

УДК 577.113.3

НОВЫЕ №-ЗАМЕЩЕННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ АДЕНИНА С ВЫСОКОЙ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ РНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ

© 2025 г. А. А. Зенченко, Ю. Д. Семенова, Е. Р. Набережная, Я. Д. Гуменная,
А. В. Липатова, В. Е. Ословский*

Представлено академиком РАН С.Г. Георгиевой

Поступило 15.09.2024 г.

После доработки 20.09.2024 г.

Принято к публикации 25.09.2024 г.

В настоящей работе было выявлено два новых соединения, №-(4,5-диметоксифенил)аденин и №-(3,5-ди-трифторметилфенил)аденин, обладающие широким спектром противовирусного действия в отношении РНК-содержащих вирусов. Мы показали, что данные соединения проявляют выраженную противовирусную активность в отношении полиовируса человека 1, 2 и 3 типов, принадлежащих к энтеровирусам группы С. Оба соединения также демонстрировали выраженную противовирусную активность в отношении Коксаки вирусов В3, В5 и В6, принадлежащих к энтеровирусам группы В. Кроме того, соединения демонстрировали противовирусную активность в отношении вируса болезни Ньюкастла, принадлежащего к роду парамиксовирусов. Описанные в данной работе соединения в дальнейшем могут служить в качестве прототипов для создания новых противовирусных лекарственных препаратов, в отношении эпидемиологически значимых РНК-вирусов человека.

Ключевые слова: модифицированные производные пурина, противовирусная активность, РНК-вирусы, прототипы лекарственных средств

DOI: 10.31857/S2686738925010178, **EDN:** tcbjwc

Важным классом биологически активных соединений являются цитокинины и соответствующие цитокининовые нуклеозиды. Природные цитокинины – группа фитогормонов, по своей структуре представляющих собой №-замещенные производные аденина, играющие важную роль в процессе роста и развития растений [1]. Синтетические аналоги цитокининов и цитокининовых нуклеозидов обладают широким спектром биологической активности. В ряду этих соединений были найдены производные, проявляющие не только фитогормональную, но и противоопухолевую, противопаразитарную, антиоксидантную, нейропротекторную и другие виды активности [2, 3, 4]. Кроме того, ряд производных цитокининовых нуклеозидов демонстрируют активность в отношении РНК-содержащих вирусов [5, 6, 7].

РНК-содержащие вирусы представляют разнообразную группу, широко распространенную в качестве симбионтов у большинства млекопитающих,

некоторые из которых вызывают тяжелые заболевания с высокой контагиозностью. Ежегодно возникает потребность в создании новых противовирусных агентов в результате возникновения новых штаммов вирусов, устойчивых к клинически используемым противовирусным препаратам, а также быстрой генетической изменчивости, вследствие того, что РНК-вирусы имеют чрезвычайно высокую частоту мутаций [8, 9, 10], о чем, в частности, свидетельствует вспышка новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, которая в 2020 году приобрела характер пандемии.

Нуклеозиды и их аналоги являются важным классом соединений для разработки новых противовирусных лекарственных препаратов, на основе которых в настоящее время уже разработано более 100 лекарственных средств [11]. Липофильные (гидрофобные) производные нуклеозидов и нуклеиновых оснований могут рассматриваться в качестве перспективных соединений для получения новых прототипов лекарственных средств. В таких соединениях помимо способности гетероциклического основания и углеводного остатка образовывать водородные связи

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук, Москва*

*e-mail: vladimirovsky@gmail.com

с белками-мишенями существует возможность гидрофобного взаимодействия за счет наличия дополнительных гидрофобных остатков в молекуле (ароматических и алифатических фрагментов, остатков жирных кислот) [12].

Настоящая работа посвящена получению новых соединений в ряду аналогов природных цитокининов, обладающих высокой противовирусной активностью и низкой цитотоксичностью в отношении ряда эпидемиологически значимых РНК-вирусов человека, которые могут быть использованы в качестве прототипов новых противовирусных лекарственных средств, направленных на борьбу с известными и возникающими вирусными инфекциями.

В данной работе нами синтезированы и исследованы на противовирусную активность N⁶-(4,5-диметоксифенил)аденин (**2a**) и N⁶-(3,5-дифторметилфенил)аденин (**2b**) (рис. 1). Данные соединения представляют собой N⁶-замещенные производные аденина и являются близкими структурными аналогами природного цитокинина N⁶-бензиладенина (БА) [13].

