

УДК 578.242/.44+578.282

Исследование эффективности новых ингибиторов вирусного канала M2 (R)-6-(1-адамантил)-1,3-оксазинан-2-она и (R)-6-(1-адамантил)-пиперидин-2,4-диона в отношении штамма вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 на модели гриппозной пневмонии мышей

Е. А. Глубокова¹, И. А. Ленева¹, Н. П. Карташова¹, И. Н. Фалынскова¹, Р. М. Тихов², Н. Ю. Кузнецов^{2*}

¹Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, 105064 Россия

²Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, 119991 Россия

*E-mail: eaglubokova@yandex.ru, nkuznff@ineos.ac.ru

Поступила в редакцию 17.06.2020

Принята к печати 12.10.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11020

РЕФЕРАТ Всемирная организация здравоохранения для борьбы с гриппозной инфекцией в дополнение к вакцинации рекомендует применение препаратов прямого вирусспецифического действия, одним из которых является римантадин. Однако у всех циркулирующих штаммов вируса гриппа А выявлена резистентность к римантадину, поэтому актуален поиск аналогов этого препарата, эффективных в отношении резистентных к римантадину вирусов гриппа. В представленной работе эффективность двух адамантильных азагетероциклических производных римантадина изучена на модели гриппозной пневмонии мышей, индуцированной римантадин-резистентным вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1). Мыши BALB/c, инфицированные вирусом, получали препараты перорально в дозах 15 и 20 мг/кг/день в течение 5 дней (первую дозу давали за 4 ч до инфицирования). Эффективность препаратов оценивали по выживаемости животных, продолжительности жизни, уменьшению потери массы и титра вируса в легких. Лечение обоими соединениями в указанных дозах обеспечивало защиту 60–100% животных, увеличивало среднюю продолжительность жизни, снижало потерю веса и ингибировало размножение вируса в легких по сравнению с группой вирусного контроля. Оба соединения были более эффективными, чем римантадин в аналогичных дозах и схеме. Изучение чувствительности вирусов, выделенных из легких животных, получавших перорально в течение 5 дней соединения, в культуре клеток MDCK, не выявило возникновения резистентности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вирус гриппа, противовирусные препараты, римантадин, модели гриппозной пневмонии мышей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СПЖ – средняя продолжительность жизни; ТЦИД₅₀ – тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя; МЛД – мышьяная летальная доза; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; MEM – Minimum Essential Medium (среда Игла); MDCK – Madin–Darby canine kidney (клетки почки собак Madin Darby); ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; ИФА – иммуноферментный анализ; ДМСО – диметилсульфоксид; РМТ – римантадин, пндм (pdm) – пандемический.

ВВЕДЕНИЕ

Грипп – это высококонтагиозное респираторное вирусное заболевание человека и многих видов млекопитающих и птиц. Несмотря на доступность различных вакцин и противовирусных препаратов, вирусы гриппа вызывают ежегодные эпидемии по всему миру [1]. Ежегодно от гриппа и его осложнений умирают до 650000 человек, при этом только в США до 40000 [2]. На протяжении последних 10–15 лет ежегодно регистрируется от 27.3 до 47.2 млн случаев ОРВИ, причем удельный вес гриппа в структуре ОРВИ в зависимости от интенсивности эпидемий колеблется от 25 до 60%. Особое беспокойство вызывают пандемии гриппа, которые обычно возникают каждые 20–30 лет. Помимо непосредственного влияния на здоровье населения, особенно из групп риска [2], инфекция оказывает колоссальный негативный экономический эффект, что показала современная пандемия COVID-19. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) считает вакцинацию основной стратегией борьбы с гриппом. Однако из-за высокой и непредсказуемой изменчивости поверхностных белков вируса состав вакцины постоянно меняется в зависимости от антигенной структуры циркулирующих штаммов вирусов гриппа. Поэтому ВОЗ в дополнение к вакцинации рекомендует этиотропные препараты прямого вирусспецифического действия, что особенно актуально при пандемии, вызванной

новыми штаммами вируса гриппа А. В настоящее время во всем мире одобрены два класса синтетических низкомолекулярных препаратов [1, 3, 4]: **блокаторы канала М2** – аминокатамантаны – амантадин и римантадин (рис. 1); **ингибиторы нейраминидазы** – озельтамивир, занамивир, перамивир, ланинамивир (только в Японии) (рис. 1). Адамантановые блокаторы канала М2 относятся к первому поколению противовирусных препаратов, эффективных в отношении вируса гриппа типа А. Хотя эти препараты успешно использовали в течение более 30 лет [3, 4], с 2006 года их применение не рекомендовано из-за развития лекарственной резистентности к ним у большинства циркулирующих штаммов [5]. Возникновение резистентности отмечено как в результате эволюционных изменений вируса гриппа, так и непосредственно в процессе лечения римантадином и амантадином. Быстрое (через 1–2 пассажа) возникновение резистентных к этим препаратам штаммов показано в многочисленных экспериментах на животных и в культуре клеток, а развитие резистентности в человеческой популяции может происходить уже через 2–4 дня после начала лечения [6]. Генетическая основа резистентности обусловлена мутациями в гене 7 во второй рамке считывания, кодирующей белок М2, и связана с заменой аминокислот в позициях L26, V27, A30, S31 и G34 [7]. Мутация S31N (серин – аспарагин) – наиболее распространенная причина

