-ил)-3,12-диаза-6,9-  
дiazония(5,2,5,2)-диспирогексадекана дихлорид (**1**)  
и 3,3'-(2-метил-5-нитропиримидин-4,6-диил)бис-3,12-  
дiazония(5,2,5,2)-диспирогексадекана тетра-  
хлорид дигидрохлорида (**2**)

кировать HSPG клетки и тем самым препятствовать адгезии вируса к клетке, что должно привести к нарушению жизненного цикла вируса и снижению его титра.

В настоящей работе мы сообщаем о высокой антиретровирусной активности нового производного диспиротрипиперазина **2**, что полностью подтверждает выдвинутую нами гипотезу. В данный момент диспиросоединение **2** проходит углубленные доклинические исследования.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводили в Национальном институте рака (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, США). Противовирусную активность определяли с использованием ХТТ-теста [10] при различных концентрациях соединения и инкубировании клеток (линии СЕМ-SS, МТ-2, МТ-4) в присутствии серийных разведений диспиропиперазина **2** (растворяли в диметилсульфоксиде, DMSO) в течение 6 дней при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> с последующим добавлением реагентов ХТТ. Метод основан на спектрометрическом определении уровня формазана, трансформированного живыми клетками из водорастворимой тетразолиевои соли ХТТ.

Использовали следующие штаммы ВИЧ: эталонный HIV-1 IIIB; чувствительные к азидотимидину HIV-1 6S, HIV-1 RF; лекарственно-устойчивые штаммы HIV-1 N119 (устойчив к невирапину, мутация Y181C), HIV-1 DPS (устойчив к дифенилсульфону, мутация Y181C) и HIV-1 A-17 (устойчив к невирапину, мутации K103N, Y181C). Также ис-

### Противовирусная активность диспиропиперазина **2** в отношении различных штаммов вируса

Штамм вируса	Линия клеток	CC <sub>50</sub> <sup>2</sup> мкМ	IC <sub>50</sub> <sup>2</sup> мкМ	TI (CC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> )
HIV-1 6S	MT-2	98.2	1.4	71.4
HIV-1 IIIB	MT-4	200.0	5.7	35.0
HIV-1 RF	СЕМ-SS	197.0	150.0	1.3
HIV-1 N119	MT-4	200.0	31.7	6.3
HIV-1 DPS	MT-4	200.0	1.2	170.0
HIV-1 A-17	MT-2	79.1	4.7	16.7
HIV-1 A-17	MT-4	200.0	33.7	5.9
HIV-2 ROD	СЕМ-SS	200.0	13.3	15.0
SIV MAC 251	MT-4	200.0	6.3	31.5

Примечание. CC<sub>50</sub> – цитотоксическая концентрация; IC<sub>50</sub> – концентрация полумаксимального ингибирования; TI – терапевтический индекс.

пользовали штамм HIV-2 ROD и вирус иммунодефицита обезьян SIV MAC 251.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, представленные в *таблице*, показывают, что синтезированный нами диспиротрипиперазин **2** эффективно ингибирует репликацию HIV-1 и -2 и SIV. При этом, в отличие от полученных ранее данных об активности соединения **1** против вирусов герпеса, наблюдали достаточно широкий диапазон чувствительности HIV и SIV.

Среди проверенных штаммов наиболее чувствительными к ингибирующему действию диспиросоединения **2** оказались HIV-1 6S и HIV-1 DPS – IC<sub>50</sub> = 1.37 и 1.17 мкМ соответственно. В отличие от этих штаммов, HIV-1 RF оказался в 100 раз менее чувствительным к исследуемому соединению (IC<sub>50</sub> = 150 мкМ).

