

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/333451426>

The effect of the structure of derivatives of nitrogen-containing heterocycles on their anti-influenza activity

Article in *Chemistry of Heterocyclic Compounds* · May 2019

DOI: 10.1007/s10593-019-02479-5

CITATIONS

0

READS

67

9 authors, including:



Anatoliy F. Lutsyuk

National Academy of Sciences of Ukraine

18 PUBLICATIONS 0 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Victor Kuz'min

National Academy of Sciences of Ukraine

192 PUBLICATIONS 2,652 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Development and implementation of in silico technologies create new nanobiomaterials - the potential of effective antiviral drugs and reliable methodology for risk assessment of their negative impact on the human health [View project](#)



antiviral activity of nitrogen containing macroheterocycles and its analogues [View project](#)

Влияние структуры производных азотсодержащих гетероциклов на их противогриппозную активность

Татьяна Л. Гридина¹, Алла С. Федчук², Степан С. Басок³,
Анатолий Г. Артеменко³, Людмила Н. Огниченко³, Лариса И. Шитикова⁴,
Анатолий Ф. Луцюк³, Александр А. Грузевский¹, Виктор Е. Кузьмин^{3*}

¹ Одесский национальный медицинский университет,
пер. Валиховский, 2, Одесса 65082, Украина; e-mail: tatyana.gridina1207@gmail.com

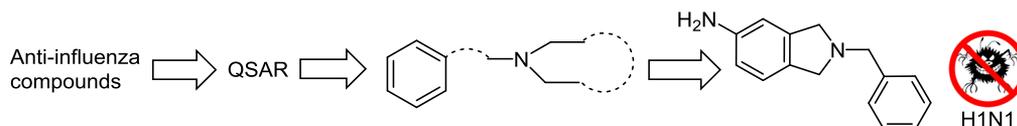
² ООО Национальный диагностический центр "БППП+",
ул. Атамана Чепиги, 15, Одесса 65000, Украина; e-mail: allafedchukua16@gmail.com

³ Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины,
Львосторфская дорога, 86, Одесса 65080, Украина; e-mail: theorchem@gmail.com

⁴ Украинский научно-исследовательский противочумный институт им. И. И. Мечникова,
ул. Церковная, 2/4, Одесса 65000, Украина

Поступило 4.03.2019

Принято 3.04.2019



Для оптимизации поиска новых противогриппозных агентов была построена вполне адекватная модель QSAR на базе симплексного представления молекулярной структуры. Структурная интерпретация модели позволила выявить молекулярные фрагменты, определяющие активность соединений против вирусов гриппа человека. Проведенный в дальнейшем виртуальный скрининг и целенаправленный синтез позволили отобрать группу потенциально эффективных соединений, из которых три – производные пиперидина и изоиндолина – оказались наиболее перспективными.

Ключевые слова: гетероциклические соединения, вирусы гриппа человека, виртуальный скрининг, противовирусная активность, метод QSAR.

Разработка химиотерапевтических средств, лекарственных препаратов, которые избирательно подавляют в организме человека размножение возбудителей инфекционных заболеваний, особенно вирусной этиологии, до сих пор остается достаточно актуальным направлением современной науки. Новые вирусы птичьего гриппа H5N1 и свиного H1N1 являются опасными патогенами человека. Большинство человеческих изолятов вируса устойчивы к действию самого распространенного противогриппозного препарата римантадина и способны эффективно подавлять интерфероновый ответ организма.¹ Таким образом, ситуация, сложившаяся в последние три года в отношении инфицирования человека вирусом гриппа, придает особую актуальность поискам новых эффективных средств профилактики и терапии этой инфекции. Высокая вирулентность вируса гриппа и его способность быстро вырабатывать резистентность к используемым химиотерапевтическим средствам делают разработку новых эффективных препаратов с

возможно более широким спектром активности одной из первостепенных задач медицинской химии и вирусологии.

Противовирусными считаются такие препараты, которые предотвращают и/или подавляют жизнедеятельность микропопуляции вируса в биологической системе – организме хозяина. Эти препараты могут быть синтетического или природного происхождения.^{2,3} Противогриппозные препараты, которые различаются по химическому составу, механизму действия, спектру активности и длительности клинического действия, разделяют на три большие группы: 1) собственно этиотропные химиопрепараты, которые непосредственно влияют на возбудителя и/или подавляют его репродукцию; 2) интерфероны и индукторы интерферона и 3) иммуномодуляторы.⁴⁻⁶ В свою очередь, соединения первой группы, то есть этиотропные препараты, которые непосредственно влияют на процессы репродукции возбудителя вирусной природы, также можно разделить в зависимости от

механизма их влияния на процесс развития инфекции в организме хозяина. Во-первых, такие соединения могут взаимодействовать с рецептором клетки-хозяина, который используется вирусом для проникновения в чувствительную клетку, блокируя или видоизменяя его, во-вторых, связывать поверхностные антигенные детерминанты самого вируса, и, в-третьих, разрушать внеклеточный вирус.⁷

По механизмам влияния на этапы репродукции вируса в клетке-хозяине различают препараты, которые непосредственно или опосредованно влияют на функционирование вирусного генома, избирательно ингибируя один или несколько этапов вирусной репродукции, в частности, подавляя пенетрацию и/или депротенинизацию вируса, транскрипцию вирусного генома, действие вирусспецифических ДНК- и РНК-полимераз, вирусных полипептидов или вирусных поверхностных антигенов.⁷ Основными классами противовирусных препаратов на сегодняшний день являются аномальные нуклеозиды, производные адамантана и тиосемикарбазонов, синтетические аминокислоты, аналоги пиродифосфата и вирулицидные препараты.^{8,9} Механизм противовирусного действия этого типа соединений связан с ингибированием протонного канала M2 – традиционной мишени для амантадина и римантадина.

