

На правах рукописи

Одноров Артем Игоревич

**КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОЙ ПРОТИВОГРИППОЗНОЙ
СУБСТАНЦИИ ПРЯМОГО ДЕЙСТВИЯ**

14.04.02 — фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов» на кафедре фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института и в лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» МЗ РФ.

Научный руководитель:

Доктор химических наук, профессор

Плетенева Татьяна Вадимовна

Научный консультант:

Доктор биологических наук
чл.-корр. РАН, профессор

Гребенникова Татьяна Владимировна

Официальные оппоненты:

Джавахан Марина Аркадьевна – доктор фармацевтических наук, доцент, ведущий научный сотрудник экспериментально-технологического отдела Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений».

Сяткин Сергей Павлович – доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биохимии имени академика Т.Т. Березова Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова".

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2021 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.001 на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» по фармацевтическим наукам по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6 и на сайте <http://dissovet.rudn.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 20__ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета
кандидат химических наук,
доцент

Морозова Мария Андреевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) респираторные инфекции являются одними из лидеров по заболеваемости и смертности по всему миру (URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>). Наиболее тяжелые случаи заболеваний чаще всего вызваны вирусом гриппа. В данный момент существует множество способов специфической профилактики и терапии инфекции гриппа, однако их эффективность далека от идеала.

Вирус гриппа – РНК-содержащий вирус, который является причиной эпидемий и пандемий. Специфическая профилактика гриппа включает вакцинирование. Однако антигенная изменчивость вируса способствует снижению эффективности вакцины, что требует постоянной затратной разработки её более совершенных модификаций. Специфическая терапия инфекции гриппа включает применение нескольких классов лекарственных препаратов, одобренных ВОЗ. Это ингибиторы нейраминидазы (осельтамивир, занамивир) и ингибиторы М2-белка (амантадин, римантадин).

В настоящее время для лечения инфекции вируса гриппа чаще назначаются препараты класса ингибиторов нейраминидазы (NA) (Heneghan C.J. et al., 2016). Однако имеется информация о появлении штаммов вируса гриппа А, устойчивых к препаратам этой группы (Lee N. et al., 2018). Кроме того, данные препараты вызывают серьезные побочные эффекты: нарушения в работе желудочно-кишечного тракта, психоневрологические расстройства (галлюцинации, неврозы, нарушения сознания). В связи с этим их целесообразно применять в тяжелых случаях заболевания, когда существует угроза жизни и здоровью.

Экономическая доступность и простота химического синтеза производных адамантана способствовали их широкому применению для борьбы с сезонными эпидемиями гриппа во всём мире. Однако это привело к возникновению мутаций в гене М2-белка вируса гриппа и практически полной потере противовирусной активности амантадина и римантадина. В связи с этим ведется активный поиск новых ингибиторов М2-канала вируса гриппа – преимущественно производных

адамантана (Hu Y. et al., 2017). Среди них – дейтерированные и энантиоселективные субстанции (Wright A. K. et al., 2016).

В результате поиска противогриппозных препаратов адамантанового ряда был синтезирован N-гистидил-(1-адамантил)этанамин (рис. 1) в виде дигидрохлорида моногидрата (H-His-Rim•2HCl•H₂O).

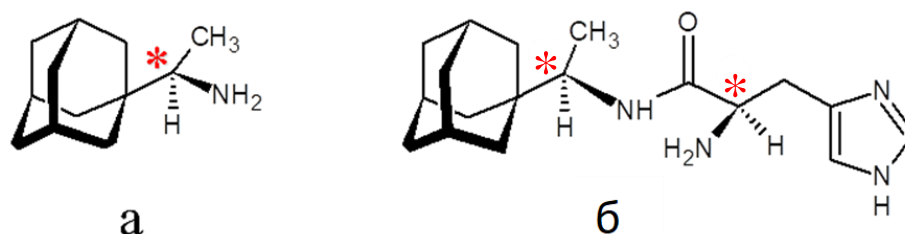


Рисунок 1. Структурные формулы 1-(1-адамантил)этанамин – римантадина (а) и его производного – N-гистидил-(1-адамантил)этанамин (б). Указаны центры хиральности (*).

Доклинические исследования *in vitro* (Шибнев В.А., 2012) и *in vivo* (Щелканов М.Ю., 2014) продемонстрировали выраженную активность новой субстанции в отношении устойчивых к амантадину и римантадину штаммов вируса гриппа А. Для проведения дальнейших исследований, в том числе клинических испытаний, представляется необходимым изучить физические, физико-химические свойства, биологическую активность и разработать методики контроля качества, обеспечивающие стандартизацию субстанции H-His-Rim•2HCl•H₂O.

Цель работы: разработать комплексный подход к оценке свойств новой перспективной противовирусной субстанции методами фармацевтического и биофармацевтического анализа.

Задачи исследования:

1. Разработать комплекс физических, физико-химических, биологических методик контроля качества H-His-Rim•2HCl•H₂O в подготовке нормативной документации для стандартизации новой субстанции.

2. На основе компьютерного моделирования разработать методику определения механизма противовирусного действия H-His-Rim•2HCl•H₂O.

3. Выявить корреляции «структура – биологическая активность» АФИ противогриппозных препаратов и определить позицию новой фармацевтической субстанции Н-Нis-Rim•2HCl•H₂O в этой группе лекарств.

4. Провести сравнительную оценку противовирусной активности Н-Нis-Rim•2HCl•H₂O и других субстанций с иными механизмами противовирусного действия – умифеновира гидрохлорида и L-аскорбиновой кислоты (АК).

Научная новизна работы. Впервые получены данные о механизме противовирусного действия Н-Нis-Rim•2HCl•H₂O. Впервые детально охарактеризованы физические и физико-химические свойства новой противовирусной субстанции, необходимые для её стандартизации. Впервые методом количественной корреляции «структура-активность/свойство» (QSAR) охарактеризована позиция Н-Нis-Rim•2HCl•H₂O среди других противогриппозных лекарственных средств. Впервые проведен сравнительный анализ противовирусной активности Н-Нis-Rim•2HCl•H₂O и других субстанций с иными механизмами противовирусного действия (умифеновира гидрохлорид, АК).

Теоретическая и практическая значимость работы. Внесен вклад в библиотеку данных математического моделирования (молекулярный докинг) возможных механизмов противовирусного действия Н-Нis-Rim•2HCl•H₂O. Результаты QSAR-расчетов могут быть использованы для прогнозирования свойств новых соединений-кандидатов исследуемого класса. Предложенная совокупность методик идентификации, оценки чистоты и количественного анализа Н-Нis-Rim•2HCl•H₂O будет использована для стандартизации новой субстанции и разработки пакета нормативной документации.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты физических и физико-химических исследований (ЯМР-, масс-, ИК-, УФ-спектроскопии, растворимость, элементный анализ, поляриметрия, гранулометрический анализ) субстанции Н-Нis-Rim•2HCl•H₂O, необходимые для ее стандартизации.