Целевые соединения **2a,b** были получены реакцией аминирования 6-хлор-9-(β-D-рибофуранозил)-9Н-пурина (6-хлорпуририбозид) в присутствии N,N-диизопропилэтиламина (DIPEA) при нагревании (рис. 1). Преимуществом используемого метода является высокая региоселективность протекания реакции без использования защитных групп, что позволяет получать целевые соединения в одну стадию. Данный способ считается наиболее эффективным для получения аналогов цитокининов (N⁶-замещенных производных аденина) [14, 15]. Структура полученного соединения была подтверждена данными ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS).

Нами была исследована противовирусная активность синтезированных соединений **2a,b** на широкой панели РНК-содержащих вирусов человека, включающей: энтеровирусы А (Коксаки

вирус А7 (CVA7) – штамм ЖЭВ8, Коксаки вирус А9 (CVA9) – штамм Griggs), энтеровирусы В (Коксаки вирус В3 (CVB3) – штамм Nancy, Коксаки вирус В5 (CVB5) – штамм ЖЭВ14, Коксаки вирус В6 (CVB6) – штамм Schmitt, Эховирус 19 (ECHO19) – новый непатогенный штамм), энтеровирусы С (полиовирусы 1, 2 и 3 типа (PV1, PV2, PV3) – вакцинные штаммы Сэбин), рабдовирус (вирус везикулярного стоматита (VSV) – штамм Indiana), парамиксовирусы (вирус болезни Ньюкастла (NDV) – штамм Н2), вирус мышиноного парагриппа 1 типа (SeV) – штамм Сендай). В качестве контроля использовали известный противовирусный препарат Рибавирин (RBV).

Цитотоксичность тестируемых соединений изучалась путем анализа жизнеспособности клеток с использованием аламарового синего (резазурина). Для этого клетки чувствительной к вирусам культуры НЕК293Т с делецией гена IFNAR1 (далее НЕК293Т) высевали в 96-луночные планшеты в количестве 10 000 клеток на лунку, на следующий день обрабатывались различными концентрациями исследуемых соединений (двукратными разведениями) в полной культуральной среде и инкубировались при 37°C и 5% CO₂ в течение 48 часов. После инкубации культуральную среду удаляли, в лунки планшета вносили раствор резазурина и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 4 часов. Оценку жизнеспособности проводили путем определения флуоресценции на планшетном ридере (λ_{ex}/λ_{em} – 544/590 нм). Цитотоксичность определяли как уменьшение интенсивности флуоресценции относительного контрольных образцов, а СС₅₀ рассчитывали по методу Рида и Менча [16]. Каждое соединение испытывали как минимум в трех технических повторностях в трех независимых экспериментах.

Оценка противовирусных свойств соединений проводилась путем титрования исследуемого вируса методом конечных разведений на культуре НЕК293Т при различных множественностях инфекции (10, 1,

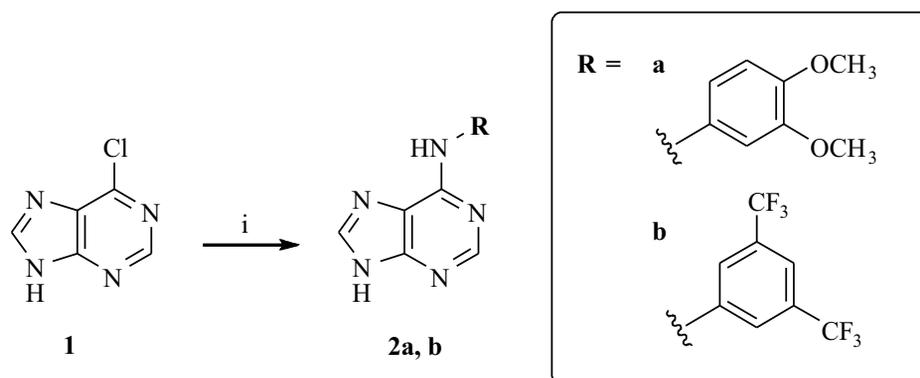


Рис. 1. Синтез N⁶-(4,5-диметоксифенил)аденина (**2a**) и N⁶-(3,5-дифторметилфенил)аденина (**2b**). Реагенты и условия: i. R-NH₂, DIPEA, *n*-BuOH, 90°C, 8 ч, выход 75 % для **2a** и 68% для **2b**.