В связи с высокой резистентностью современных штаммов вирусов гриппа к производным адамантана необходима разработка новых препаратов, которые способны эффективно ингибировать штаммы вируса. Такими веществами могут быть гетероциклические соединения. Механизм противовирусного действия гетероциклов не связан с ингибированием протонного канала M2. Поэтому гетероциклические соединения способны эффективно ингибировать штаммы вируса, устойчивые к адамантановым производным. Установлено, что гетероциклы с гексагидрохроменовым остовом, а также содержащие атом фтора способны напрямую ингибировать вирусный гемагглютинин и таким образом препятствовать слиянию вирусной оболочки с клеточной мембраной.¹⁰

Обнаружено, что нуклеозид триазавирин, который является представителем большой группы гетероциклических соединений азолоазинов, напоминает по структуре азотистые основания, из которых строятся нуклеиновые кислоты человеческого организма – ДНК или РНК. Этот многоатомный фрагмент встраивается в вирусиндуцированную нуклеиновую кислоту (ДНК или РНК) и тем самым препятствует репродукции вирусного возбудителя инфекции. Триазавирин не только противогриппозное средство: этот гетероциклический препарат действует на вирус клещевого энцефалита и эффективен при геморрагической лихорадке с почечным синдромом.¹¹

Противовирусное действие на уровне целого организма хозяина могут оказывать и соединения, не имеющие прямого влияния на вирион или этапы его репродукции, но способствующие элиминации инфицированной клетки или направленному апоптозу этих

клеток, путем активации иммунокомпетентных клеток организма хозяина.¹²

Эффективными при вирусных инфекциях могут также быть препараты, которые непосредственно воздействуют на организм хозяина, повышая его защитные силы, напряженность иммунитета. Такими препаратами являются иммуномодуляторы, интерфероны или индукторы интерферона.^{5,13}

Следует отметить, что при наличии у исследуемых соединений специфической противовирусной активности с любым механизмом противовирусного действия они не должны оказывать цитопатического действия на клетки организма хозяина. Поэтому в процессе поиска и создания этиотропных противовирусных препаратов исследователи проводят скрининг большого количества соединений, которые, обладая антивирусными свойствами, не оказывают токсического действия на организм хозяина.

Разработка новых фармацевтических средств является достаточно долгим и финансово затратным процессом. В настоящее время с целью повышения эффективности процесса отбора активных соединений с определенными биологическими свойствами широко используются компьютерные технологии, в частности методы QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship), которые обеспечивают установление количественных соотношений между структурами соединений и их специфической биологической активностью.¹⁴ Использование таких технологий позволяет не только проводить предварительный скрининг активности соединений, но и осуществлять молекулярный дизайн, а затем проводить направленный синтез таких соединений, которые будут проявлять ожидаемые свойства.

Именно такие подходы были использованы нами, чтобы создать и отобрать соединения с высокой прогнозируемой противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа человека и низким уровнем токсичности.

Таким образом в связи с изложенным выше были определены цели настоящей работы:

- на основе предварительного анализа QSAR провести молекулярный дизайн, синтез и биологический скрининг ряда производных гетероциклических соединений – потенциально эффективных противогриппозных агентов;

- выявить основные структурные факторы, определяющие противогриппозную активность исследуемых гетероциклических соединений.

На первом этапе перед определением противовирусной активности соединений в отношении вирусов гриппа человека определяли уровень их токсичности на клеточных культурах, на которых в дальнейшем изучали противогриппозную активность исследуемых препаратов: тканевой культуре хорион-аллантаоисных оболочек (ХАО) 11–14-дневных куриных эмбрионов и перевиваемой культуре клеток Madin-Darby Canine Kidney (MDCK).¹⁵ Максимально переносимой концентрацией (МПК) соединений на тканевой культуре ХАО была такая концентрация вещества, которая вызывала

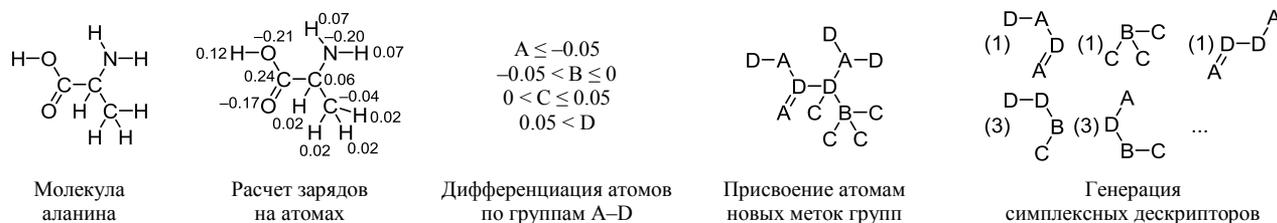


Рисунок 1. Пример генерации симплексных дескрипторов для молекулы аланина с учетом зарядов на атомах. Цифра в скобках обозначает количество фрагментов данного типа.