2. Возможный механизм действия субстанции Н-His-Rim•2HCl•H₂O с применением методов компьютерного моделирования.

3. Результаты QSAR-исследования Н-His-Rim•2HCl•H₂O и АФИ противовирусных препаратов.

4. Результаты сравнительной оценки противовирусной активности Н-His-Rim•2HCl•H₂O и других субстанций с иными механизмами противовирусного действия (умифеновира гидрохлорид, АК).

Степень достоверности полученных результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается использованием современного высокотехнологичного оборудования для осуществления физического и физико-химического анализа исследуемых субстанций, а также оригинального программного обеспечения (ПО) исследований молекулярного докинга и метода QSAR. Все результаты обработаны с использованием ПО соответствующего оборудования, методами статистического анализа с помощью пакета программ «Origin» (OriginLab Corporation, США).

Апробация результатов диссертационной работы. Основные результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на конференциях: XI Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (Москва, 1–3 апреля 2019 г.); IX и X Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2019 и 2020 г.); научных семинарах кафедры фармацевтической и токсикологической химии РУДН совместно с лабораторией молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» МЗ РФ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ: в журналах, индексируемых в Scopus, – 5, перечень РУДН – 2, а также тезисы конференций - 3.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 14.04.02 Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки), п. 1 и 3:

1 – Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ.

3 – Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в экспериментальных исследованиях, обработке и анализе результатов, подготовке публикаций в соавторстве с научными коллективами кафедры фармацевтической и токсикологической химии (КФиТХ) РУДН и лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» МЗ РФ.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 102 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, выводы, библиографический список (124 источника). Основная часть диссертации включает 12 таблиц и 27 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Основной объект исследования – субстанция N-гистидил-(1-адамантил)этанамин дигидрохлорида моногидрат ($\text{H-His-Rim} \cdot 2\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ или в виде безводного основания H-His-Rim), которая была синтезирована в лаборатории антигенных детерминант вирусов и синтеза пептидов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» МЗ РФ методом классического пептидного синтеза.

Другие субстанции: римантадина гидрохлорид (Zhejiang Kangyu Pharmaceutical Co, Китай), умифеновира гидрохлорид (Sigma-Aldrich, США) и L-аскорбиновая кислота (Sigma-Aldrich, США).

Стандартизацию субстанции проводили с использованием современных физико-химических методов контроля качества: ^1H и ^{13}C спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), масс-спектрометрия (МС), инфракрасная спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения (ИК-НПВО), ультрафиолетовая (УФ) спектрометрия, автоматический элементный анализ (CHNS (O) – анализ), хроматография в тонком слое сорбента (ТСХ), метод поляриметрии, метод лазерной дифракции (LALLS), оптическая микроскопия, потенциометрическое определение pH растворов.

Для построения структурных формул и расчета топологических индексов Винера (W) и Балабана (J) в анализе корреляций между структурными особенностями субстанций противогриппозных препаратов и их свойствами использовали пакеты разработанных и зарегистрированных программ «ChemicPen» и «ChemicDescript» (кафедра фармацевтической и токсикологической химии РУДН). Значения липофильности как логарифма коэффициента распределения в системе октанол/вода (LogP), значения LD₅₀ (крысы *per os*) и эффективной концентрации субстанции EC₅₀ клеток MDCK (клетки почки собаки Майдин-Дэрби) использовали из баз данных «PubChem» (National Center for Biotechnological Information, США) и «DrugBank» (Canadian Institutes of Health Research, Канада).

Исследование *in silico* механизма противовирусного действия Н-His-Rim•2HCl•H₂O заключалось в измерении энергии связывания субстанции с М2-белком вируса гриппа А методом зонтичной выборки (*umbrella sampling*). Квантово-механическая модель лиганда была сгенерирована в программном продукте HyperChem 8.0.8 корпорации Hypercube (www.hyper.com), модель трансмембранной области белка М2 была взята из открытой базы данных Protein Data Bank. Молекулярный докинг проведён с помощью программного обеспечения GROMACS 4.6.

Противовирусную активность субстанции *in vitro* на клеточной культуре MDCK определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) в отношении полученных методом обратной генетики рекомбинантного вируса гриппа штамма

A/PuertoRico/8/34(H1N1) и его мутантов с точечными аминокислотными заменами в М2-канале. Гемагглютинирующий титр вируса и мутантов – 1024 гемагглютинирующих единицы (ГАЕ). Для оценки противовирусной активности исследуемых АФИ использовали клеточные культуры Vero-E6 (клетки эпителия почки африканской зеленой мартышки) и MDCK, инфицированных штаммами вируса гриппа A/duck/Novosibirsk/56/06 (H5N1) и A/PuertoRico/8/34(H1N1) соответственно. Долю ингибирования определяли как отношение $[OP - OP_{\text{кк}} / OP_{\text{вк}} - OP_{\text{кк}}]$, где ОП – экспериментальная оптическая плотность, $OP_{\text{вк}}$ – оптическая плотность вирусного контроля, $OP_{\text{кк}}$ – оптическая плотность клеточного контроля, измеренные при $\lambda = 450$ нм.

Анализ биологической активности субстанции проводили методом *Spirotox* на тест-культуре *Spirostomum ambiguum*. Оборудование: 5-луночная термостатируемая ячейка, термостат Alpha A6 (Lauda, Германия), бинокляр МБС-10, лампа (~ 10 Вт) дневного света.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Разработка и применение методики определения механизма противовирусного действия Н-His-Rim•2HCl•H₂O

1.1. Молекулярный докинг. Методами компьютерного моделирования взаимодействия лиганда с белком-мишенью (М2-белок) в условиях аминокислотных замен была исследована способность субстанции ингибировать репликацию мутантных вирусов в сравнении с нативным вирусом гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1). Оказалось, что из всех проанализированных замен именно мутация Ala30Thr (замена аланина на треонин в 30 положении) приводит к выраженному снижению противовирусной активности лиганда. Об этом свидетельствует резкое снижение суммарного значения свободной энергии Гиббса (рис. 2). В то же время у вируса с мутацией Val27Ala (замена валина на аланин в 27 положении) степень связывания с Н-His-Rim в целом идентична таковой для нативного вируса, что подтверждают близкие значения суммарной энергии Гиббса (табл. 1).

