

УДК 615.281; 8:615.012.1

ГРИДІНА Т.Л., канд.біол.наук, e-mail: tatyana.gridina1207@gmail.com*Одеський національний медичний університет***ФЕДЧУК А.С.**, канд. біол. наук, e-mail: allafedchukua16@gmail.com*ООО НДЦ «БІППІ»***ШИТИКОВА Л.І.**, e-mail: lgunchenko@ukr.net*ДУ «Український науково-дослідний протичумний інститут ім.І.І.Мечнікова» МОЗ України***КУЗЬМІН В.Є.**, д-р.хім.наук, професор, e-mail: theorchem@gmail.com**АРТЕМЕНКО А.Г.**, канд.хім.наук, e-mail: artanat@ukr.net**БАСОК С.С.**, канд.хім.наук, e-mail: sbasok@ukr.net*Фізико-хімічний інститут ім.О.В.Богатського, НАН України***ГРУЗЕВСЬКИЙ О.А.**, канд.мед.наук, доцент, e-mail: gruzevskiy@ua.fm*Одеський національний медичний університет*

МОЛЕКУЛЯРНИЙ ДИЗАЙН ТА СПРЯМОВАНИЙ СИНТЕЗ НОВИХ СПЛУК З ПРОТИВІРУСНОЮ АКТИВНІСТЮ ПО ВІДНОШЕННЮ ДО ВІРУСУ ГРИПУ ПТАХІВ

З використанням QSAR-технології розроблено та застосовано моделі, які дозволяють встановити кількісний зв'язок між структурою сполук та їх протигрипозною активністю. За допомогою цих моделей проведено віртуальний скринінг, молекулярний дизайн, а також спрямований синтез сполук, які мали високий рівень прогнозованої протигрипозної активності, а також проявляли аналогічну дію в експерименті стосовно вірусу грипу птахів H5N3 на культурі тканини. Застосування запропонованого підходу дозволить спростити пошук та синтез речовин, які в подальшому можуть бути використані в якості противірусних препаратів.

Ключові слова: вірус грипу птахів, противірусна активність, дизайн та спрямований синтез протигрипозних сполук

Вступ. Грип – гостра вірусна інфекція дихального шляху, яка займає одне з провідних місць серед усієї інфекційної патології та реєструється в усіх регіонах планети [1]. Легкість передачі збудника повітряно-крапельним шляхом, висока чутливість організму призводить до частих захворювань з епідемічним розповсюдженням інфекції. Пандемії та епідемії грипу викликають інтерес саме через значні ушкодження, які можуть спричинитись здоров'ю населення, оскільки грип обумовлює зниження імунологічної реактивності, що часто призводить до загострення багатьох хронічних захворювань, а також виникнення вторинних бактеріальних ускладнень. Тому у 2001 році віруси грипу були включені ВООЗ до третьої категорії потенційних агентів біологічної зброї [2].

З 2005 року у людей реєструються епідемічні спалахи, викликані штамом пташиного грипу H5N1. У 2009 році у світі почав розповсюджуватись вірус грипу людини А/Каліфорнія/04/2009 (H1N1), геном якого містить гени вірусів грипу птиць, свиней і людини, і ВООЗ оголосило пандемію, викликану цим штамом [3]. З 1996 по 2012 роки в усьому світі реєструвались випадки інфікування людей вірусами грипу H7 (H7N2, H7N3 и H7N7). У 2013 році кількість випадків інфікування людей вірусами грипу H7 в Китаї значно підвищилась [4]. Більшість з них були пов'язані зі спалахами хвороби серед свійської птиці.

У людей інфекція, викликана цими штамми, частіше протікала у вигляді кон'юнктивіту та захворювань верхніх дихальних шляхів. Спостерігалась можливість інфікування від тварин до людини, а також від людини до людини [4]. Таким чином, протягом

останніх 10-15 років віруси грипу птахів в результаті мутацій змінили свої біологічні властивості, набули можливості долати хазяйський бар'єр з безпосереднім інфікуванням людей, викликати тяжкі клінічні форми захворювання, які можуть закінчуватись летально. З березня 2013 року по січень 2018 року в світі зареєстровано 1565 випадків зараження людей вірусом грипу птахів [5]. Штами вірусів грипу птахів H5N1, H7N9 та свиней H1N1, являються небезпечними патогенами для людини. Крім того, зберігається великий ризик виникнення нових пандемічних штамів вірусу грипу внаслідок реасортації [6].