гибель меньше 50% клеток ХАО. МПК на перевиваемой культуре клеток MDCK составляло такое количество препарата, которое вызывало цитопатическую дегенерацию менее 50% клеток. В дальнейшем противогриппозную активность соединений исследовали только в тех концентрациях, которые не оказывали токсического действия на клеточные культуры.

Противогриппозную активность соединений в отношении штаммов вируса гриппа человека А/Гонконг/1/68 (H3N2) и А/Puerto Rico/8/34 (H1N1) определяли с использованием тканевой культуры ХАО и перевиваемой культуры клеток MDCK.¹⁵

В данной работе для решения задач QSAR использовался симплексный метод представления молекулярной структуры, суть которого состоит в том, что каждая молекула представляется в виде системы различных симплексов – четырехатомных молекулярных фрагментов фиксированного состава и строения. Данный метод подробно описан^{16–19} и хорошо себя зарекомендовал при решении ряда различных задач QSAR, в том числе и для исследования противовирусной активности.^{16,20} На топологическом (2D) уровне учитываются связность атомов в симплексе, тип атомов и природа связи (одинарная, двойная, тройная, ароматическая). Алгоритм расчета молекулярных дескрипторов заключается в реализации следующих этапов:

- разделение молекул на симплексы (наряду с симплексами возможно использование меньших фрагментов – пар, троек);

- присвоение меток вершинам симплексов, соответствующих природе атома, либо величине различных физико-химических свойств (электроотрицательности, рефракции, параметрам потенциала Леннарда–Джонса 6-12, частичным зарядам на атомах, способности атома быть донором/акцептором водородной связи);

- взвешивание вершин симплексов согласно различным физико-химическим свойствам (электроотрицательность, рефракция, параметры потенциала Леннарда–Джонса 6-12,²¹ частичные заряды на атомах оцененные методом выравнивания электроотрицательностей,^{22,23} способность атома быть донором/акцептором водородной связи);

- генерация симплексных дескрипторов, представляющих собой количество симплексов определенного типа. Количество дескрипторов может быть достаточно велико и зависит от структурного разнообразия исследуемых соединений. Например, генерация дескрипторов для молекулы аланина с учетом зарядов на атомах

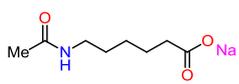
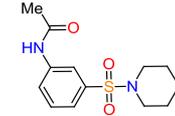
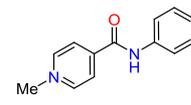
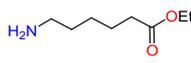
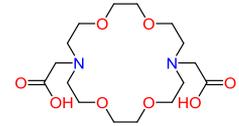
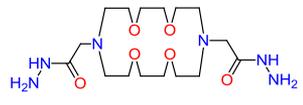
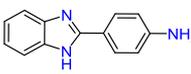
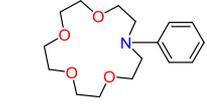
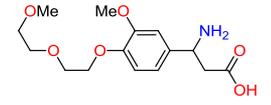
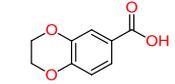
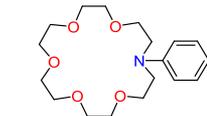
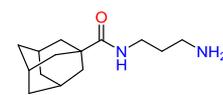
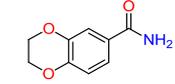
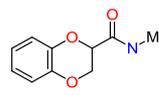
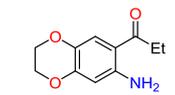
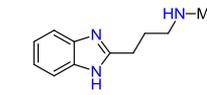
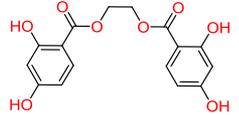
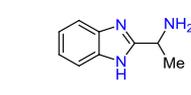
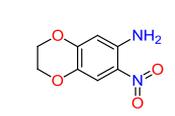
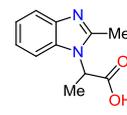
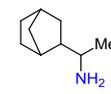
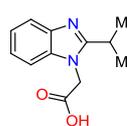
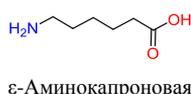
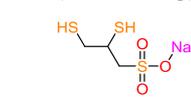
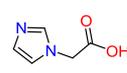
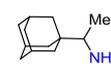
представлена на рис. 1. По существу, такая схема структурного описания молекул представляет собой симбиоз фрагментных и физико-химических дескрипторов.