0.1, 0.01, 0.001, и 0.0001, что соответствовало количеству вирусных частиц $2 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^2$, 20 и 2 БОЕ на лунку) в формате 96 луночных планшетов спустя 48 часов после инфекции в 4 технических повторностях. Широкий диапазон множественностей инфекции был взят для получения детальной информации о максимально возможной эффективности ингибирования вирусной активности при использовании нетоксичных концентраций соединений. Оценивали жизнеспособность клеток с помощью резазурина. Рассчитывали концентрацию веществ, обеспечивающих 50% ингибирование вирус-индуцированного цитопатического действия (EC_{50}) после нормирования значений сигнала на незараженные, но обработанные соединениями контрольные образцы (рис. 2) [16].

Изучение цитотоксичности показало, что соединения **2a** и **2b** не проявляли токсичность на культуре НЕК293Т в микромолярных концентрациях. Концентрация соединений, при которой наблюдался токсический эффект на клетки, составляла 1,2 мМ для **2a** и 0.5 мМ для **2b**.

В результате биологических испытаний было показано, что исследуемые соединения **2a,b** демонстрировали высокую противовирусную активность,

превышающую активность рибавирина, в отношении полиовирусов PV1, PV2 и PV3, принадлежащих к виду энтеровирус С, при этом наибольшую активность ($EC_{50} = 1 \mu M$) оба соединения демонстрировали в отношении PV1.

Также данные соединения оказались активными в отношении Коксаки вируса CVA7, принадлежащего к виду энтеровирусов А. При этом в отношении Коксаки вируса CVA9, также принадлежащего к энтеровирусам А, слабую активность ($EC_{50} \approx 50 \mu M$) проявляло только соединение **2b**, тогда как **2a** оказалось неактивным ($EC_{50} > 100 \mu M$).

В отношении Коксаки вирусов CVB3, CVB5, CVB6, принадлежащих к виду энтеровирусов В, оба исследуемых соединения демонстрировали выраженную противовирусную активность ($EC_{50} = 1-15 \mu M$), причем наиболее активным в отношении CVB5 и CVB6 оказалось соединение **2a**, тогда как соединение **2b** оказалось более активным в отношении CVB3. В отношении эховируса ECHO19, также принадлежащего к виду энтеровирусов В, оба соединения проявляли слабую противовирусную активность.

В результате испытаний противовирусной активности в отношении представителей других