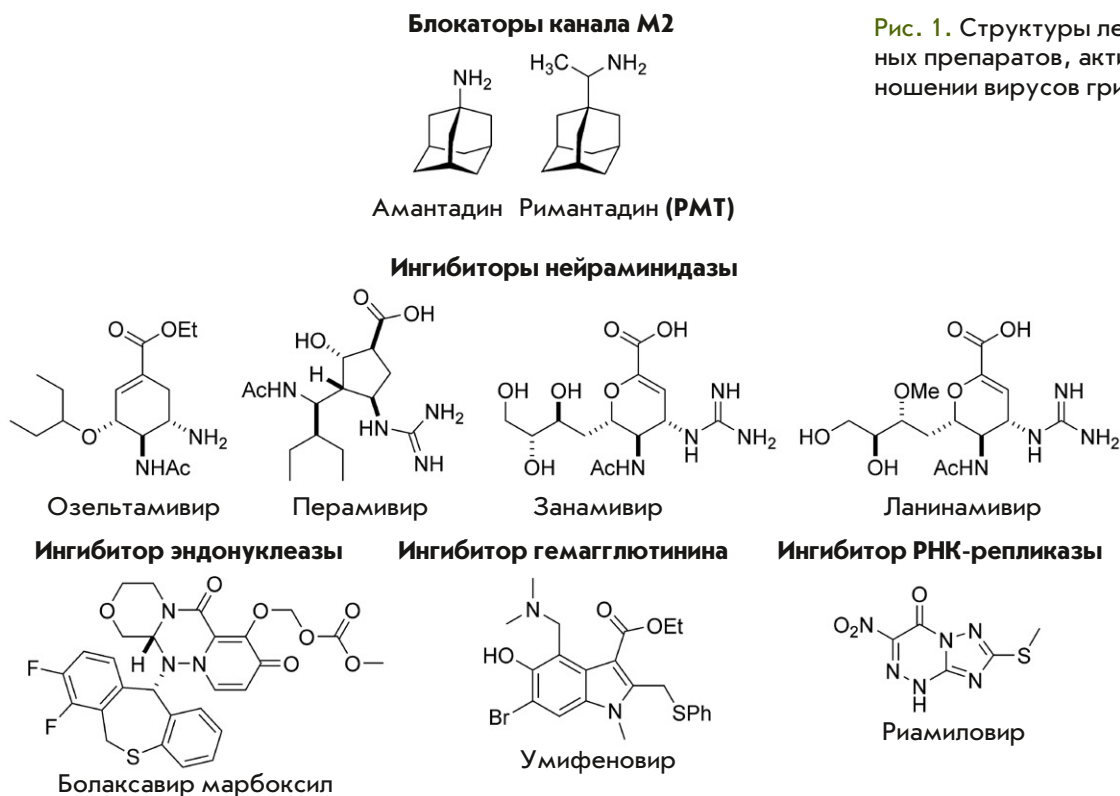


Рис. 1. Структуры лекарственных препаратов, активных в отношении вирусов гриппа

резистентности штаммов вируса гриппа А человека, птиц и свиней [8]. Тем не менее уникальный и громадный опыт успешного клинического применения препаратов адамантанового ряда, показавший их высокую эффективность, оставляет эти препараты в арсенале средств противовирусной терапии на случай возникновения вирусов, чувствительных к ним, но резистентных к другим противогриппозным препаратам, в частности к ингибиторам нейраминидазы. Следует отметить, что возникновение резистентности к озельтамивиру отмечается регулярно, но особенно масштабно это проявилось в период сезонного гриппа в 2008–2009 годах, когда практически все циркулирующие штаммы H1N1 имели мутацию N275Y в гене нейраминидазы [9], сохранив чувствительность к адамантанам.

В результате исследований, направленных на преодоление существующей резистентности вирусов гриппа к препаратам двух первых классов, получен ингибитор эндонуклеазы балоксавир марбоксил, обладающий высокой эффективностью в отношении различных штаммов вируса гриппа А и В (одобрен в Японии, проходит последнюю стадию испытаний в США) [10–12]. Кроме того, в России и Китае одобрен препарат умифеновир («Арбидол») – ингибитор процесса фузии, индуцируемой гемагглютинином [13, 14], а также риамилловир («Триазавирин», Россия) – ингибитор РНК-репликазы (рис. 1).

Несмотря на то что в разработке и клинической практике находится целый ряд соединений, способных противостоять резистентным штаммам, наличие

набора комплементарных противовирусных средств с разным механизмом действия представляет надежный способ защиты от возникновения пандемии [15]. К сожалению, на сегодняшний день отсутствуют одобренные эффективные блокаторы канала с мутацией S31N. Недавно было показано, что экспериментальные M2-ингибиторы достаточно устойчивы к развитию резистентности [16], а подавляющее большинство возникающих штаммов с соответствующими мутациями [16, 17] не сохраняется в популяции, что позволяет полагать, что разработка таких ингибиторов перспективна.

Ранее мы разработали удобный метод синтеза новых энантиомерно чистых адамантильных производных 1,3-оксазинов и пиперидинов **3–7** из соответствующих энантиомерных гомоаллиламинов **1** (схема 1). Ключевыми стадиями процесса были реакции циклобромокарбамирания (**1** в **2** и **3**), дегидробромирования под действием *t*BuOK (**2** в **4**) и енолат-изоцианатная перегруппировка (**4** в **5**). Последние две реакции в случае бромидов **3** проводятся в «одной колбе». Дикетон **5** далее постадийно восстанавливали в 4-гидроксилактам (**6**) и 4-гидроксипиперидин (**7**). Оказалось, что соединения **3–7** ингибируют *in vitro* репликацию пандемических штаммов H1N1 А/Калифорния/7/2009 и А/ИВ–Оренбург/29–L/2016 [18]. Оба штамма содержат мутацию S31N, ответственную за резистентность к римантадину/амантадину. Среди пар энантиомеров, (*R*)-изомеры (асимметрический центр при адамантильной группе) **3–5**, **7** наиболее эффективно ингибировали репликацию