Для построения моделей связи структура–активность использовался метод частичных наименьших квадратов (метод PLS),²⁴ хорошо зарекомендовавший себя при работе с большим количеством структурных параметров. Этот метод основан на преобразовании большого количества структурных параметров в небольшое число скрытых (латентных) переменных. Хотя этот метод и может использоваться без отбора структурных параметров,²⁵ использование различных методов выбора переменных в PLS^{26–28} позволяет отсеять "информационный шум", тем самым увеличив адекватность моделей (устойчивость и прогностическую способность). В связи с вышесказанным исключение взаимно коррелирующих и постоянных параметров, генетический алгоритм, процедура тренд-вектора и метод автоматического выбора переменных использовались для поиска оптимального набора структурных параметров в PLS.¹⁶

На основе экспериментальных данных^{29–31} о подавлении репродукции вируса гриппа для штамма А/Puerto Rico/8/34 (H1N1) на тканевой культуре ХАО (выраженной как десятичный логарифм 50% тканевой инфицирующей дозы вируса (lgТИД₅₀)) для обучающей выборки (табл. 1), состоящей из 35 соединений, 8 из которых являются известными противовирусными препаратами, а 26 являются производными гетероциклических соединений, были проведены исследования QSAR.

В результате отбора дескрипторов была получена модель QSAR, содержащая 84 симплексных параметра, со следующими статистическими характеристиками: коэффициент детерминации R^2 0.86; коэффициент детерминации в условиях скользящего контроля Q^2 0.78; среднеквадратичная ошибка прогноза для тестовой выборки S 0.51. Прогностическая способность модели проверялась на 5 различных тестовых выборках, в каждую из которых входило 7 соединений (20% от общего объема выборки). Таким образом, каждое соединение хотя бы один раз побывало в тестовой выборке. Коэффициент детерминации $R^2_{\text{тест}}$ для таких тестовых выборок изменялся в диапазоне от 0.68 до 0.85, то есть модель показала высокую устойчивость и хорошую прогнозирующую способность. В этом нет ничего удивительного, так как симплексные дескрипторы хорошо зарекомендовали себя ранее в работе с

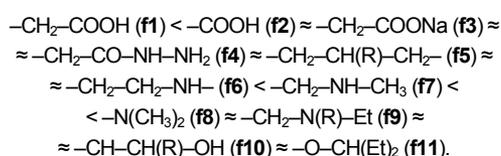
Таблица 1. Подавление репродукции вируса гриппа штамма A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) на тканевой культуре ХАО

Соединение	Структура	IgТИД ₅₀	Соединение	Структура	IgТИД ₅₀	Соединение	Структура	IgТИД ₅₀
1	 Ацеминаг натрия	0.17	13*	 13*	1.58	25	 Рибавирин	4.17
2*	 Амизон	1.50	14*	 14*	1.42	26	 26	1.08
3	 3	-0.33	15	 15	2.67	27	 27	0.42
4	 4	1.33	16*	 16*	0.83	28	 28	-0.25
5	 5	3.17	17*	 17*	0.75	29	 29	3.25
6	 6	0.50	18	 18	-0.33	30	 30	0.75
7	 7	3.17	19	 19	2.83	31	 31	1.08
8*	 8*	0.50	20	 20	-0.25	32	 32	4,00
9	 9	-0.58	21	 21	0.25	33	 33	4.08
10	 10	0.00	22	 22 Дейтифорин	3.42	34	 34 Тамифлю (озельтамивир)	4.17
11	 11	-0.50	23	 23 ε-Аминокапроновая кислота	0.33	35	 35 Унитиол	0.42
12	 12	0.25	24*	 24* Римантадин	3.50			

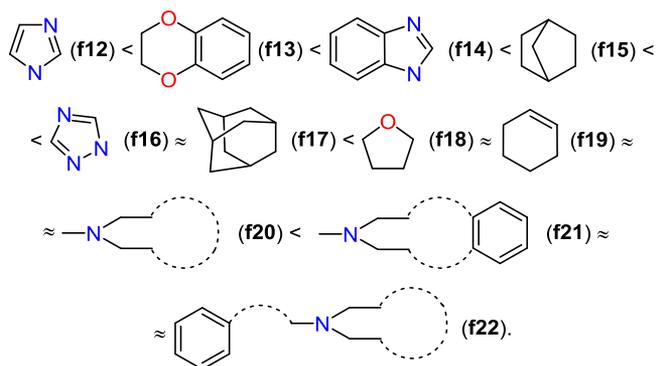
* Соединение тестовой выборки.

выборками разнородных соединений.¹⁶ Анализ физико-химических характеристик модели QSAR показал, что наибольший вклад в изменение активности внесли фрагменты структуры (молекулярные симплексы), учитывающие тип атома (38%), заряды на атомах (26%) и липофильность атомов (21%).