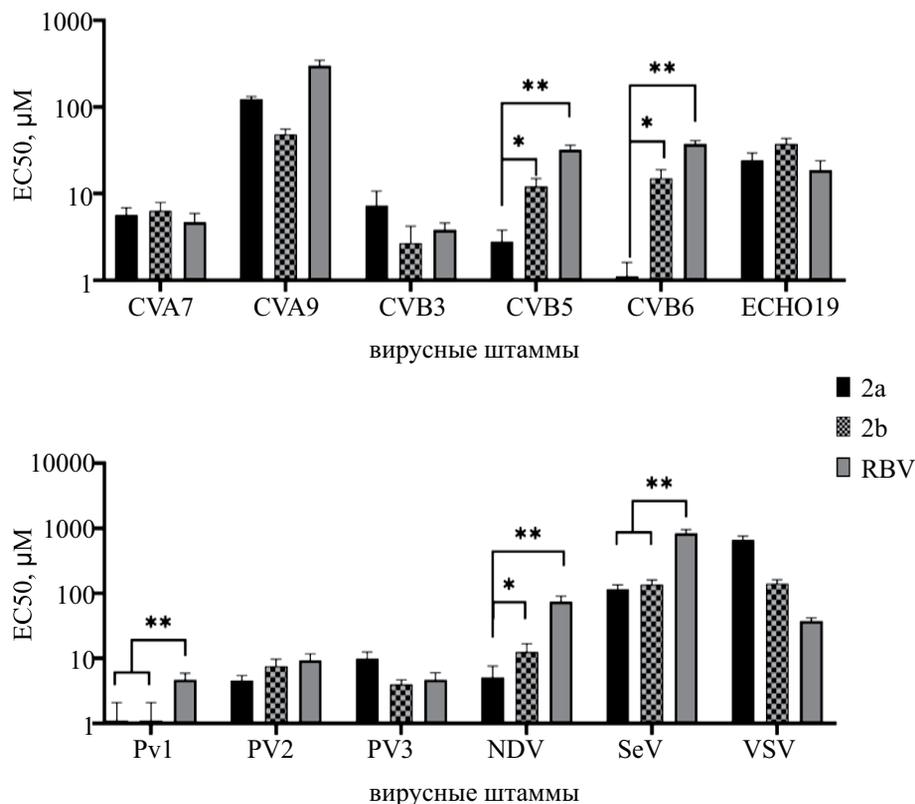


Рис. 2. Противовирусные свойства соединений **2a,b**. EC_{50} – концентрация веществ (μM), обеспечивающих 50% ингибирование вирус-индуцированного цитопатического действия различных РНК-содержащих вирусов на клетках линии НЕК293Т спустя 48 часов после инфекции. Все данные представляют собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM) по крайней мере для 3 биологических повторений. * – p -value < 0,05, ** – p -value < 0,01.

семейств РНК-вирусов было показано, что исследуемые соединения оказались полностью неактивными в отношении вируса везикулярного стоматита (VSV), принадлежащего к роду рабдовирусов, и в отношении вируса мышинного парагриппа 1 типа (SeV), принадлежащего к роду парамиксовирусов. С другой стороны, оба соединения **2a,b** продемонстрировали активность в отношении вируса болезни Ньюкастла (NDV), также принадлежащего к роду парамиксовирусов. При этом **2a** оказалось более активным (EC₅₀ = 5 μM) по сравнению с **2b** (EC₅₀ = 12 μM).

Из полученных данных видно, что противовирусная активность соединений в отношении близких серотипов вирусов внутри одного вида может заметно отличаться. Известно, что модифицированные нуклеиновые основания и нуклеозидные аналоги могут служить в качестве противовирусных агентов, действуя как ингибиторы синтеза вирусной РНК. Такие соединения имитируют естественные субстраты вирусной полимеразы, что может привести к ошибкам во время репликации вирусного генома и повышению частоты мутаций (летальный мутагенез) [17, 18, 19]. Важно отметить, что несмотря на схожесть серотипов, которая определяется высокой гомологией структурных белков вирусов, РНК-зависимая РНК-полимераза вируса, являющаяся потенциальной мишенью для исследуемых соединений, может существенно отличаться в пределах одной группы вирусов [20].

Из полученных данных можно сделать вывод о том, что N⁶-замещенные производные аденина (аналоги природных цитокининов) являются важной группой соединений для поиска новых биологически активных соединений, обладающих выраженной противовирусной активностью в отношении представителей РНК-вирусов человека, принадлежащих к различным родам и видам. При этом наиболее выраженную активность производные цитокининов проявляют в отношении рода энтеровирусов. На основе полученных в данной работе соединений-лидеров планируется дальнейшая оптимизация их структуры с целью расширения библиотеки биологически активных N⁶-замещенных производных аденина и аденозина, а также изучение механизма противовирусного действия данной группы соединений. Соединения-лидеры, обладающие высокой противовирусной активностью и низкой цитотоксичностью, в дальнейшем могут служить прототипами для создания новых противовирусных лекарственных препаратов, направленных на лечение социально значимых инфекционных заболеваний, вызванных РНК-вирусами человека.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 23-24-00527.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не имеют конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Romanov, G.A.*, How do cytokinins affect the cell? *Rus. J. Plant Physiol.*, 2009, Vol. 56, P. 268–290.
2. *Fathy, M., Saad Eldin, S.M., Naseem, M.*, et al., Cytokinins: Wide-Spread Signaling Hormones from Plants to Humans with High Medical Potential, *Nutrients*. 2022, Vol. 14, P. 1495.
3. *Drenichev, M.S., Oslovsky, V.E., Mikhailov, S.N.*, Cytokinin Nucleosides – Natural Compounds with a Unique Spectrum of Biological Activities, *Curr. Top. Med. Chem.* 2016, Vol. 16, P. 2562–2576.
4. *Oshchepkov, M.S., Kalistratova, A.V., Savelieva, E.M.*, et al., Natural and synthetic cytokinins and their applications in biotechnology, agrochemistry and medicine, *Russ. Chem. Rev.* 2020, Vol. 89, P. 787.
5. *Salerno, M., Varricchio, C., Bevilacqua, F.*, et al., Rational design of novel nucleoside analogues reveals potent antiviral agents for EV71. *Eur. J. Med. Chem.* 2023, Vol. 246, P. 114942.
6. *Drenichev, M.S., Oslovsky, V.E., Sun, L.*, et al., Modification of the length and structure of the linker of N⁶-benzyladenosine modulates its selective antiviral activity against enterovirus 71. *Eur. J. Med. Chem.* 2016, Vol. 111, P. 84–94.
7. *Graci, J.D., Too, K., Smidansky, E.D.*, et al., Lethal mutagenesis of picornaviruses with N-6-modified purine nucleoside analogues. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, Vol. 52, P. 971–979.
8. *Drake, J.W., Holland, J.J.*, Mutation rates among RNA viruses, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1999, Vol. 96, P. 13910–13913.
9. *Sanjuán, R., Nebot, M.R., Chirico, N.*, et al., Viral mutation rates, *J. Virol.* 2010, vol. 84, pp. 9733–9748.
10. *Zenchenko, A.A., Drenichev, M.S., Mikhailov, S.N.*, Nucleoside Inhibitors of Coronaviruses, *Curr. Med. Chem.* 2021, Vol. 28, P. 5284–5310.
11. *De Clercq, E., Li, G.*, Approved antiviral drugs over the past 50 years, *Clin. Microbiol. Rev.* 2016, Vol. 29, P. 695–747.
12. *Ertl, P., Jelfs, S., Muhlbacher, J.*, et al. Quest for the Rings. In *Silico Exploration of Ring Universe to Identify Novel Bioactive Heteroaromatic Scaffolds*, *J. Med. Chem.* 2006, Vol. 49, P. 4568–4573.
13. *Sakakibara, H.*, Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation, *Ann. Rev. Plant Biol.* 2006, Vol. 57, P. 431–449.