В отличие от вирусов HSV, где значения IC<sub>50</sub> уступали в одном диапазоне, как и значения, задаваемые для всех испытываемых штаммов (от 8.2 до 20.4 мкМ), ингибирование репликации HIV сильно зависело от используемых штаммов, где значения IC<sub>50</sub> варьировались от 150 мкМ (HIV-1 RF на клеточной линии СЕМ-SS) до 1.4 мкМ (HIV-1 6S на клетках МТ-2). В случае штамма HIV-1 A-17 значения IC<sub>50</sub> определяли на разных клеточных линиях, и они варьировали от 33.7 мкМ в линии МТ-4 до 4.7 мкМ в линии МТ-2.

Столь существенные различия в значениях IC<sub>50</sub> (как для одной клеточной линии, но разных штаммов HIV, так и для одного штамма, но на разных клеточных культурах) могут быть обусловлены двумя

причинами. Во-первых, различные клеточные линии могут иметь разную концентрацию поверхностных гепарансульфатпротеогликанов. Во-вторых, достоверно показано, что штаммы ВИЧ значительно отличаются друг от друга по эффективности использования корецепторов (CCR5 и CXCR4) на этапе прикрепления к клетке-мишени [11].

В отличие от вирусов герпеса, структура присоединения HIV при поддержке гепарансульфата до сих пор не получила подтверждения методом рентгеноструктурного анализа, и возможность взаимодействия с клеткой хозяина с использованием гепарансульфатпротеогликанов для HIV известна только по литературным данным.

Предполагается, что новый класс производных пиримидил-ди( diazодиспираолканов) можно будет использовать в качестве противовирусных средств.

На это указывают такие факторы, как специфичность ингибирующего действия, показанная на примере диспиротрипиперазиния **2** в отношении штаммов вирусов; способность диспиросоединений формировать очень стабильные связи с некоторыми вирусными рецепторами или корецепторами; состав с химически определяемой низкой молекулярной массой [7].

Необходимо отметить, что такой механизм действия очень перспективен в плане преодоления резистентности вирусов к официальным лекарственным средствам, так как он воздействует не на сам вирус, а на клетку. Благодаря указанным свойствам соединения данного класса могут служить ценным инструментом для изучения взаимодействий между вирусом и клеткой.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shukla D., Spear P.G. // *J. Clin. Invest.* 2001. V. 108. № 4. P. 503–510.
2. Selinka H.C., Giroglou T., Sapp M. // *Virology.* 2002. V. 299. № 2. P. 279–287.
3. Paeschke R., Woskoboynik I., Makarov V., Schmidtke M., Bogner E. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014. V. 58. № 4. P. 1963–1971.
4. Patel V., Ferguson M., Minor P.D. // *Virology.* 1993. V. 192. № 1. P. 361–364.
5. Hallak L.K., Spillmann D., Collins P.L., Peeples M.E. // *J. Virol.* 2000. V. 74. № 22. P. 10508–10513.
6. Jiang Y.F., He B., Ma J., Li N.P., Gong G.Z., Cheng D. // *Acta Gastroenterol. Belg.* 2012. V. 75. № 3. P. 316–321.
7. Schmidtke M., Wutzler P., Makarov V. // *Lett. Drug Design & Discovery.* 2004. V. 1. № 4. P. 293–299.
8. Artemenko A.G., Muratov E.N., Kuz'min V.E., Kovdienko N.A., Hromov A.I., Makarov V.A., Riabova O.B., Wutzler P., Schmidtke M. // *J. Antimicrobial Chemotherapy.* 2007. V. 60. № 1. P. 68–77.
9. Каминка М.Э., Калинин М.А., Пушкина Т.В., Тупкина С.М., Рябова О.Б., Макаров В.А., Граник В.Г. // *Эксп. и клин. фармакол.* 2004. Т. 67. № 3. С. 30–33.
10. Weislow O.S., Kiser R., Fine D.L., Bader J., Shoemaker R.H., Boyd M.R. // *J. Natl. Cancer Inst.* 1989. V. 81. № 8. P. 577–586.
11. O'Brien S.J., Moore J.P. // *Immunol. Rev.* 2000. V. 177. P. 99–111.