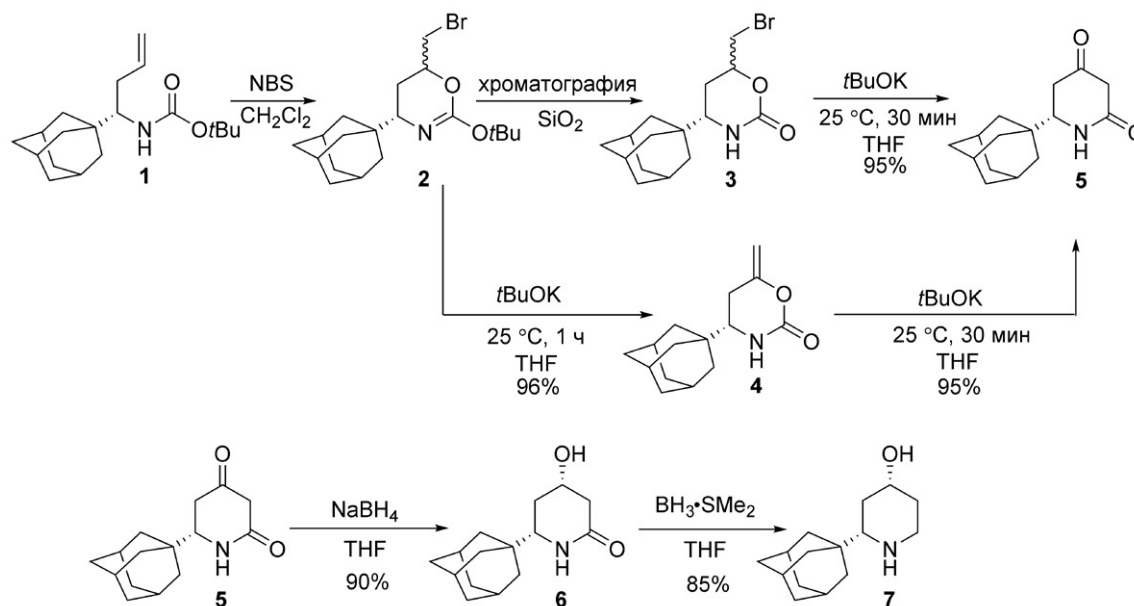


Схема 1. Структуры новых производных адамантана, активных в отношении римантадин-резистентных штаммов вируса гриппа H1N1

Таблица 1. Подавление репликации вируса гриппа А ингибиторами **3–7** *in vitro*

Штамм вируса	ИК ₅₀ (ингибирующая концентрация), мкМ			
	3	4	5	7
А/Калифорния/7/2009 (H1N1)	11.3	8.1	20.6	18.4
А/ИВ–Оренбург/29–L/2016 (H1N1)	20.1	7.7	27.1	17.7

вируса *in vitro* (схема 1, табл. 1). Поскольку ингибирующая активность соединений оказалась высокой, в следующей серии опытов была изучена их эффективность *in vivo*.

Соединение **3** исключено из исследований из-за его низкой растворимости в водных растворах, а соединение **7** в диастереомерно чистом виде оказалось достаточно сложным для синтеза. Таким образом, были выбраны адамантильные производные 1,3-оксазинан-2-она (**4**) и пиперидин-2,4-диона (**5**), синтез которых был прост, а растворимость приемлема. Активность соединений оценивали на модели гриппозной пневмонии мышей, индуцированной резистентным к римантадину вирусом гриппа А/Калифорния/04/09 (H1N1).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Препараты и их приготовление

(R)-Изомеры соединений **4** и **5** синтезированы из соответствующего (R)-N-Вос-производного адамантильного гомоаллиламина **1**, согласно описанным методикам [18]. В экспериментах использовали свежеприготовленные растворы соединений **4**, **5** и римантадина (**РМТ**) в 50% водном ДМСО. Исследуемые растворы вводили мышам перорально в объеме 200 мкл. Животные получали соединения **4**, **5** и **РМТ** в дозах 15 и 20 мг/кг/день.

Клетки и вирусы

В исследованиях использовали штамм вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1), полученный от ВОЗ и адаптированный к мышам путем трех пассажей через легкие. Гриппозную инфекцию у животных моделировали, используя наработанный вирус, выращенный в аллантоисной полости 9-дневных куриных эмбрионов в течение 48 ч при 37°C по общепринятой методике [19].

Животные

Мышей BALB/c (самки весом 12–14 г) получали из питомника «Андреевка» (Московская обл.). Содержание животных соответствовало правилам

по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник. Животных кормили брикетированными кормами в соответствии с утвержденными нормами. Проведение экспериментов утверждено Биоэтическим Комитетом по работе с животными НИИВС им. И.И. Мечникова.

Определение эффективности препаратов на модели вирусной пневмонии мышей

Животных разбивали на группы и помещали в клетки (по 8–13 особей). В день начала эксперимента мышей взвешивали. Мышей инфицировали интраназально под легким наркозом. В первой серии опытов использовали высокую дозу заражения МЛД₅₀, соответствующую 4.5 lg ТЦИД₅₀. Во второй серии экспериментов использовали низкую дозу МЛД₅₀, соответствующую 4.0 lg ТЦИД₅₀. Соединения **4**, **5** и контрольный препарат **РМТ** вводили в объеме 200 мкл перорально за 4 ч до и после инфекции и далее в течение 5 дней 2 раза в день. Параллельно животным контрольной группы, инфицированным вирусом гриппа и не получавшим лечения, вводили фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (опыт I) или 50% раствор ДМСО (опыт II). За животными наблюдали в течение 16 дней. Мышей, имеющих признаки тяжелого течения инфекции и потерявших 30% первоначального веса, гуманно умерщвляли. Эффективность соединений на модели вирусной пневмонии мышей оценивали по следующим критериям: выживаемость, увеличение средней продолжительности жизни, уменьшение снижения веса и титра вируса в легких животных, получавших лечение, по сравнению с контрольной группой. Среднюю продолжительность жизни (СПЖ) высчитывали по формуле:

$$СПЖ = \sum f(d-1)/n,$$

где *f* – число мышей, умерших на день *d*, *n* – количество мышей в группе. Для выживших мышей *d* ограничено 21 днем. Уменьшение или увеличение веса рассчитывали для каждой мыши отдельно и выражали в процентах. За 100% принимали вес животного перед инфицированием. Для всех мышей одной группы определяли среднее значение потери или увеличения веса. На 4 день после инфицирования вирусом гриппа забивали по три мыши из каждой группы и в стерильных условиях извлекали легкие. После промывки в растворе стерильного 0.01 М ФСБ легкие гомогенизировали и ресуспендировали в 1 мл холодного ФСБ. После отделения клеточного дебриса центрифугированием (2000 *g*, 10 мин) супернатант использовали для определения инфекционного титра вируса в культуре клеток MDCK общепринятым ме-

тодом. Титр вируса в легких рассчитывали как среднее значение $\lg \text{ТЦИД}_{50}/\text{мл} \pm \text{SD}$.