В рамках симплексного представления молекулярной структуры достаточно легко решить обратную задачу (интерпретация модели QSAR). Вклад каждого атома в молекулу может быть определен как отношение суммы регрессионных коэффициентов всех симплексов, содержащих данный атом, к количеству атомов в симплексе.¹⁵ Мы проанализировали отдельно влияние ациклических фрагментов на исследуемую активность гетероциклов или их фрагментов. В результате удалось определить, что ациклические фрагменты **f1**–**f11** можно расположить в следующий ряд по увеличению их влияния на активность:



Циклические же фрагменты **f12**–**f22** по увеличению их влияния на активность образуют следующий ряд:



По расположению фрагментов видно, что в наибольшей степени способствуют проявлению активности заместители, содержащие гидроксильные, алкоксильные и аминные группы (фрагменты **f5**–**f11**). В ряд циклических фрагментов, как и следовало ожидать, попали фрагменты известных противовирусных препаратов – дейтифорина (**f15**), римантадина (**f17**), рибавирина (**f16**, **f18**), озельтамивира (**f19**). Влияние изоиндолиновой, бензимидазольной и фенильной групп существенно зависит от их окружения, причем заместители, уменьшающие электронную плотность на бензольном цикле ($-\text{NO}_2$, $-\text{COOH}$) в целом увеличивают активность, сочетание ароматических фрагментов с 2-изоиндолином также дает увеличение активности, сочетание триазольного цикла с карбоксамидом (в рибавирине) дает существенное увеличение активности. Следует отметить, что наибольшее влияние на противогриппозную активность оказывает наличие в циклическом фрагменте третичного аминного азота в различных сочетаниях с фенильным ядром (фрагменты **f20**–**f22**).

Далее модель QSAR использовалась для виртуального (внеэкспериментального) скрининга различных гетероциклических соединений (более 500 молекул). По результатам скрининга был отобран ряд соединений – потенциальных противовирусных агентов с учетом их растворимости в воде и отсутствия возможной мутагенности (тест Эймса).³² Последняя оценивалась с помощью разработанной ранее экспертной системы.³³ Для некоторых из перспективных соединений с учетом их доступности проведен целенаправленный синтез и последующий биологический скрининг. В качестве препарата сравнения при проведении экспериментальных исследований использовали препарат Тамифлю фирмы-производителя "Рош" (Швейцария), международное название – озельтамивир. Результаты противовирусной активности исследуемых соединений в конечной концентрации 1 ммоль/л в отношении всех исследуемых штаммов вируса гриппа с использованием тканевой культуры ХАО приведены в табл. 2.

Таблица 2. Подавление репродукции вирусов гриппа штаммов А/Гонконг/1/68 (H3N2) и А/Puerto Rico/8/34 (H1N1) на тканевой культуре ХАО

Соединение	Формула	Прогноз активности H1N1, в lgТИД ₅₀	Подавление репродукции вируса, lgТИД ₅₀	
			H1N1	H3N2
36		1.85	0.00	0.25 ± 0.12
37		1.77	1.98 ± 0.33	0.00
38		2.55	1.92 ± 0.4	0.00
39		1.05	0.67 ± 0.17	0.33 ± 0.12
40		0.89	-0.42 ± 0.13	0.00
41		3.29	3.58 ± 0.36	1.00 ± 0.26
34 Тамифлю (озельтамивир)		3.71	4.17 ± 0.1	4.17 ± 0.1

Как видно по табл. 2, в большинстве случаев результаты прогноза и эксперимента неплохо согласуются в отношении вируса гриппа А/Puerto Rico/8/34 (H1N1). По отношению к вирусу гриппа А/Гонконг/1/68 (H3N2) практически все эти соединения (кроме соединения **41**) оказались неактивными. Очевидно, что поиск перспективных агентов против вируса гриппа H3N2 требует отдельного специального исследования.

Таким образом, наиболее перспективными соединениями в качестве антивирусных агентов в отношении штамма вируса гриппа H1N1 оказались 1,4- и 3,4-дизамещенные пиперазины **37**, **38**, а также 1-бензил-5-аминоизоиндоллин (**41**).

Для дальнейшего исследования на модели перевиваемой культуры клеток MDCK в первую очередь были отобраны соединения с низким уровнем токсичности на этой модели и те, которые проявили противовирусную активность в отношении вирусов гриппа человека. Их противогриппозную активность определяли в минимальной активной концентрации (МАК). Предварительное определение МПК соединений позволило рассчитать показатели химиотерапевтического индекса (ХТИ), который является соотношением МПК/МАК. Таким образом, для исследования были отобраны соединения **37–39**, **41** (табл. 3).

Наименьший уровень противовирусной активности был у соединения **39**, что было ожидаемо, поскольку данное соединение имело невысокий уровень противогриппозной активности на тканевой модели ХАО. Соединения **37**, **38** и **41** проявляли уровень противовирусной активности близкий к уровню препарата сравнения Тамифлю (озельтамивир) как в показателях подавления репродукции вируса гриппа, так и по показателям ХТИ.