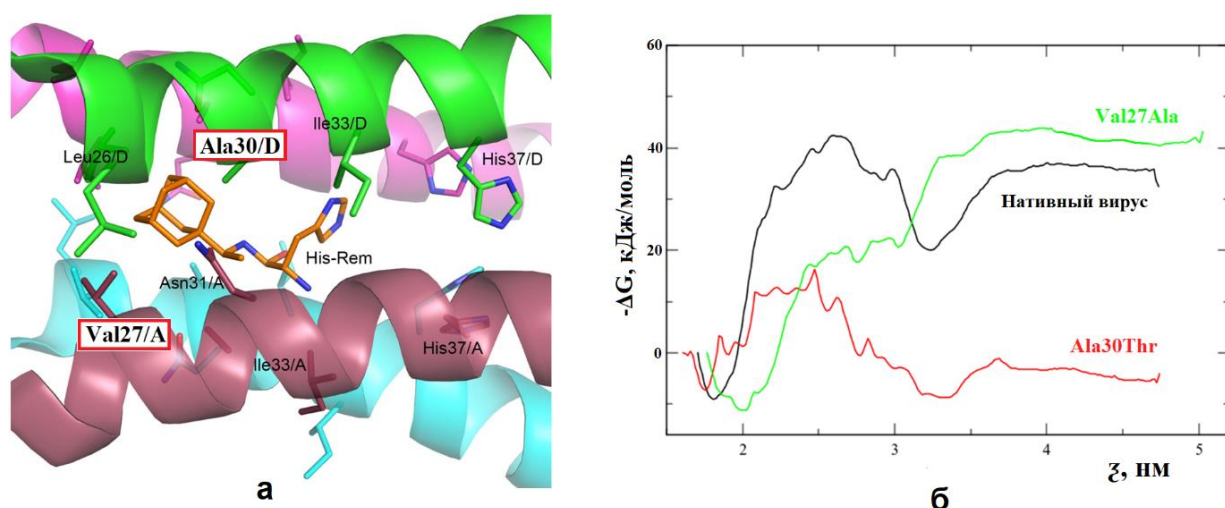


Рисунок 2. Локализация лиганда Н-His-Rim в канале М2 вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1) (выделены боковые группы и аминокислотные остатки, находящиеся на расстоянии менее 0,5 нм от атомов лиганда) – **а**, профили свободной энергии связывания Н-His-Rim с М2-белком штамма вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1) и его мутантов в зависимости от реакционной координаты z (расстояние в нм между центрами масс белка и лиганда) – **б**.

Таблица 1. Термодинамическая оценка взаимодействия субстанции с М2-каналом вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1) и его мутантов.

$R_i + L \rightarrow R_i \cdot L$	$\Sigma \Delta G_{Ri}$, усл. ед.	$\Delta G_{Ri} / \Delta G_{R1}$
R_1 (нативный вирус) + L \rightarrow $R_1 \cdot L$	1,41	1
R_2 (Val27Ala) + L \rightarrow $R_2 \cdot L$	1,28	0,91
R_3 (Ala30Thr) + L \rightarrow $R_3 \cdot L$	0,53	0,38

Использование метода компьютерного моделирования позволило, основываясь на сравнении профилей свободной энергии лиганд-рецепторного взаимодействия, однозначно определить один из центров связывания Н-His-Rim. Этим центром является аланин в 30 положении М2-белка вируса гриппа А.

1.2. Определение противовирусной активности *in vitro*. Методами обратной генетики были созданы мутанты вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1), содержащие аминокислотные замены Ala30Thr,

Val27Ala, а также двойную замену валина на аланин в 27 положении и изолейцина на валин в 28 положении (Val27Ala + Ile28Val).

Вирус гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1) был чувствителен к действию H-His-Rim. Соединение успешно подавляло репликацию данного штамма при концентрации 10,0 мкг/мл (24,6 мкмоль/л), степень ингибирования при разведении вируса 10^{-5} составила около 75% (табл. 2).

Таблица 2. Подавление репродукции нативного штамма вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1) и штаммов, содержащих точечные замены в трансмембранном домене канала M2 субстанцией H-His-Rim.

Вирус	Подавление репродукции вируса, % ($\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$, n= 6, P=0,90)
A/PuertoRico/8/34(H1N1) (нативный)	74,31 ± 9,10
Мутант Val27Ala + Ile28Val	53,64 ± 5,96
Мутант Val27Ala	44,66 ± 7,40
Мутант Ala30Thr	31,70 ± 5,16

Наименьшее подавление репродукции характерно для мутанта Ala30Thr, что согласуется с результатами молекулярного докинга. Мутанты вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1) Val27Ala и Val27Ala + Ile28Val были более чувствительны к действию новой субстанции. Снижение противовирусной активности H-His-Rim в отношении мутантов свидетельствует о том, что внесенные аминокислотные замены привели к нарушению связывания субстанции с M2-каналом. Полученные результаты являются доказательством того, что центры аминокислотных замен являются частью сайта связывания H-His-Rim.

Таким образом, использование методов компьютерного моделирования и обратной генетики позволило продемонстрировать молекулярные механизмы лиганд-рецепторного взаимодействия субстанции с M2-белком вируса гриппа. Разработанная методика может послужить основой для исследования противовирусного действия новых субстанций.

2. Стандартизация новой субстанции по показателям качества

2.1. Описание

Внешний вид. Субстанция Н-Нис-Рим•2НСl•Н₂О представляет собой белый с желтоватым оттенком аморфный порошок без запаха.

Размер и форма частиц. Форма и размер частиц, а также состояние их поверхности оказывают значительное влияние на технологию разработки и производства лекарственных препаратов надлежащего качества, в том числе и на параметры высвобождения АФИ из лекарственной формы. Для определения размера и формы частиц субстанции были использованы методы оптической микроскопии и лазерной дифракции света (рис. 3).

Гранулометрический анализ образца субстанции Н-Нис-Рим•2НСl•Н₂О методом оптической микроскопии показал преобладание частицы размером 20-40 мкм (47%) и 40-60 мкм (27%). Частицы имеют неправильную форму, шероховатую поверхность. Присутствие большого числа мелких частиц свидетельствует о низкой прочности крупных конгломератов.