Статистическую обработку проводили с использованием порангового критерия Мантеля–Кокса в программе Statistica 8.0, $p < 0.05$ рассматривали как статистически значимое отличие от контроля.

Изучение противовирусной активности препаратов в культуре клеток MDCK

Сток-растворы образцов и **РМТ** (1 мг/мл) готовили в ДМСО. Полученные растворы разводили до концентрации 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 и 10 мкг/мл культуральной средой MEM. Для определения противовирусной активности соединений клетки MDCK рассаживали в 96-луночные планшеты фирмы Costar и выращивали до полного монослоя. Перед началом исследований клетки промывали средой MEM, добавляли соединения **4**, **5** и **РМТ** в указанных концентрациях и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. По окончании инкубации во все лунки, исключая контрольные, добавляли выделенный вирус. Далее планшеты инкубировали в течение 24 ч в атмосфере 5% CO₂ при 37°C и фиксировали 80% ацетоном на ФСБ. Противовирусную активность препаратов определяли по уровню экспрессии вирусных антигенов с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Для каждой опытной точки использовали четыре лунки планшета, а каждое значение представляли как среднее арифметическое, вычисленное из трех независимых опытов.

Нуклеотидный анализ гена белка М

Молекулярный маркер резистентности к препаратам адамантанового ряда идентифицировали с помощью секвенирования гена M2 вируса гриппа А/Калифорния/04/2009пндм (H1N1), которым заражали животных. Суммарную РНК выделяли с помощью набора для экстракции нуклеиновых кислот RIBO-prep (AmpliSens, CRIE, Россия). Обратную транскрипцию РНК проводили с использованием набора реагентов REVERTA-L (AmpliSens, CRIE) и праймера 5agcaaaagcagg. Вирусную кДНК амплифицировали с использованием следующих праймеров: M 1F agcaaaagcaggtagatgtt; M 1027R agtagaacaaggtagttt, на Tercyc Thermocycler («ДНК-Технология», Россия). Реакции секвенирования перекрывающихся продуктов ПЦР проводили с использованием тех же праймеров, что и для амплификации, с помощью набора ABI PRISM Big Dye™ v. 3.1 согласно инструкциям производителя на автоматическом ДНК-анализаторе ABI-3100 PRISM™ (Applied Biosystems, США). Последовательности анализировали с помощью пакета программ Lasergene версия 10.1 (DNASTAR Inc, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение эффективности соединений **4** и **5** в дозе 20 мг/кг/день на модели гриппозной пневмонии мышей, индуцированной высокой дозой римантадин-резистентного вируса гриппа А/Калифорния/04/2009

Предварительные эксперименты показали, что введение интактным мышам изучаемых соединений в дозах до 60 мг/кг/день по схемам, используемым в дальнейшем, не привело к потере веса и гибели ни одного животного. Для изучения эффективности соединений **4**, **5** в сравнении с **РМТ** в качестве оптимальной дозы мы выбрали 20 мг/кг [3]. Гибель животных контрольной группы, зараженных вирусом гриппа и не получавших лечения, наблюдалась начиная с 7 дня и к 9 дню достигала 100%, СПЖ животных данной группы составила 5.1 дня. Снижение массы тела в контрольной группе начиналось со 2 дня после заражения вирусом и достигало максимального значения (18%) к 5 дню. Эффективность лечения соединениями **4** и **5** была одинаковой – они обеспечивали защиту 60% животных на 15-й день наблюдения. Это лечение было более эффективным, чем применение **РМТ** в этой же дозе, который обеспечивал защиту 40% животных. Средняя продолжительность жизни мышей составила 10.1 дня при применении **РМТ** и более 12 дней в случае **4** и **5**. Кроме того, в группах, получавших соединения **4** и **5**, а также **РМТ**, снижение веса было менее значительным, чем в группе вирусного контроля (рис. 2 и 3, табл. 2).

Определение эффективности соединений **4** и **5** в дозах 15 и 20 мг/кг/день на модели гриппозной пневмонии мышей, индуцированной низкой дозой римантадин-резистентного вируса гриппа А/Калифорния/04/2009

В последующих экспериментах для выявления разницы в активности соединений **4** и **5** дозу вируса уменьшили, а также выбрали две дозы: 20 и 15 мг/кг/день.

В контрольной группе гибель зараженных вирусом гриппа мышей, не получавших лечения, к 16 дню наблюдения достигла 90%, а СПЖ в этой группе составила 10 дней (рис. 4, табл. 3). Эффективность обоих соединений напрямую зависела от их дозы. Пероральное применение соединения **4** в дозе 15 мг/кг/день не влияло статистически значимо на выживаемость: смертность в этих группах составила 50% (рис. 4, табл. 3). Увеличение дозы до 20 мг/кг/день приводило к значимому снижению смертности до 20%. Более эффективным было соединение **5**: при лечении этим соединением в дозе 15 мг/кг/день смертность составляла 30%, а доза

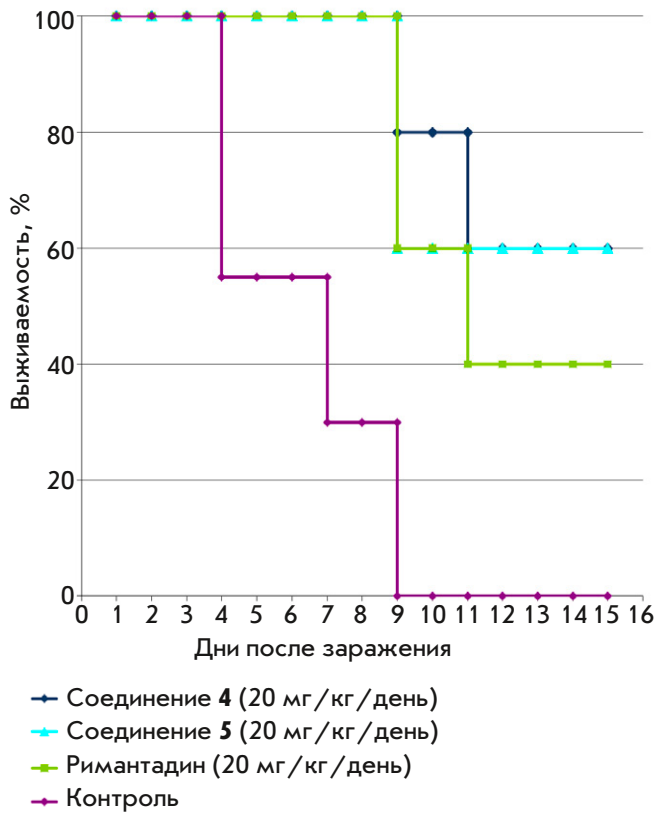


Рис. 2. Выживаемость мышей при лечении соединениями 4, 5 на модели гриппозной пневмонии, индуцированной высокой дозой вируса