За рекомендаціями ВООЗ, протигрипозними терапевтичними препаратами для людей є похідні адамантанів, а також інгібітори нейрамінідази. Але переважна більшість людських ізолятів вірусів грипу швидко набувають стійкості до дії ремантадину, озельтамівіру [7, 8]. Подальше використання інгібіторів нейрамінідази для лікування від грипу пацієнтів, інфікованих стійкими штамми, може призвести до посиленого розповсюдження саме стійких штамів [9].

Пошук і розробка нових хіміотерапевтичних засобів для етіотропної протигрипозної терапії є актуальним питанням науки. Використання з цією метою простого скринінгу перспективних сполук є недоцільним через високу економічну затратність. Більш доцільною є розробка сучасних, науково обґрунтованих технологій молекулярного дизайну структур з прогнозованою специфічною противірусною активністю по відношенню до різних вірусів грипу, зокрема, пташиного. Для досягнення цієї мети використовують технічні підходи молекулярного дизайну та відбору сполук з високою прогнозованою противірусною активністю. Спрямований синтез та раціональний відбір найбільш перспективних сполук можна здійснювати за допомогою комп'ютерної системи аналізу кількісного співвідношення структура-активність (QSAR).

Мета роботи. Метою цієї роботи була розробка нових сполук з протигрипозною активністю з використанням нових комп'ютерних технологій. Для цього слід було вирішити наступні задачі:

1. З використанням QSAR-технологій здійснити молекулярний дизайн органічних сполук з прогнозованою противірусною активністю у відношенні до збудників грипу птахів.
2. Провести спрямований синтез таких сполук.
3. Визначити протигрипозну активність нових синтезованих сполук в експерименті *in vitro* по відношенню до штаму вірусу грипу птахів H5N3.
4. Порівняти протигрипозну активність, отриману в експерименті, з прогнозованою активністю, яку розраховували за допомогою QSAR-технології.

Матеріали і методи досліджень. Для ідентифікації синтезованих сполук були застосовані наступні методи експериментального дослідження: мас-спектрометрії, ядерного магнітного резонансу, інфрачервоної спектрометрії, елементного аналізу.

Протигрипозну активність синтезованих сполук в експерименті *in vitro* вивчали у відношенні вірусу грипу птахів H5N3, використовуючи культуру тканини ХАО [10]. Розрахунок дози ТІД₅₀ проводили за методом Кербера в модифікації І.П. Ашмаріна за формулою [11]:

$$\lg TID_{50} = L - d(S - 0,5),$$

де L – початкове розведення у досліді;

d – різниця між послідовними lg розведень;

S – сума пропорцій тест-об’єктів, які дали позитивний результат.

Статистичну значущість результатів вивчення антивірусної дії препаратів *in vitro* визначали за непараметричним критерієм знаків для пов’язаних вибірок (P за К.3.) [12].

Результати досліджень та їх обговорення. Хіміками-теоретиками з Фізико-хімічного інституту імені О.В.Багатського був проведений QSAR аналіз, на підставі якого був зроблений прогноз протигрипозних властивостей сполук. Послідовність кроків у алгоритмі HIT QSAR досліджень була наступна:

- спочатку формувалась навчаюча вибірка, що включала різні сполуки з відомою активністю проти вірусів грипу;
- докладну інформацію щодо структури цих сполук аналізували і класифікували;
- за допомогою адекватних математичних моделей визначали співвідношення між структурними параметрами і протигрипозними властивостями сполук;
- ці співвідношення використовували для дизайну нових сполук.

У лікарських препаратів, з яких формувалася навчаюча виборка, визначали рівень противірусної активності в експерименті на культурі тканини ХАО (Табл.1).

Таблиця 1

Рівень прогнозованої та отриманої в експерименті противірусної активності протигрипозних препаратів, у відношенні вірусу грипу штаму H5N3

	Препарат	Молекулярна маса	Прогнозована протигрипозна активність	Пригнічення репродукції вірусу H5N3 в lg ТІД ₅₀
1	Ремантадин	179	4,801	5,42
2	Дейтифорин	174	3,992	3,75
3	Озельтамівір	410	3,464	3,75
4	Етоній	514	3,392	3,25
5	Декаметоксин	622	3,37	3,25
6	Аміксин	410	2,688	2,5
7	Унітіол	210	1,65	2,33
8	Амбен	151	0,785	1,0
9	Ацемінат натрію	195	0,651	0,67
10	Амізон	340	0,633	0,5

За допомогою навчаючої вибірки та застосування HIT QSAR було виявлено структурні фрагменти, які відповідальні за формування противірусної активності проти вірусу грипу птахів H5N3. Виявлені фрагменти були використані для молекулярного дизайну сполук з високою прогнозованою противірусною активністю. В подальшому, був здійснений спрямований синтез цих речовин. Стратегія синтезу включала в себе як використання відомих

підходів з арсеналу синтетичної органічної хімії, так і шляхи синтезу, націлених на спрямоване отримання сполук з прогнозованою протівірусною активністю.