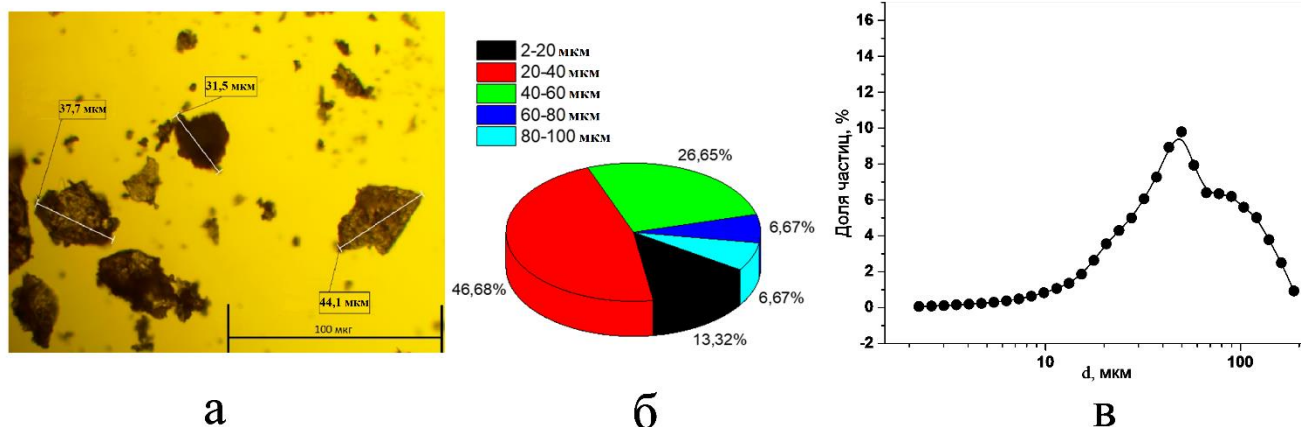


Рисунок 3. Визуализация размера и формы частиц субстанции – **а** и гранулометрический состав – **б** (метод оптической микроскопии) в сравнении с распределением частиц субстанции по размеру – **в** (метод лазерной дифракции света в среде н-гексана).

Распределение частиц по размеру методом лазерной дифракции в н-гексане, где субстанция практически нерастворима представлено широкой полосой распределения частиц в интервале от 10 до 120 мкм с максимумом размерной группы $d=50$ мкм, что коррелирует с результатами оптической микроскопии.

Неоднородный состав твердой фазы предполагает необходимость гомогенизации субстанции при использовании ее в технологическом процессе получения лекарственной формы.

Растворимость. Растворимость фармацевтической субстанции является важной характеристикой, определяющей чистоту, скорость высвобождения из готовой лекарственной формы и абсорбцию в кровотоки. Оценку растворимости Н-His-Rim•2HCl•H₂O проводили в воде деионизированной высокоомной, спирте этиловом 96%, н-гексане и N, N-диметилформамиде в соответствии с ОФС «Растворимость» ГФ РФ XIV.

Используя условные фармакопейные термины растворимости, следует заключить, что субстанция Н-His-Rim•2HCl•H₂O *мало растворима* в воде (1:200), *растворима* в спирте этиловом 96% (1:20), *легко растворима* в N, N-диметилформамиде (1:10) и *практически нерастворима* в н-гексане (>1:1000).

Потенциометрия. Измерение pH проводили при 25°C для 1% водного раствора Н-His-Rim•2HCl•H₂O: pH = 3,15±0,09 (n=3). Полученный результат подтверждает, что соединение представляет собой солевую форму сильной кислоты и гидролизует в водном растворе.

2.2. Спектральные характеристики субстанции для показателя «подлинность»

ЯМР-спектроскопия. Образец субстанции растворяли в тяжелой воде (D₂O). Спектры ¹H и ¹³C ЯМР растворов Н-His-Rim•2HCl•H₂O записывали на частотах 300.3 и 75.49 МГц соответственно с внутренней стабилизацией по дейтерию. В качестве внешнего стандарта использовали тетраметилсилан (ТМС).

В качестве примера приведен ¹H ЯМР-спектр (рис. 4), на котором видны характерные для Н-His-Rim•2HCl•H₂O сигналы положения, мультиплетности и химические сдвиги сигналов: 8,81 (с, 1H, NH-CH=NH), 7,52 (с, 1H, NH-CH=C), 4,79 (H₂O(HDO) + NH), 4,31 (т, 1H, CH₂-CH-NH₂, 8 Гц), 3,49 (к, 1H, NH-CH-Adamantyl, 7 Гц), 3,40 (д, 2H, His-CH₂-CH, 8 Гц), 1,90 (с, 3H, Adamantyl β-H), 1,60

(дд, 6H, Adamantyl γ -H, 56 Гц, 11 Гц), 1,22 (дд, 6H, Adamantyl α -H, 41 Гц, 11 Гц), 1,04 (д, 3H, CH_3 -CH-Adamantyl, 7 Гц).

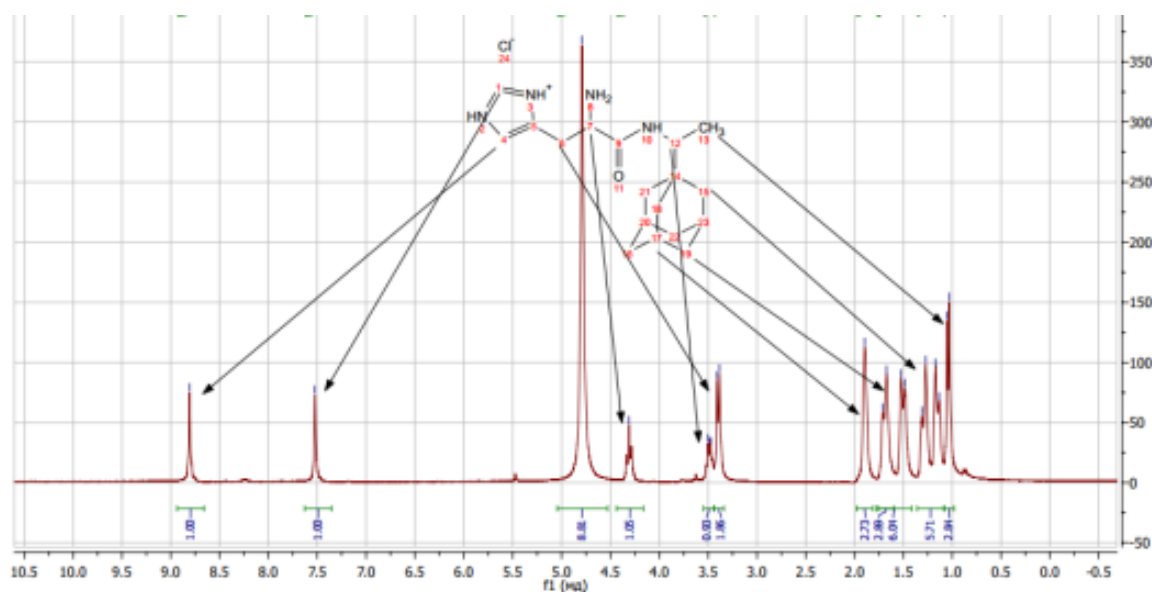


Рисунок 4. ^1H ЯМР-спектр N-His-Rim•2HCl•H₂O.

Полученные ЯМР-спектры могут быть использованы в качестве спектров сравнения при подтверждении структуры и идентификации субстанции.