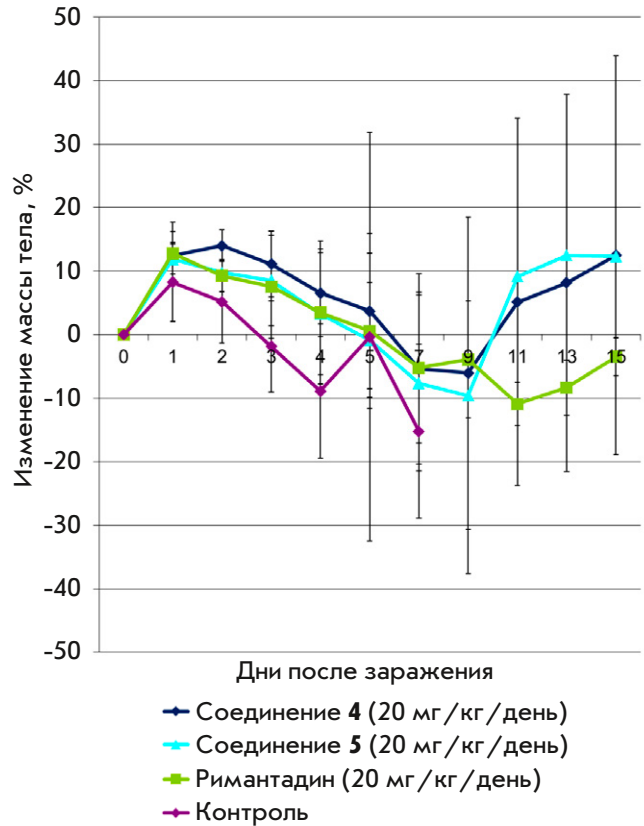


Рис. 3. Изменение массы тела мышей при лечении соединениями 4, 5 на модели гриппозной пневмонии, индуцированной высокой дозой вируса

20 мг/кг/день полностью защищала животных от гибели.

В контрольной группе мышей снижение массы тела наблюдалось начиная с 3 дня после заражения вирусом, достигая к 11 дню в среднем по группе 11%. Данные по выживаемости подтверждены важнейшим критерием тяжести заболевания – потерей веса. В группах, получавших соединение 5 в обеих дозах и соединение 4 в дозе 20 мг/кг/день, не отмечено снижения массы тела мышей (рис. 5). При лечении препаратом сравнения РМТ в дозе 20 мг/кг/день смертность (30%) и потеря веса были выше, чем при лечении соединениями 4 и 5 в такой же дозе, что коррелировало с выживаемостью.

Во второй серии опытов мы наблюдали большую выживаемость животных при использовании всех препаратов в аналогичных дозах по сравнению с первой серией опытов. Это связано с уменьшением дозы вируса, так как эффективность противовирусного препарата обратно пропорциональна дозе заражения, а также с тем, что группы для первичного скрининга соединений в первом эксперименте содержали меньше животных. Кроме того, во второй серии экспериментов наблюдали увеличение эффективности

Таблица 2. Эффективность 4, 5 и РМТ (перорально) на модели гриппозной пневмонии у мышей, инфицированных высокой дозой вируса гриппа А/Калифорния/04/2009

Доза, мг/кг	Выживаемость		Защита от смертности, %	СПЖ, дни
	выжившие/общее количество	Смертность, %		
Соединение 4				
20	3/5 ^a	40	60	12.6
Соединение 5				
20	3/5 ^b	40	60	12.2
РМТ				
20	2/5 ^b	60	40	10.1
Вирусный контроль				
	0/10	100		5.1

^a – ($p = 0.003198$); ^b – ($p = 0.003198$);

^a – ($p = 0.031863$).

соединений при увеличении их дозы. Полученные данные свидетельствуют о вирусспецифическом эффекте изучаемых препаратов.