Таким образом, благодаря проведенным исследованиям QSAR, удалось построить вполне адекватные модели структура – противогриппозная активность, обладающие удовлетворительной прогнозирующей способностью. Проведен виртуальный скрининг более полутысячи соединений – потенциальных антивирусных агентов. Структурная интерпретация моделей QSAR позволила выявить основные фрагменты молекул, определяющие противогриппозную активность. В результате обобщения полученной информации

Таблица 3. Максимально переносимая концентрация (МПК), минимальная активная концентрация (МАК) и химиотерапевтический индекс (ХТИ) потенциальных противовирусных агентов

Соединение	МПК (в ммоль/л)	МАК (в ммоль/л)	ХТИ
37	8	4	2
38	1	1	1
39	2	2	1
41	1	0.5	2
34	1	0.5	2
Тамифлю (озельтамивир)			

отобран ряд синтетически доступных перспективных соединений, обладающих необходимым уровнем растворимости в воде и с высокой вероятностью не мутагенных. Эти соединения были целенаправленно синтезированы, и для большинства из них уровень прогнозируемой активности подтвердился. Были отобраны наиболее перспективные соединения: 3-метилпиперидин-4-ол, 1-бензил-4-хлорпиперидин и 2-бензил-2,3-дигидро-1*H*-изоиндол-5-амин, у которых достаточно высокий уровень противогриппозной активности и химико-терапевтического индекса. Все это позволяет считать эти соединения потенциально эффективными антигриппозными агентами и определяет целесообразность их дальнейших исследований на животных моделях.

Экспериментальная часть

Контроль за индивидуальностью синтезированных соединений осуществлен методом ТСХ на пластинах Kieselgel 60 F254 (Merck), очистка – перегонкой при пониженном давлении, методом кристаллизации или колоночной хроматографией на силикагеле (Kieselgel 60 0.063–0.100 mm, Merck). Чистота соединений определена методом ВЭЖХ с использованием хроматографической системы SHIMADZU (контролер системы CBM-20A; вакуумный дегазатор DGU-20 A5; насос высокого давления LC-20AD UFLC, оснащенный 4-канальным градиентным блоком на низком давлении; термостат колонок СТО-20А; диодно-матричный детектор SPD-M20A), оснащенной колонкой Acclaim PolarAdvantage II 3 μm (4.6 × 150 мм) с Guard-картриджем, ручным инжектором с петлей на 10 мкл. Подвижная фаза MeCN (30%) и 0.1% раствор трифторуксусной кислоты в деионизированной воде (70%). Скорость потока подвижной фазы 1.0 мл/мин. Объем впрыска 10 мкл. Температура в термостате 20 °С. Диапазон сканирования УФ спектра 190–400 нм. Чистота синтезированных соединений по данным ВЭЖХ – не менее 98.5%.

Синтез гетероциклических соединений, предварительно сконструированных методами QSAR, для изучения противовирусной активности (табл. 2) осуществлен описанными в литературе методами: 1-бензилпиперазин (**36**) – алкилированием безводного пиперазина бензилхлоридом в безводном хлороформе;³⁴ 3-метилпиперидин-4-ол (**37**) – каталитическим восстановлением соответствующего бензилпроизводного на 10% Pd/C в метаноле;³⁵ 1-бензил-4-хлорпиперидин (**38**) – взаимодействием 1-бензил-4-гидроксипиперидина с тионилхлоридом;³⁶ (6-нитро-1-оксо-1,3-дигидро-2*H*-изоиндол-2-ил)уксусная кислота (**39**) – нитрованием HNO₃ в H₂SO₄ изоиндолуксусной кислоты, предварительно полученной восстановлением фталилглицина амальгамой цинка в HCl;³⁷ 2,2'-пиперазин-1,4-диилдиэтанамин (**40**) – гидразиолизом соответствующего 1,4-дифталиimidного производного пиперазина в этаноле;³⁸ 2-бензил-2,3-дигидро-1*H*-изоиндол-5-амин (**41**) – восстановлением нитрогруппы в 2-бензил-2,3-дигидро-5-нитро-1*H*-изоиндоле на палладиевом катализаторе (10% Pd/C) в метаноле.³⁹ Спектральные харак-

теристики и физические константы всех синтезированных соединений соответствуют приведенным в литературе.

Для определения противовирусной активности исследуемые соединения растворяют в ДМСО (конечная концентрация 10 мг/мл), а затем в поддерживающей питательной среде в конечной концентрации 1 ммоль/л. После доведения pH полученного раствора до физиологического оптимума (pH 7.2–7.4) его используют для определения противогриппозной активности растворенных соединений.

Вирусосодержащую аллантоисную жидкость с предварительно определенным инфекционным титром вируса разводят на поддерживающей питательной среде, в которую добавляют (опыт) или не добавляют (контроль) исследуемое соединение. Прикрепленные к скорлупе куриных эмбрионов фрагменты ХАО помещают в лунки полистироловых панелей и инфицируют при внесении различных разведений вирусосодержащей жидкости не ниже 100 ТИД₅₀. После 24 ч инкубирования в термостате при 37 °С отдельно объединяют как контрольные, так и опытные образцы и в них определяют титр инфекционного вируса. Таким методом определяют наибольшее разведение, в котором еще присутствует вирус, способный размножиться. С этой целью десятикратными разведениями отдельно объединенных контрольных и опытных образцов инфицируют фрагменты новых ХАО, размещенных в лунках полистироловых панелей. Панели выдерживают в термостате 48 ч при температуре 37 °С. После термостатирования определяют наличие вируса в лунках в реакции геммагглютинации (РГА) с 1% взвесью куриных эритроцитов.¹⁵