Далі визначали рівень біологічної активності цих сполук в експерименті. В таблиці 2 наведені дані щодо рівня прогнозованої за допомогою QSAR аналізу та отриманої в експерименті на культурі тканини ХАО протигрипозної активності нових синтезованих сполук.

Таблиця 2

Рівень прогнозованої та отриманої в експерименті протигрипозної активності синтезованих сполук, у відношенні до вірусу грипу штаму H5N3

	Препарати	Молекулярна маса	Прогнозована протигрипозна активність	Пригнічення репродукції вірусу H5N3 в Іг ТІД 50
1	2	3	4	5
1	BSS12	650,31	3,945	4,08
2	BSS32	236	3,67	4,67
3	ChD20	336.45	3,614	3,5
4	SB37	310	3,282	4,0
5	ChD18	393.434	3,222	3,33
6	SB4	376	3,061	1,17
7	ChD25	209.25	2,845	3,42
8	ChD1	205	2,793	3,33
9	BSS13	176	2,385	0,25
10	SB32	339,41	1,888	2,0
12	SB2	378	1,681	1,25
13	ChD23	159	1,626	1,83
14	ChD22	282	1,618	2,42
15	SB31	295,38	1,311	1,08
16	stcu1166	245	1,169	3,83
17	BSS4	334	1,148	4,42
18	ChD14	273	0,993	0,67
19	stcu1126	189	0,857	0,75
20	ChD13	287	0,676	3,42
21	ChD16	285	0,624	0,75
22	stcu1256	133	0,606	0,58
23	BSS1	302	0,606	0,42
24	stcu1129	161	0,595	0,58
25	BSS9	126	0,533	0,5
26	BSS30	252	0,418	0,33
28	BSS26	313	0,387	0,42
29	BSS7	254,5	0,368	0,5
30	chd03	176	0,324	0,42
31	BSS3	372	0,312	0,08
32	BSS5	268,5	0,226	0,17
33	BSS8	218	0,192	0,08
34	ChD21	284	0,023	-0,92
35	ChD12	347	0,002	0,08
36	BSS6	240,5	0,013	-0,08
37	SB38	266	-0,311	4,0

Наведені в таблиці 2 дані свідчать, що 25 з 37 синтезованих сполук, які за прогнозом мали певний рівень протигрипозної активності, підтвердили цей рівень в експерименті. У 3 сполук рівень прогнозованої активності був вищим, ніж, отриманий в експерименті. У 9 сполук експериментальний рівень протигрипозної активності перевищував рівень прогнозованої активності. Тобто, за допомогою використаних QSAR-технологій, було здійснено синтез речовин, які у 67,57% проявляли прогнозовані властивості в експерименті.