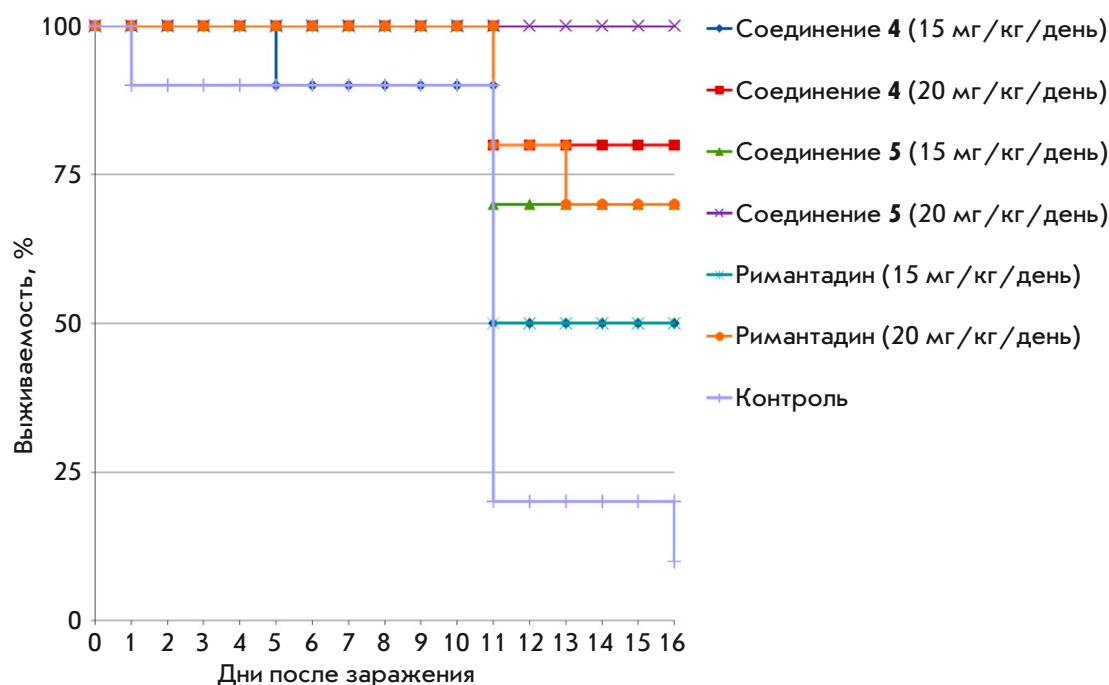


Рис. 4. Выживаемость мышей в модели гриппозной пневмонии, индуцированной низкой дозой вируса

Таблица 3. Эффективность соединений адамантанового ряда на модели гриппозной пневмонии у мышей, инфицированных низкой дозой римантадин-резистентного вируса гриппа А/Калифорния/04/2009

Доза, мг/кг/день	Выживаемость		Защита от смертности, %	СПЖ, дни	Титр вируса, lg ТЦИД ₅₀
	выжившие/общее количество	смертность, %			
Соединение 4					
15	5/10 ^a	50	40	12.4	4.5±0.5
20	8/10 ^b	20	70	14	1.16±1.6
Соединение 5					
15	7/10 ^b	30	60	13.5	2.5±2.3
20	10/10 ^c	0	100	>16	2.6±2.3
РМТ					
20	7/10 ^a	30	60	13.7	1.3±0.3
Вирусный контроль					
-	1/9	90	-	10	6.1±0.3

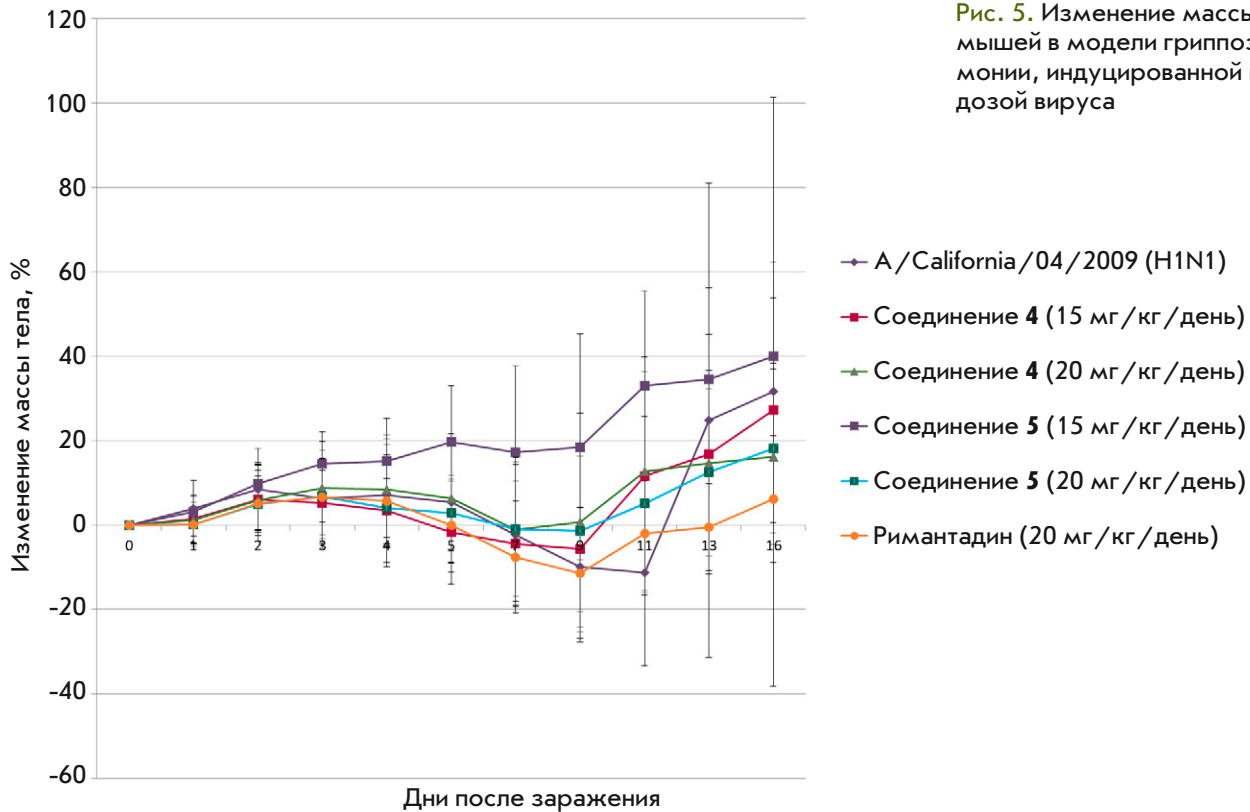
^a – (p = 0.075134); ^b – (p = 0.001106); ^c – (p = 0.007137); ^r – (p = 0.000000168); ^s – (p = 0.007137).

Влияние РМТ и соединений 4, 5 на титр вируса в легких мышей, инфицированных римантадин-резистентным вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009

Данные об увеличении выживаемости подтверждены вирусологическим методом. Титр вируса отражает размножение вируса в легких – высокое значение титра вируса соответствует более тяжелым патологическим изменениям в легких. Наибольшим титр вируса (6.1 ± 0.3 lg ТЦИД₅₀) был в легких мышей контрольной группы, не получавшей лечения. Наименьшее подавление титра вируса в легких наблюдалось при лечении соединением 4 в дозе

15 мг/кг/день (4.5 ± 0.5 lg ТЦИД₅₀). Увеличение дозы соединения 4 до 20 мг/кг/день, а также лечение соединением 5 в обеих дозах значительно ингибировало размножение вируса, снижая титр вируса на 2.4–4.9 lg ТЦИД₅₀, что соответствует клиническим параметрам эффективности лечения этими соединениями. Важно отметить значительное подавление размножения вируса в легких при применении РМТ. Несмотря на то что в обеих сериях экспериментов смертность при лечении РМТ в дозе 20 мг/кг/день была выше, чем в случае соединений 4 и 5 в этой же дозе, она была статистически значимо ниже, чем в группе инфицированных нелеченных животных.