Масс-спектрометрия. Для подтверждения подлинности субстанции использовали метод масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МС-МАЛДИ). Измерения проводили в режиме регистрации положительных ионов в диапазоне m/z от 180 до 600.

Для масс-спектра N-His-Rim•2HCl•H₂O характерно присутствие двух выраженных хорошо разрешенных пиков. Принимая во внимание, что относительная молекулярная масса субстанции M_r (N-His-Rim) = 316,44, не вызывает сомнения, что один из пиков соответствует молекулярному протонированному иону $[M_r + \text{H}]^+$ ($m/z = 317,74$), а второй – его аддукту с натрием $[M_r + \text{Na}]^+$ ($m/z = 339,75$).

Таким образом, метод МС-МАЛДИ позволил подтвердить подлинность субстанции N-His-Rim•2HCl•H₂O.

ИК-спектроскопия (НПВО). Для определения подлинности субстанции использовали метод ИК-спектроскопии. Приставка нарушенного полного

внутреннего отражения позволяет анализировать образцы в их исходном состоянии без предварительной пробоподготовки.

ИК-спектр НПВО Н-His-Rim•2HCl•H₂O имеет полосы поглощения, соответствующие колебаниям связей: $\nu_{\text{N-H}} (-\text{NH}_2) - 3303, 3249 \text{ см}^{-1}$, $\nu_{\text{N-H}} (-\text{NH-CO-}) - 3083 \text{ см}^{-1}$, $\nu_{\text{C-H}} (-\text{CH}_3) - 2897 \text{ см}^{-1}$, $\nu_{\text{C-H}} (-\text{CH}_2) - 2848 \text{ см}^{-1}$, $\nu_{\text{N-H}} (-\text{NH}_2^+) - 2766, 2701 \text{ см}^{-1}$, $\nu_{\text{C=O}} - 1662 \text{ см}^{-1}$.

На основе соотнесения полос поглощения с функциональными группами в составе молекулы Н-His-Rim•2HCl•H₂O был сделан вывод о подлинности субстанции.

2.3. Чистота

Элементный (CHNS-O) анализ. Методом автоматического элементного анализа были определены соотношения атомов С, Н, N для субстанции Н-His-Rim•2HCl•H₂O на стадии, предшествующей финальной очистке методом колоночной хроматографии (табл. 3).

Таблица 3. Результаты элементного анализа субстанции Н-His-Rim•2HCl•H₂O.

Элемент	Рассчитанное значение, %	Результат анализа, % ($\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$, n= 6, P=0,90)	Δ , %
С	53,10	53,58 ± 0,31	+ 0,48
Н	7,93	8,30 ± 0,23	+ 0,37
N	13,75	12,86 ± 0,16	- 0,89

Полученные результаты позволяют подтвердить чистоту субстанции Н-His-Rim•2HCl•H₂O. Незначительное отличие содержания элементов ($\Delta < 1\%$) от рассчитанного может быть связано с присутствием сопутствующих примесей.

Хроматография в тонком слое сорбента (ТСХ). Для оценки содержания сопутствующих примесей в субстанции, в первую очередь римантадина как основного реагента синтеза, применяли метод ТСХ. Система растворителей н-бутанол – уксусная кислота – вода – пиридин (30:3:12:10) обеспечивала

необходимую подвижность. Субстанцию до и после финальной очистки методом колоночной хроматографии, а также римантадина гидрохлорид растворяли в минимальном количестве спирта этилового 96% (1:20) и хроматографировали восходящим методом. После проявления в парах йода наблюдали коричневые пятна: для субстанции Н-His-Rim•2HCl•H₂O после очистки характерно одно пятно ($R_f = 0,75$), для субстанции Н-His-Rim•2HCl•H₂O до очистки – два пятна ($R_f = 0,75$ и $R_f = 0,1$) и для римантадина гидрохлорида – одно пятно ($R_f = 0,1$).

Таким образом, методом ТСХ удалось определить основную сопутствующую примесь в субстанции Н-His-Rim•2HCl•H₂O – римантадин, удаляемый методом колоночной хроматографии.

Оптическая активность. Молекула Н-His-Rim•2HCl•H₂O имеет два хиральных центра, один из которых находится во фрагменте римантадина, а второй принадлежит остатку аминокислоты – гистидину (см. рис. 1). Измерение оптической активности показало, что водные растворы субстанции – правовращающие. Так удельное оптическое вращение 0,5% водного раствора Н-His-Rim•2HCl•H₂O $[\alpha]_D^{20} = +7,22 \pm 0,06$. При замене растворителя на этанол удельное оптическое вращение раствора имеет противоположный знак: $[\alpha]_D^{20} = -10,32 \pm 0,12$.

Таким образом, поляриметрия растворов субстанции Н-His-Rim•2HCl•H₂O может быть использована для определения энантиомерной чистоты, а также подлинности и, в соответствии с законом Био, количественного анализа.

2.4. Количественный анализ

Ультрафиолетовая спектрометрия. На электронных спектрах были обнаружены полосы поглощения в растворах 96% этанола ($\lambda_{\max} = 216$ нм) и ДМФА ($\lambda_{\max} = 268$ нм) (рис. 5). В водных растворах поглощение отсутствовало.

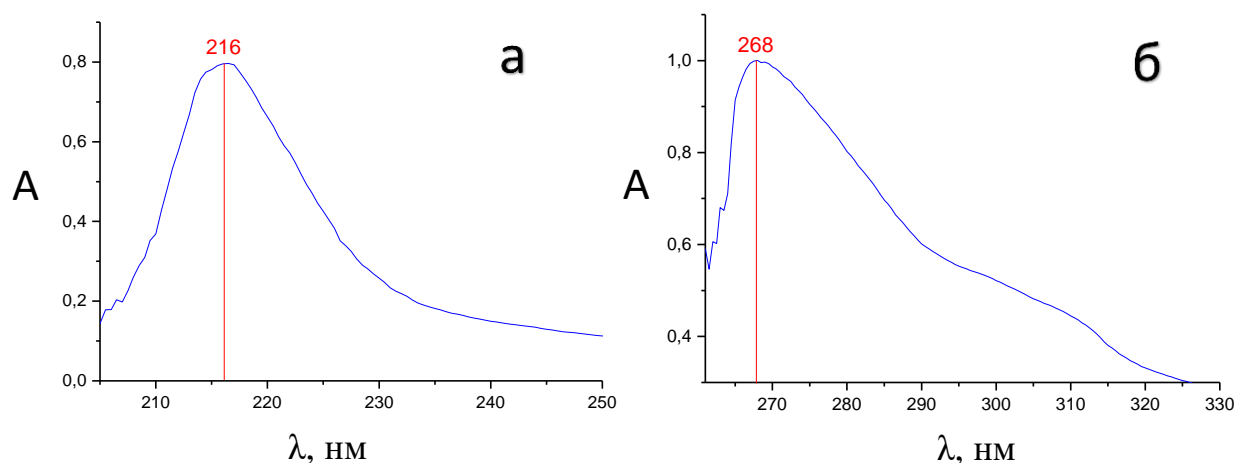


Рисунок 5. УФ-спектры 0,01% (0,245 ммоль/л) растворов N-His-Rim•2HCl•H₂O в этаноле 96% – **а** и ДМФА – **б**.