14. Doležal, K., Popa, I., Krystof, V., et al. Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells, *Bioorg. Med. Chem.* 2006, Vol. 14, P. 875–884.
15. Plihalova, L., Vylčilová, H., Doležal, K., et al., Synthesis of aromatic cytokinins for plant biotechnology. *New biotechnology.* 2016, Vol. 33, P. 614–624.
16. Reed, L.J., Muench, H., A simple method of estimating fifty per cent endpoints, *Am. J. Epidemiol.* 1938, Vol. 27, P. 493–497.
17. Qiu, L., Patterson, S.E., Bonnac, et al., Nucleobases and corresponding nucleosides display potent antiviral activities against dengue virus possibly through viral lethal mutagenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2018, Vol. 12, P. e0006421.
18. Zenchenko, A.A., Drenichev, M.S., Il'icheva, I.A., Mikhailov, S.N., Antiviral and antimicrobial nucleoside derivatives: structural features and mechanisms of action. *Mol. Biol.*, 2021, Vol. 55, P. 786–812.
19. Ramaswamy, K., Rashid, M., Ramasamy, S., et al., Revisiting viral RNA-dependent RNA polymerases: insights from recent structural studies. *Viruses*, 2022, Vol. 14, P. 2200. DOI:
20. Venkataraman, S., Prasad, B. V., Selvarajan, R., RNA dependent RNA polymerases: insights from structure, function and evolution. *Viruses*, 2018, Vol. 10(2), P. 76.

NEW N⁶-SUBSTITUTED ADENINE DERIVATIVES WITH HIGH ANTIVIRAL ACTIVITY AGAINST RNA-CONTAINING VIRUSES

**A. A. Zenchenko, Yu. D. Semenova, E. R. Naberezhnaya,
Ya. D. Gumennaya, A. V. Lipatova, V. E. Oslovsky***

Presented by Academician of the RAS S.G. Georgieva

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation
e-mail: vladimirosovsky@gmail.com*

In this work, two new compounds, N⁶-(4,5-dimethoxyphenyl)adenine and N⁶-(3,5-di-trifluoromethylphenyl)adenine, with a broad spectrum of antiviral activity against RNA viruses, were identified. We showed that these compounds exhibit pronounced antiviral activity against human poliovirus types 1, 2 and 3, belonging to enterovirus C species. Both compounds also demonstrated pronounced antiviral activity against Coxsackie viruses B3, B5 and B6, belonging to enterovirus B species. In addition, the compounds demonstrated antiviral activity against Newcastle disease virus, which belongs to the paramyxovirus genus. The compounds discovered in this work can subsequently serve as prototypes for the development of new antiviral drugs against epidemiologically significant human RNA viruses.

Keywords: Modified purine derivatives, antiviral activity, RNA viruses, drug prototypes