Рис. 5. Изменение массы тела мышей в модели гриппозной пневмонии, индуцированной низкой дозой вируса



Ранее мы показали отсутствие активности **РМТ** в культуре клеток в отношении римантадин-резистентного вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1). Поэтому данные об обнаружении активности **РМТ**, хотя и сниженной, в опытах на животных были несколько неожиданными для нас. Однако данные, полученные *in vivo*, более адекватно характеризуют противовирусную активность, поскольку учитывают особенности биологической доступности, токсичности, фармакокинетики соединений непосредственно в организме. Часто концентрации препаратов в плазме крови могут значительно превышать концентрации, необходимые для подавления противовирусной активности в опытах *in vitro*. Это может объяснять сниженную, но тем не менее выраженную эффективность препаратов в отношении резистентных к ним вирусов. Это подтверждается данными, полученными при изучении эффективности озельтамивира у хорьков [20]. В этих исследованиях озельтамивир был эффективным не только в отношении чувствительного к озельтамивиру вируса гриппа H1N1, но и озельтамивир-резистентного вируса с мутацией H274Y, хотя и в меньшей степени. Эти данные совпадают также с результатами клинических исследований, в которых показана эффективность озельтамивира во время эпидемического сезона 2008–2009 при циркуляции озельта-

мивир-резистентного штамма H1N1 (H274Y). Однако эта эффективность была ниже эффективности родственного ингибитора нейраминидазы занамивира, к которому чувствителен этот штамм [21]. Кроме того, показана эффективность **РМТ** при сезонном гриппе с циркуляцией римантадин-резистентного вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1), однако эффективность такого лечения была ниже, чем при применении озельтамивира [22].

Секвенирование адаптированного к мышам римантадин-резистентного вируса гриппа А/Калифорния/04/2009

Известно, что мутация S31N в белке M2 вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1) считается молекулярно-генетическим маркером резистентности к препаратам адамантанового ряда. Хотя нами показано, что применение аналогов **РМТ** более эффективно, чем **РМТ** в соответствующих дозах, тем не менее **РМТ** также эффективно снижал смертность, потерю веса и размножение вируса в легких животных на модели гриппозной пневмонии, индуцированной вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1), резистентным к **РМТ**. Исходный вирус гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1) не вызывает гибель животных, поэтому был использован вирус, адаптированный к мышам путем пассирования в лег-

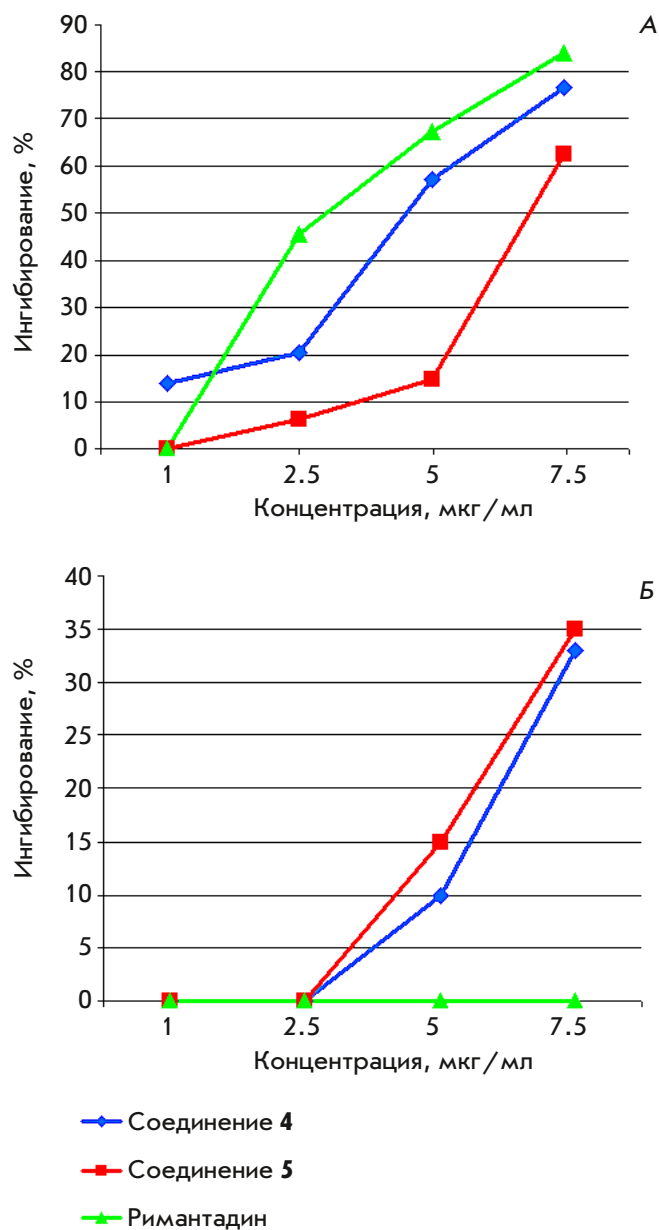


Рис. 6. Противовирусная активность соединений 4, 5 и РМТ в культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) (А) и вирусов гриппа А/Калифорния/04/09 (H1N1), полученных из легких леченных животных (Б)

ких. Полученные данные об эффективности РМТ позволили предположить, что мутация, ответственная за резистентность к РМТ, могла быть утрачена в процессе адаптации. С целью проверки этого предположения проведено секвенирование гена 7 (кодирует белок М2), адаптированного к мышам вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1). Показало, что белок М2 использованного нами адаптированного к мышам вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1) со-

держит мутацию S31N, ответственную за резистентность к препаратам адамантанового ряда.