Экспериментально определены молярные (ϵ) коэффициенты поглощения. Для этанольного раствора: $\epsilon = (3265,3 \pm 81,6) \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ и для раствора в ДМФА: $\epsilon = (4073,7 \pm 61,1) \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

В соответствии с законом Бугера – Ламберта – Бера полученные значения молярных коэффициентов поглощения могут быть использованы в количественном анализе новой субстанции. Метод УФ-спектрометрии может быть также применен для определения подлинности и оценки чистоты субстанции путем сравнения молярных коэффициентов поглощения или электронных спектров со спектрами растворов стандартных образцов.

3. Применение методов QSAR для прогнозирования свойств противовирусных препаратов

Для противогриппозных лекарственных средств прямого действия разных классификационных групп были исследованы зависимости «топологический индекс – свойство» (рис. 6). В качестве примера представлен анализ зависимости «W/J – LogP». Липофильность АФИ определяет совокупность его биофармацевтических характеристик, таких как растворимость, абсорбция в кровотоке, биотрансформация, экскреция, которые в итоге обуславливают терапевтический эффект. В связи с этим выявление корреляций между топологическими индексами и логарифмом коэффициента распределения в

системе октанол/вода (LogP) – важный этап в прогнозировании терапевтической активности фармацевтической субстанции.

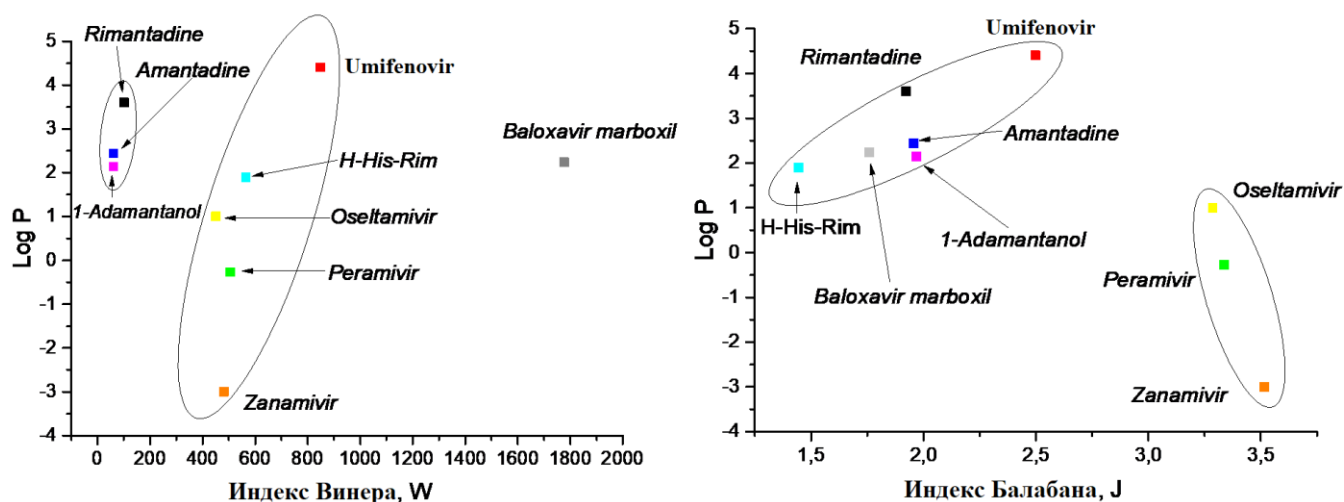


Рисунок 6. Зависимость LogP от значений топологических индексов W и J для АФИ противогриппозных препаратов.

Линейная зависимость « $W - \text{LogP}$ » была обнаружена для отдельных групп препаратов: блокаторы М2-белка ($r = 0,98$), а также ингибиторы нейраминидазы, арбидол и Н-His-Rim ($r = 0,78$). В этом случае наблюдается низкая дискриминирующая способность индекса Винера в отношении Н-His-Rim, который занял положение на одной линии с препаратами других классификационных групп, а не со своими предшественниками класса блокаторов М2-белка.

Выявлена высокая линейная корреляция « $J - \text{LogP}$ » для ингибиторов нейраминидазы ($r = -0,99$) (см. рис. 6). Для препаратов группы блокаторов М2-белка, в том числе Н-His-Rim коэффициент корреляции ниже ($r = 0,83$), что может быть связано с включением в эту группу умифеновира и балоксавира. Следует обратить внимание на более высокие коэффициенты липофильности блокаторов М2-белка и умифеновира по сравнению с ингибиторами нейраминидазы.

Таким образом, проведенные исследования с использованием QSAR-метода, базирующиеся на биологических данных и алгоритмах математического моделирования, позволили пополнить библиотеку QSAR-данных и определить позицию перспективной фармацевтической субстанции Н-His-Rim среди уже

известных противогриппозных препаратов. Расчет топологических индексов будущих субстанций-кандидатов позволит прогнозировать их биологическую активность.

4. Определение биологической активности Н-His-Rim•2HCl•H₂O методом Spirotox

Для оценки биологической активности субстанции Н-His-Rim•2HCl•H₂O проанализирована температурная зависимость гибели *S. ambiguum* в диапазоне 24-32°C с шагом 2°C (рис. 7). Используя аррениусовские координаты, находили значения кажущейся энергии активации ^{obs}E_a, которая отражает лиганд-рецепторное взаимодействие, сопровождающееся гибелью клетки.

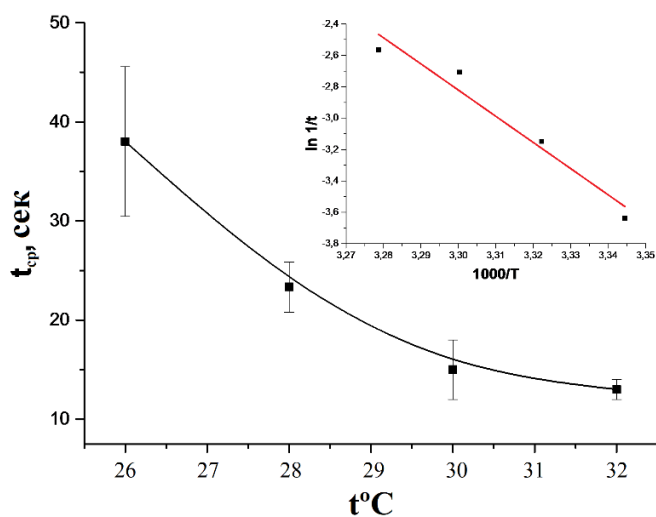


Рисунок 7. Зависимость продолжительности жизни *S. ambiguum* от температуры в 0,025% (0,61 ммоль/л) водном растворе Н-His-Rim•2HCl•H₂O в прямых и аррениусовских (на вставке) координатах.