Оценку противовирусной активности синтезированных соединений в нетоксических дозах в отношении вируса гриппа человека А/Гонконг/1/68 (H3N2) и А/Puerto Rico/8/34 (H1N1) проводят также с использованием метода торможения развития вирусиндуцированного цитопатического эффекта на перевиваемой монослойной клеточной культуре MDCK.¹⁵ Культуру клеток MDCK предварительно выращивают на протяжении 24 ч в 96-луночных планшетах, дважды отмыают от ростовой среды раствором Хенкса. Исследуемые соединения растворяют в ДМСО (конечная концентрация 1 мг/мл), а затем на поддерживающей среде DMEM. В лунки, в которых находится монослой культуры клеток, вносят серийные десятикратные разведения вирусосодержащей жидкости на среде DMEM, которые содержат (опыт) или не содержат (контроль) исследуемое соединение. Оценивание противовирусной активности проводят после 48 ч инкубирования в термостате при 37 °С по наличию вирусиндуцированного цитопатического действия с использованием интравертированного микроскопа Leica DM IL.

Расчет ТИД₅₀ в экспериментах *in vitro* проводят методом Кербера в модификации Ашмарина по формуле:³²

$$\lg \text{ТИД}_{50} = L - d(S - 0.5),$$

где L – начальное разведение в опыте; d – разница между \lg последовательных разведений; S – сумма про-

порций тест-объектов, которые дали положительный результат (агглютинацию или цитопатическое действие).

Статистическую значимость результатов определяют по непараметрическому критерию знаков для связанных выборок.⁴⁰

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Украинского научно-технологического центра в рамках партнерского проекта № P407 (США, GIPP) и проекта № 6385.

Список литературы

- Dawood, F. S.; Jain, S.; Finelli, L.; Shaw, M. W.; Lindstrom, S.; Garten, R. J.; Gubareva, L. V.; Xu, X.; Bridges, C. B.; Uyeki, T. M. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 2605.
- (а) Ершов, Ф. И. *Антивирусные препараты*; Гэотар-Медиа: Москва, 2006, 2-е изд. (б) Ершов, Ф. И.; Романцов, М. Г. *Лекарственные средства, применяемые при вирусных заболеваниях*; Гэотар-Медиа: Москва, 2007.
- Шибнеев, В. А.; Гараев, Т. М.; Финогенова, М. П.; Калинина, Л. Б.; Носик, Д. Н. *Вопросы вирусологии* **2015**, *60*(2), 35.
- Zhou, J.; Wang, Y.; Chang, Q.; Ma, P.; Hu, Y.; Cao, X. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *51*, 173. DOI: 10.1159/000495172
- Романцов, М. Г.; Шульдяков, А. А.; Ершов, Ф. И.; Коваленко, А. Л. *Профілактична медицина* **2013**, (1–2), 77.
- Tejaro, J. R. *Curr. Opin. Virol.* **2016**, *16*, 31.
- Гридіна, Т. Л. *Одес. мед. журн.* **2015**, (5), 76.
- Andersen, J. H.; Jenssen, H.; Thompson, K. D.; Gutteberg, T. J. *Antivir. Res.* **2002**, *53*(3), A54.
- Gong, Y.; Roberts, R.; Gadawski, I.; Cheung, D.; Tam, T.; Sacks, S. L. *Antivir. Res.* **2002**, *53*(3), A55.
- Zarubaev, V. V.; Garshinina, A. V.; Tretiak, T. S.; Fedorova, V. A.; Shtro, A. A.; Sokolova, A. S.; Yarovaya, O. I.; Salakhtudinov, N. F. *Antivir. Res.* **2015**, *120*, 126.
- Тихонова, Е. П.; Кузьмина, Т. Ю.; Анисимова, А. А.; Калинина, Ю. С. *Эксперим. и клин. фармакол.* **2018**, *81*(9), 21.
- Naumenko, K.; Zagorodnya, S.; Golovan, A.; Kovtyn, V. *J. Adv. Biol.* **2016**, *9*, 1896.
- Перцева, Т. А.; Киреева, Т. В.; Черкасова, А. В.; Братусь, Е. В. *Український медичний часопис* **2012**, (5), 67.
- Cherkasov, A.; Muratov, E. N.; Fourches, D.; Varnek, A.; Baskin, I. I.; Cronin, M.; Dearden, J.; Gramatica, P.; Martin, Y. C.; Todeschini, R.; Consonni, V.; Kuz'min, V. E.; Cramer, R.; Benigni, R.; Yang, C.; Rathman, J.; Terflath, L.; Gasteiger, J.; Richard, A.; Tropsha, A. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 4977.
- Доклинічні дослідження лікарських засобів: методическі рекомендації*; Стефанов, А. В.; Ред.; Авіцена: Київ, 2002.
- Artemenko, A.; Muratov, E. *J. Comp-Aid Mol Des.* **2008**, *22*, 403.
- Kuz'min, V.; Artemenko, A. G.; Muratov, E. N.; Ognichenko, L. N.; Hromov, A. I.; Liahovsky, A. V.; Polischuk, P. G. In *National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH*; Georgiev, V. St.; Western, K.; McGowan, J. J., Eds.; Humana Press Inc.: Totowa, 2008, vol. 1, p. 163
- Kuz'min, V. E.; Artemenko, A. G.; Muratov, E. N.; Polischuk, P. G.; Ognichenko, L. N.; Liahovsky, A. V.; Hromov, A. I.; Varlamova, E. V. In *Recent Advances in QSAR Studies*; Puzyn, T.; Leszczynski, J.; Cronin, M. T., Eds.; Springer: London, 2010, p. 127.