Висновки та перспективи подальших досліджень. З використанням ієрархічної QSAR-технології розроблено та застосовано моделі, які дозволяють встановити зв'язок між структурою сполук та їх протигрипозною активністю. Отримані моделі є адекватними та мають високу прогнозуючу здатність. За допомогою отриманих моделей проведено віртуальний скринінг та молекулярний дизайн нових протигрипозних агентів, виявлено структурні фрагменти, які відповідальні за активність проти вірусу грипу птахів H5N3. Створені сполуки мали високий рівень прогнозованої антивірусної активності, а також проявляли аналогічну протигрипозну дію в експерименті. Таким чином, застосування запропонованого підходу дозволить спростити пошук та синтез речовин, які в подальшому можуть бути використані в якості противірусних препаратів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гридін Т. Л. Лікування грипу – завжди актуальне питання / Т. Л. Гридін // Одеський медичний журнал. – 2015. – № 5. – С. 76–80.
2. World health Report 2002: Reducing risks, promoting healthy life. – Geneva, 2002.
3. Грипп [Электронный ресурс] // Информационный бюллетень. – 2009. – № 211 (Апрель). – Режим доступа : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/ru/index.html>. – Заглавие с экрана.
4. Актуальная информация о вирусе птичьего гриппа А(Н7N9), предоставленная Европейским региональным бюро ВОЗ Обновленный обзор ситуации [Электронный ресурс]. – 2013. – Вып. 3 (9 мая). – Режим доступа: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0011/188534/WHO-Regional-Office-for-Europe-update-on-avian-influenza-AH7N9-virus,-Situation-update-3,-9-May-2013-Rus.pdf. – Заглавие с экрана.
5. Avian Influenza Report [Electronic resource] // Reporting period: December 31, 2017–January 6, (Week 1) (Published on January 9, 2018) / Centre for Health Protection. – 2018. – Vol. 14, № 1. – Mode of access: https://www.chp.gov.hk/files/pdf/2018_avian_influenza_report_vol14_wk01.pdf. – Title from the screen.
6. Start of the 2014/15 influenza season in Europe: drifted influenza A(H3N2) viruses circulate as dominant subtype [Electronic resource] / E. Broberg, R. Snacken, C. Adlhoch, J. Beauté, M. Galinska, D. Pereyaslov, C. Brown, P. Penttinen. – Mode of access : <http://eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2015.20.4.21023>. – Title from the screen.
7. Center of Disease Control and Prevention. Oseltamivir-resistant 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in two summer campers receiving prophylaxis – North Carolina, 2009 // Morbidity and Mortality Weekly Report. – 2009. – Vol. 58. – P. 969–720.
8. Gubareva L. V. M2 and neuraminidase inhibitors: anti-influenza activity, mechanisms of resistance and clinical effectiveness / L. V. Gubareva, F. G. Hayden // Influenza virology: current topics / Kawakita Y. ed. – Wymondham, United Kingdom : Caister Press, 2006. – P. 169 – 202.
9. A Resistance to Neuraminidase Inhibitors Conferred by an R292K Mutation in a Human Influenza Virus H7N9 Isolate Can Be Masked by a Mixed R/K Viral Population / H.-L. Yen, J. L. McKimm-Breschkin, K.-T. Choy, D. D. Y. Wong, P. P. H. Cheung, J. Zhou, I. H. Ng, H. Zhu, R. J. Webby, Y. Guan, R. G. Webster, and J. S. M. Peiris // American Society for Microbiology. – 2013. – Vol. 4. – P. e00396–00413.
10. Доклинические исследования лекарственных средств : [методические рекомендации] / ред. А. В. Стефанов. – Киев : Авиценна, 2002. – С. 395–420.

11. Ашмарин И. П. Вычисление ED_{50} при малом числе подопытных животных / И. П. Ашмарин // Журнал микробиологии. – 1959. – № 2. – С. 102–108.

12. Гублер Е. В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е. В. Гублер, А. А. Генкин. – Ленинград : Медицина, 1973. – 142 с.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДИЗАЙН И НАПРАВЛЕННЫЙ СИНТЕЗ НОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ / Грыдина Т.Л., Федчук А.С., Шитикова Л.И., Кузьмин В.Е., Артеменко А.Г., Басок С.С., Грузевский А.А.

С использованием QSAR-технологии разработаны и применены модели, позволяющие установить количественную связь между структурой соединений и их противовирусной активностью. С помощью этих моделей проведен виртуальный скрининг, молекулярный дизайн и направленный синтез соединений, имеющих высокий уровень прогнозированной активности, который подтверждался в эксперименте в отношении вируса гриппа птиц H5N3 на тканевой культуре. Применение предложенного подхода позволяет упростить поиск и синтез веществ, которые в дальнейшем могут быть использованы в качестве противовирусных препаратов.

Ключевые слова: вирус гриппа птиц, противовирусная активность, дизайн и направленный синтез противовирусных соединений

MOLECULAR DESIGN AND DIRECTED SYNTHESIS OF NEW COMPOUNDS WITH ANTIVIRAL ACTIVITY AGAINST AVIAN INFLUENZA VIRUS / Grydina T.L., Fedchuk A.S., Shitikova L.I., Kuz'min V.E., Artemenko A.G., Basok S. S., Gruzevsky A.A.

Introduction. *The influenza virus causes the greatest number of acute respiratory viral infections, which can lead to an exacerbation of chronic systemic diseases, to emergence of bacterial complications, to a significant deterioration of public health.*

The goal of the work. *The main scope of the investigation was creation of compounds with high activity against avian influenza with the QSAR technology. For the realization of this scope we have to:*

- 1. develop the original software for the QSAR analysis aimed at the molecular design of the compounds with high predicted antiviral activity against avian influenza;*
- 2. conduct directed synthesis of such compounds;*
- 3. determine activity of the new synthesized compounds in vitro against the strain of the avian virus H5N3;*
- 4. compare the experimental anti-influenza activity with the predicted activity calculated with the QSAR technology.*