Изучение возможности возникновения резистентности к соединениям 4 и 5 на фоне их приема

Известно, что появление устойчивых к препаратам адамантанового ряда штаммов в культуре клеток и в организме животных происходит через 2–3 пассажа, в человеческой популяции такие штаммы могут появляться уже через 2–4 дня после начала лечения [4–6]. В следующей серии экспериментов изучена возможность возникновения резистентности к соединениям 4 и 5 на фоне их приема. Мы выделили вирусы из легких мышей на 4 день приема как обоих соединений, так и РМТ, и изучили их чувствительность к этим соединениям в культуре клеток. В качестве сравнения использовался вирус гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2), чувствительный к РМТ (рис. 6). Видно, что как соединения 4, 5, так и РМТ обладали активностью в отношении данного вируса. В то же время вирусы, выделенные из легких мышей, зараженных римантадин-резистентным вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1), получавших 4 и 5, оставались чувствительными к этим соединениям, что говорит об отсутствии развития резистентности после их неоднократного применения. При этом вирус, выделенный из легких животных, леченных РМТ, оставался резистентным к нему. Таким образом, нами не обнаружено возникновения резистентности к соединениям 4 и 5 на фоне их приема, в отличие от РМТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На модели гриппозной пневмонии мышей изучена противовирусная активность (R)-изомеров 6-(1-адамантил)-1,3-оксазинан-2-она (4) и 6-(1-адамантил)-пиперидин-2,4-диона (5), синтезированных в препаративных количествах согласно разработанному ранее методу. Изучение эффективности обоих соединений в дозах 15 и 20 мг/кг/день значительно снижало смертность животных, потерю веса, размножение вируса в легких и увеличивало продолжительность жизни. В проведенных экспериментах соединения 4 и 5 были более эффективными, чем римантадин, применяемый в тех же дозах и по такой же схеме. Пероральное лечение данными соединениями в течение 5 дней не приводило к возникновению резистентности. Эти соединения высокоселективно подавляют репродукцию вируса гриппа А, в том числе штаммов, резистентных к римантадину. Схема синтеза этих производных адамантана проста и содержит синтетически и экономически доступные соединения, а направленная модификация структуры

адамантильного (гидроксिलирование) и гетероциклического (замещение в положении 4 соединений **4** и **5**) фрагментов этих соединений должна способствовать дальнейшему усилению противовирусной активности. Учитывая сказанное, можно считать, что эти соединения перспективны для разработки нового средства против вируса гриппа А. ●

Н.Ю.К. благодарит за поддержку данного исследования Министерство науки и высшего образования Российской Федерации. Авторы благодарят Г.Д. Коломникову (ИНЭОС РАН) за ценную помощь в организации исследовательской работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Webster R.G., Monto A.S., Braciale T.J., Lamb R.A. Textbook of Influenza, 2nd Ed. New York: Wiley, 2013. 520 p.
2. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
3. Zlydnikov D.M., Kubar O.I., Kovaleva T.P., Kamforin L.E. // Infect. Dis. 1981. V. 3. № 3. P. 408–421.
4. Belshe R.B., Burk B., Newman F., Cerruti R.L., Sim I.S. // Infect. Dis. 1989. V. 159. № 3. P. 430–435.
5. Bright R.A., Shay D., Bresee J., Klimov A., Cox N., Ortiz J. // MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2006. V. 55. № 2. P. 44–46.
6. Hayden F.G., Hay A.J. // Genetic diversity of RNA viruses. Berlin, Heidelberg: Springer, 1992. V. 176. P. 119–130.
7. Belshe R.B., Smith M.H., Hall C.B., Betts R., Hay A.J. // Virol. 1988. V. 62. № 5. P. 1508–1512.
8. Dong G., Peng C., Luo J., Wang C., Han L., Wu B., Ji G., He H. // PLoS One. 2015. V. 10. № 3. e0119115.
9. Yen H.-L. // Antimicrobial Drug Resistance. Springer, Cham. 2017. V. 1. P. 491–501.
10. Shaw M.L. // ACS Infectious Diseases. 2017. V. 3. № 10. P. 691–694.
11. Koszalka P., Tilmanis D., Hurt A.C. // Influenza Other Respiratory Viruses. 2017. V. 11. № 3. P. 240–246.
12. Amarelle L., Lecuona E., Sznajder J.I. // Arch. Bronconeumol. 2017. V. 53. № 1. P. 19–26.
13. Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S., Hay A.J. // Antiviral Res. 2009. V. 81. № 2. P. 132–140.
14. Liu M.-Y., Wang S., Yao W.-F., Wu H.-Z., Meng S.-N., Wei M.-J. // Clin. Ther. 2009. V. 31. № 4. P. 784–792.
15. Ma C., Zhang J., Wang J. // Mol. Pharmacol. 2016. V. 90. № 3. P. 188–198.
16. Musharrafieh R., Ma C., Wang J. // Antiviral Res. 2018. V. 153. P. 10–22.
17. Musharrafieh R., Lagarias P.I., Ma C., Tan G.S., Kolocouris A., Wang J. // Mol. Pharmacol. 2019. V. 96. № 2. P. 148–157.
18. Kuznetsov N.Yu., Tikhov R.M., Godovikov I.A., Medvedev M.G., Lyssenko K.A., Burtseva E.I., Kirillova E.S., Bubnov Yu.N. // Org. Biomol. Chem. 2017. V. 15. № 15. P. 3152–3157.
19. Миронов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журавлева М.В., Лепахин В.К., Коробов Н.В., Меркулов В.А., Орехов С.Н., Сакаев И.В. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
20. Oh Ding // 5th isirv-AVG Conference Prevention and Treatment of RVI: Antivirals, Traditional Therapies and Host-Directed Interventions. 2017. Shanghai, China.
21. Жданов К.В., Захаренко С.М., Львов Н.И., Мальцев О.В. // Военно-медицинский журн. 2016. Т. 337. № 2. С. 3.
22. Kawai N., Ikematsu H., Hirotsu N., Maeda T., Kawashima T., Tanaka O., Yamauchi S., Kawamura K., Matsuura S., Nishimura M., et al. // Clin. Infect. Dis. 2009. V. 49. № 12. P. 1828–1835.