19. Polischuk, P.; Mokshina, E.; Kosinskaja, A.; Muats, A.; Kulinsky, M.; Tinkov, O.; Ognichenko, L.; Khristova, T.; Artemenko, A.; Kuz'min, V. In *Advances in QSAR modeling: Applications in Pharmaceutical, Chemical, Food, Agricultural and Environmental Sciences*; Kunal, R., Ed.; Springer: Cham, 2017, p. 107.
20. Muratov, E. N.; Artemenko, A. G.; Varlamova, E. V.; Polischuk, P. G.; Lozitsky, V. P.; Fedchuk, A. S.; Lozitska, R. L.; Gridina, T. L.; Koroleva, L. S.; Sil'nikov, V. N.; Galabov, A. S.; Makarov, V. A.; Riabova, O. B.; Wutzler, P.; Schmidtke, M.; Kuz'min, V. E. *Future Med. Chem.* **2010**, 2, 1205.
21. Rappe, A. K.; Casewit, C. J.; Colwell, K. S.; Goddard, W. A., III; Skiff, W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 10024
22. Jolly, W. L.; Perry, W. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 5442
23. Кузьмин, В. Е.; Берестецкая, Е. Л. *Журн. структур. химии* **1983**, 24, 187
24. Rännar, S.; Lindgren, F.; Geladi, P.; Wold, S. *J. Chemometrics* **1994**, 8, 111.
25. Cramer, R. D.; Patterson, D. I.; Bunce, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 5959.
26. Lindgren, F.; Geladi, P.; Rännar, S.; Wold, S. *J. Chemom.* **1994**, 8, 349.
27. Kubinyi, H. *J. Chemom.* **1996**, 10, 119.
28. Hasegawa, K.; Miyashita, Y.; Funatsu, K. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1997**, 37, 306.
29. Гридина, Т. Л.; Радкевич, К. В.; Кольцова, И. Г.; Федчук, А. С.; Лозицкий, В. П.; Басок, С. С.; Артеменко, А. Г.; Кузьмин, В. С. *Biomed. Biosoc. Antropol.* **2016**, (26), 61.
30. Гридина, Т. Л.; Федчук, А. С.; Басок, С. С.; Шитикова, Л. И.; Грузевский, О. А.; Артеменко, А. Г.; Кузьмин, В. С. *Фармакол. та лікар. токсикол.* **2018**, (3), 16.
31. Гридина, Т. Л.; Федчук, А. С.; Шитикова, Л. И.; Кузьмин, В. С.; Артеменко, А. Г.; Басок, С. С.; Грузевский, О. А. *Ветеринар. біотехнол.* **2018**, 32(1), 85.
32. Ашмарин, И. П. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* **1959**, (2), 102.
33. Sushko, I.; Novotarskyi, S.; Körner, R.; Pandey, A. K.; Cherkasov, A.; Li, J.; Gramatica, P.; Hansen, K.; Schroeter, T.; Müller, K.-R.; Xi, L.; Liu, H.; Yao, X.; Öberg, T.; Hormozdiari, F.; Dao, P.; Sahinalp, C.; Todeschini, R.; Polischuk, P.; Artemenko, A.; Kuz'min, V.; Martin, T. M.; Young, D. M.; Fourches, D.; Muratov, E.; Tropsha, A.; Baskin, I.; Horvath, D.; Marcou, G.; Muller, C.; Varnek, A.; Prokopenko, V. V.; Tetko, I. V. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, 50, 2094.
34. Zhou, A.; Wu, H.; Pan, J.; Wang, X.; Li, J.; Wu, Z.; Hui, A. *Molecules* **2015**, 20, 1304
35. Jurica, E. A.; Hong, Z. WO Patent 2015171722
36. Jucker, E.; Schenker, E. CH Patent 463504; *Chem. Abstr.* **1969**, 70, 96631
37. Krysko, A. A.; Samoylenko, G. V.; Polischuk, P. G.; Andronati, S. A.; Kabanova, T. A.; Khristova, T. M.; Kuz'min, V. E.; Kabanov, V. M.; Krysko, O. L.; Varnek, A. A.; Grygorash, R. Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 5971.
38. (a) Kermack, W. O.; Smith, J. F. *J. Chem. Soc.* **1931**, 3096.
(b) Ganin, E. V.; Makarov, V. F.; Nikitin, V. I. *J. Org. Chem. USSR* **1987**, 23, 330. [*Журн. орган. химии* **1987**, 23, 370.]
39. Yatsunami, T.; Yazaki, A.; Inoue, S.; Yamamoto, H.; Yokomoto, M.; Nomiyama, J.; Noda, S. US Patent 5026856.
40. Гублер, Е. В.; Генкин, А. А. *Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях*; Медицина: Ленинград, 1973.