Materials and methods. *The anti-influenza activity of the compounds was studied in vitro against the avian virus H5N3 using tissue culture of chorio-allantoic membranes of 10-12-days chicken embryos (CAM).*

Results of research and discussion. *25 out of 37 new synthesized compounds have confirmed the high level of predicted activity in the experiment in the tissue of CAM culture. The level of predicted activity of 3 compounds was higher than that obtained in the experiment. The experimental level of anti-influenza activity of 9 compounds exceeded the level of predicted activity. Thus, using the QSAR technologies, synthesis of substances was carried out, which showed 67.57% of the predicted properties in the experiment.*

Conclusions and prospects for further research. *Models making it possible to establish a quantitative relationship between the structure of compounds and their anti-influenza activity have been developed and applied. The molecular design and directed synthesis of compounds with a high level of predicted activity were carried out with the help of these models. The level of predicted activity was confirmed in the experiment in the tissue of CAM culture against avian influenza H5N3. Application of the proposed approach makes it possible to simplify the search and synthesis of substances that can later be used as antiviral drugs.*

Keywords: *avian influenza virus, antiviral activity, design and directed synthesis of influenza compounds*

REFERENCES

1. Grydina T.L. (2015) Likuvannia hrypu – zavzhdy aktualne pytannia [Influenza is always important problem]. *Odes'kyj medychnyj zhurnal – Odessa med.J.*, 151, 5, 76-80. [in Ukrainian]
2. *World health Report 2002: Reducing risks, promoting healthy life* (2002). – Geneva.
3. Influenza. Bulletin 211, April 2009. www.who.int – Retrieved from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/ru/index.html>. [in English]
4. Relevant information about avian influenza virus A (H7N9), provided by the WHO Regional Office updated review of the situation, Issue 3, May 9, 2013. www.euro.who.int. Retrieved from: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0011/188534/WHO-Regional-Office-for-Europe-update-on-avian-influenza-AH7N9-virus,-Situation-update-3,-9-May-2013-Rus.pdf. [in English]
5. Avian Influenza // Report vol.14, N1. Reporting period: December 31, 2017 –January 6, 2018 (Week 1) (Published on January 9, 2018) www.chp.gov.hk. Retrieved from: https://www.chp.gov.hk/files/pdf/2018_avian_influenza_report_vol14_wk01.pdf [in English]
6. Broberg E, Snacken R, Adlhoch C, Beauté J, Galinska M, Pereyaslov et al (2015) Start of the 2014/15 influenza season in Europe: drifted influenza A(H3N2) viruses circulate as dominant subtype. *Euro Surveill.* 20(4), 21023. Retrieved from: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21023> [in English]
7. Center of Disease Control and Prevention. Oseltamivir-resistant 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in two summer campers receiving prophylaxis – North Carolina (2009). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 58., 969-720 [in English].
8. Gubareva LV & Hayden FG. (2006) *M2 and neuraminidase inhibitors: anti-influenza activity, mechanisms of resistance and clinical effectiveness* / In: Kawaoka Y, editor. *Influenza virology: current topics*. Wymondham, United Kingdom: Caister Press. - p. 169-202 [in English].
9. H.-L. Yen, J. L. McKimm-Breschkin, K.-T. Choy, D. D. Y. Wong, P. P. H. Cheung, J. Zhou, et al (2013) A Resistance to Neuraminidase Inhibitors Conferred by an R292K Mutation in a Human Influenza Virus H7N9 Isolate Can Be Masked by a Mixed R/K Viral Population. *mBio*, 4(4), e00396-13. - Published online 2013 July 16. Retrieved from: <http://mbio.asm.org/content/4/4/e00396-13> (viewed on July 20, 2013) [in English].
10. Stefanov A.V. (ed.) (2002). *Doklinicheskie issledovaniia lekarstvennikh sredstv. Metodicheskie rekomendatsii* [Pre-clinical researches of drugs. Methodical recommendations.] Kyiv: Avitsenna. [In Russian]
11. Ashmarin I.P. (1959) Vychislenie ED₅₀ pri malom chisle podopitnikh zhivotnikh [Calculation of ED₅₀ with a small number of experimental animals]. *Zhurnal mikrobiologii – Journal of Microbiology.* 2, 102-108. [In Russian]
12. Gubler EV, Genkin AA.(1973) *Primenenie neparametricheskikh kriteriev statistiki v medicobiologicheskikh issledovaniyakh* [Application of nonparametric criteria of statistics in biomedical research]. L: Medicine. [In Russian].