Было показано, что параметр ^{obs}E_a служит количественным критерием токсичности водных растворов АФИ (Goncharuk V. V. et al., 2017). Это подтверждает выявленная корреляция (рис. 8) между значениями кажущейся энергии активации и LD₅₀ АФИ неорганической и органической природы (крысы, пероральное введение).

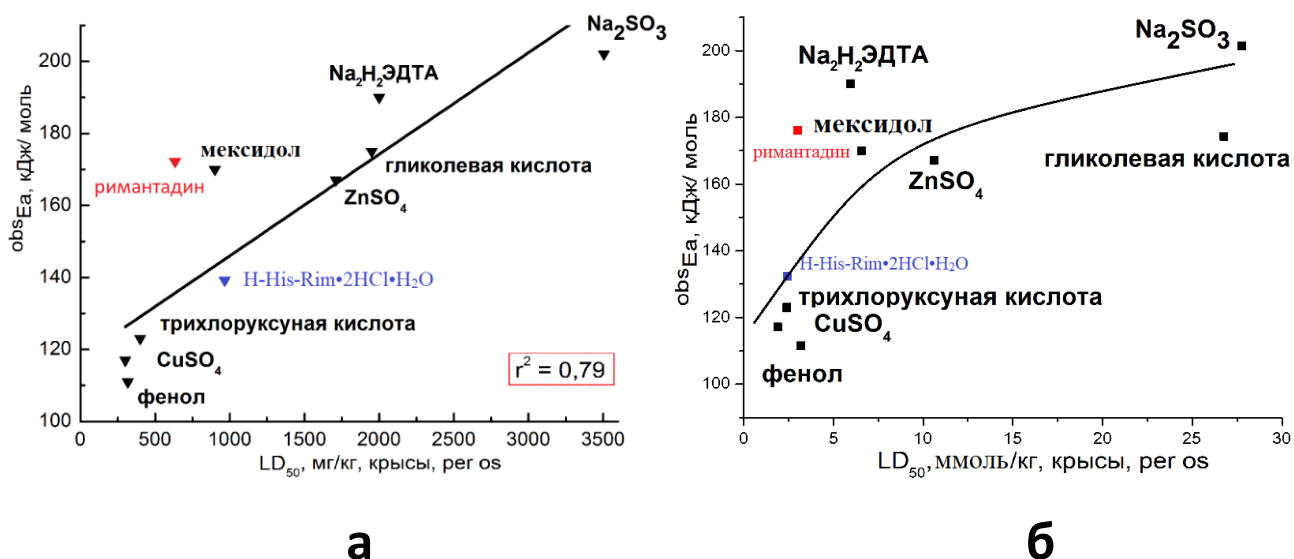


Рисунок 8. Зависимость $^{obs}E_a$ гибели *S. ambigua* от средних летальных доз LD_{50} (мкг/кг – **а**, ммоль/кг – **б**) субстанций при введении *per os* крысам.

Величины $^{obs}E_a$ лиганд-рецепторного взаимодействия выше для субстанций с меньшей токсичностью. Они достигают предельных величин для мало токсичных субстанций порядка 190 – 200 кДж/моль (см. рис. 8). Более низкое значение энергии активации для субстанции H-His-Rim•2HCl•H₂O ($^{obs}E_a = 132,4 \pm 1,6$ кДж/моль) по сравнению с ее предшественником римантадином ($^{obs}E_a = 176,2 \pm 0,5$ кДж/моль) свидетельствует о более высокой биологической активности этого соединения в использованной клеточной модели.

5. Сравнительная оценка противовирусной активности *in vitro* H-His-Rim и субстанций с иными механизмами противовирусного действия

5.1. H-His-Rim•2HCl•H₂O и L-аскорбиновая кислота. Принимая во внимание литературные данные о противовирусном действии АК (Zarubaev V.V. et al., 2017), нами был проведен сравнительный анализ степени ингибирования активности штамма вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1) АК и новой субстанцией H-His-Rim•2HCl•H₂O *in vitro* на клеточной культуре MDCK (табл. 4).

Таблица 4. Средние значения степени ингибирования активности штамма вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1) аскорбиновой кислотой и H-His-Rim•2HCl•H₂O *in vitro* на клеточной культуре MDCK.

Субстанция	Концентрация, ммоль/л	Подавление репродукции вируса, % ($\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$, n= 6, P=0,90)
АК	0,5	40,3 ± 7,6
	1,0	63,5 ± 4,9
	1,5	63,5 ± 4,4
	2,0	80,2 ± 6,4
Н-His-Rim•2HCl•H ₂ O	0,02	74,31 ± 9,1

Полученные значения свидетельствуют о гораздо большей противовирусной активности Н-His-Rim•2HCl•H₂O по сравнению с АК. Аскорбиновая кислота проявляет сопоставимую противовирусную активность (доля ингибирования около 80%) в концентрациях, превышающих таковые для Н-His-Rim•2HCl•H₂O примерно на два порядка.

Таким образом, использование продуктов и препаратов, содержащих аскорбиновую кислоту, при инфекционных заболеваниях является оправданным, но как дополнение к основному лечению.

5.2. Н-His-Rim•2HCl•H₂O и умифеновира гидрохлорид. Умифеновира гидрохлорид (арбидол) уже более 20 лет применяется в России в качестве противовирусного препарата, в том числе для профилактики и лечения гриппа. Сравнительная характеристика противовирусной активности с новой субстанцией была исследована *in vitro* на культуре клеток Vero-E6. Были проанализированы эффективные концентрации соединений (EC₅₀), которые защищали 50% клеток от цитопатического действия вируса.

Результаты показали, что обе субстанции имеют выраженную активность в отношении штамма вируса гриппа A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1). Однако субстанция Н-His-Rim•2HCl•H₂O оказалась более эффективной (EC₅₀ = 1,10 мкмоль/л) по сравнению с умифеновиром (EC₅₀ = 30,36 мкмоль/л). Обнаруженное различие в уровне противовирусной активности этих двух соединений может объясняться различными механизмами действия.

ВЫВОДЫ

1. Комплексный анализ новой противовирусной субстанции N-гистидил-(1-адамантил)этанамина – Н-His-Rim•2HCl•H₂O – (¹H и ¹³C спектроскопия ядерного магнитного резонанса, масс-спектрометрия, инфракрасная спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения, УФ-спектрометрия, CHNS(O)-анализ, хроматография в тонком слое сорбента и поляриметрия) позволяет провести фармацевтическую стандартизацию по показателям качества «подлинность» и «чистота».

2. Установлен центр лиганд-рецепторного взаимодействия Н-His-Rim•2HCl•H₂O – замена Ala30Thr приводит к снижению ΔG связывания с М2-каналом вируса в 2,7 раза, что подтверждено данными по подавлению репродукции нативного штамма A/PuertoRico/8/34(H1N1) с (74,31 ± 9,10 %) до (31,70 ± 5,16 %).

3. На основе QSAR анализа с применением топологических индексов Винера и Балабана для гетероатомных соединений показана обособленная позиция Н-His-Rim•2HCl•H₂O среди АФИ противогриппозных препаратов, отличающаяся от предшественников класса ингибиторов М2-белка

4. Получены физико-химические и биологические характеристики Н-His-Rim•2HCl•H₂O: $[\alpha]_D^{20} = +7,22 \pm 0,06$ (1% водный раствор); $\varepsilon = 3265,3 \pm 81,6$ л•моль⁻¹•см⁻¹ ($\lambda_{\max} = 216$ нм, раствор в 96% этаноле); наблюдаемая энергия активации процесса гибели клеточного биосенсора $^{obs}E_a = 132,4 \pm 1,6$ кДж/моль (Spirotox-test).

5. Установлено, что ингибирование активности штамма вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1) препаратом Н-His-Rim•2HCl•H₂O на два порядка эффективнее, чем умифеновиром и аскорбиновой кислотой.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Одноров, А.И.** Молекулярная модель ингибитора ионного канала М2 вируса гриппа А / **А.И. Одноров**, Т.М. Гараев, Т.В. Гребенникова // Материалы XI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с

международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы», М.: Медицинское Маркетинговое Агентство, 2019. – С. 151.

2. Одноров, А.И. Разработка методов изучения механизма противовирусного действия новых соединений / **А.И. Одноров** // Сборник материалов IX Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», СПб.: Изд-во СПХФУ, 2019. – С. 546-548.

3. Одноров, А.И. Изучение физико-химических свойств производного римантадина / **А.И. Одноров** // Сборник материалов X Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», СПб.: Изд-во СПХФУ, 2020. – С. 198-200.

4. Одноров, А.И. Специфическая терапия гриппа: современное состояние и перспективы / **А.И. Одноров**, Т.В. Гребенникова, Т.В. Плетенева // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Т. 9. – № 1. – С. 83–91. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-1-83-91>

5. Одноров, А.И. Количественные корреляции «структура – свойство» противогриппозных лекарственных средств / **А.И. Одноров**, Т.В. Плетенева, М.А. Морозова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2020. – Т. 23. – № 4. – С. 25-32. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-04-04>

6. Дерябин, П.Г. Оценка противовирусной активности соединения 2НС1*Н-His-Rim в сравнении с противогриппозным препаратом «Арбидол» в отношении высоковирулентного штамма вируса гриппа A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) (Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae) / П.Г. Дерябин, Т.М. Гараев, М.П. Финогенова, **А.И. Одноров** // Вопросы вирусологии. – 2019. – Т. 64. – № 6. – С. 268-273. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-268-273>

7. Гараев, Т.М. Производные адамантана, способные ингибировать репродукцию резистентного к римантадину штамма вируса гриппа A(H1N1)pdm09 (Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae) / Т.М.

Гараев, А.И. **Одноворов**, Е.С. Кириллова, Е.И. Бурцева, М.П. Финогенова, Е.А. Мукашева, Т.В. Гребенникова // Вопросы вирусологии. – 2020. – Т. 65. – № 1. – С. 16-20. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-16-20>

8. Odnovorov, A. Prospects for Specific Influenza Treatment / **A. Odnovorov**, T. Garaev, T. Grebennikova, T. Pleteneva // Systematic Reviews in Pharmacy. – 2020. – V. 11. – № 2. – P. 242-248. <http://dx.doi.org/10.5530/srp.2020.2.37>

9. Uspenskaya, E.V. Role of stable hydrogen isotope variations in water for drug dissolution managing / E.V. Uspenskaya, T.V. Pleteneva, A.V. Syroeshkin, Ilaha V. Kazimova, T.E. Elizarova, **A.I. Odnovorov** // Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. – 2020. – V. 33. – № 2. – P. 94-101. <https://doi.org/10.2478/cipms-2020-0017>

10. Odnovorov, A.I. Physicochemical properties and biological activity of the new antiviral substance / **A.I. Odnovorov**, T.V. Grebennikova, T.V. Pleteneva, T.M. Garaev, E.V. Uspenskaya, N.A. Khodorovich, O.V. Levitskaya, A.M. Koldina // International Journal of Applied Pharmaceutics. – 2020. – V. 12. – № 4. – P. 237-242. <https://doi.org/10.22159/ijap.2020v12i4.38136>

Одноворов Артем Игоревич
(Российская Федерация)

КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОЙ ПРОТИВОГРИППОЗНОЙ СУБСТАНЦИИ ПРЯМОГО ДЕЙСТВИЯ

Диссертационная работа посвящена разработке комплексного подхода к оценке свойств новой перспективной противогриппозной субстанции методами фармацевтического и биофармацевтического анализа. Использование методов математического моделирования и обратной генетики позволило охарактеризовать предполагаемый механизм противовирусного действия новой субстанции, который заключается в блокировании М2-белка вируса гриппа. С помощью современных физических, физико-химических методов фармакопейного анализа проведена стандартизация субстанции, что необходимо для разработки нормативной документации. QSAR-моделирование позволило создать библиотеку данных АФИ противогриппозных препаратов, которая может использоваться при разработке новых субстанций.

Полученные результаты исследования критически важны для проведения предстоящих клинических исследований перспективной субстанции.

Odnovorov Artyom Igorevich

(Russian Federation)

**COMPREHENSIVE STUDY OF A NEW ANTI-INFLUENZA SUBSTANCE OF
DIRECT ACTION**

The dissertation work is devoted to the development of an integrated approach to assessing the properties of a new promising anti-influenza substance by methods of pharmaceutical and biopharmaceutical analysis. The use of mathematical modeling and reverse genetics methods made it possible to characterize the proposed mechanism of the antiviral action of the new substance, which consists in blocking the M2 protein of the influenza virus. With the help of modern physical, physicochemical methods of pharmacopoeial analysis, the substance was standardized, which is necessary for the development of regulatory documents. QSAR modeling has made it possible to create an API data library for anti-influenza drugs that can be used in the development of new substances.

The findings of the study are critically important for future clinical trials of the promising substance.