

# ПРОТИВОВИРУСНЫЙ АГЕНТ



ЯРОВАЯ ОЛЬГА ИВАНОВНА  
ДОКТОР ХИМИЧЕСКИХ НАУК,  
ВЕДУЩИЙ НАУЧНЫЙ СОТРУДНИК  
ЛАБОРАТОРИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ  
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НИОХ СО РАН.  
СПЕЦИАЛИСТ В ОБЛАСТИ МЕДИЦИНСКОЙ  
ХИМИИ, ХИМИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ СОЕ-  
ДИНЕНИЙ ТЕРПЕНОВОГО РЯДА,  
РАЗРАБОТКИ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК  
В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ.



ХАЗАНОВ ВЕНИАМИН АБРАМОВИЧ  
ДОКТОР МЕДИЦИНСКИХ НАУК,  
ПРОФЕССОР,  
ГЕНЕРАЛЬНЫЙ ДИРЕКТОР ООО «ИФАР».  
ФАРМАКОЛОГ, БИОХИМИК,  
ЭКСПЕРТ В ОБЛАСТИ РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВ  
С 40-ЛЕТНИМ ОПЫТОМ В ПРОФЕССИИ.



САЛАХУТДИНОВ НАРИМАН ФАРИДОВИЧ  
ЧЛЕН-КОРРЕСПОНДЕНТ РАН,  
ДОКТОР ХИМИЧЕСКИХ НАУК,  
ПРОФЕССОР,  
ЗАВЕДУЮЩИЙ ОТДЕЛОМ МЕДИЦИНСКОЙ  
ХИМИИ НИОХ СО РАН.

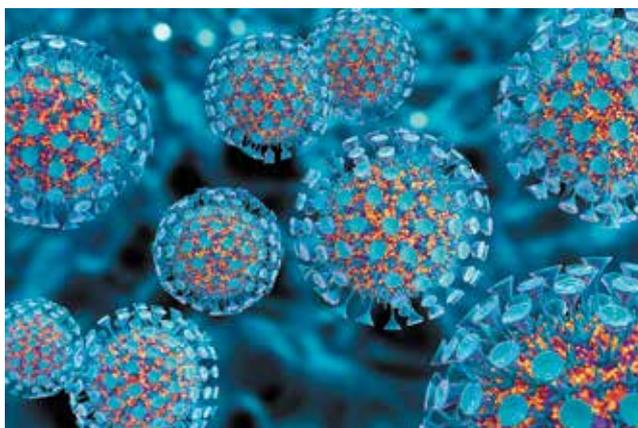
Поиск новых противовирусных агентов является одним из приоритетных направлений исследований в современной медицинской химии, что обусловлено распространением широкого спектра вирусных инфекций и появлением новых опасных вирусных болезней, вызываемыми патогенными штаммами, такими, например, как вирусы гриппа А H1N1, H3N2, H5N1. Так, несмотря на десятилетия напряжённой борьбы с применением как фармацевтических, так и нефармацевтических методов, каждый год сезонный грипп продолжает вызывать эпидемии по всему миру. основополагающие процессы эволюционной динамики вирусов сезонного гриппа находятся под пристальным вниманием учёных-вирусологов, однако, когда и как появляются новые штаммы вируса, остаётся в большей мере непредсказуемым.

Всё живое на нашей планете – люди, животные и растения – сосуществует совместно с вирусами. Количество обнаруженных видов вирусов растёт с каждым годом, и, несмотря на то, что на данный момент уже обнаружено более шести тысяч вирусов, современная вирусология считает, что их существует более ста миллионов. Вирусы обнаружены почти в каждой экосистеме на Земле, они являются самой многочисленной биологической формой. В последнее время самым распространённым словом на всех языках является пандемия или коронавирус. Политики, журналисты, люди всех профессий и даже пенсионеры рассуждают об этой болезни, её причинах.

Пандемия подвергла испытанию способность сообщества реагировать на новые вызовы, как на глобальном, так и уровне каждого государства. Вирус SARS-CoV-2 является новым эмерджентным патогеном, и многие вопросы, связанные с его изучением, остаются пока без ответа. В то же время с нами остались и другие вирусы, вызывающие разнообразные инфекционные заболевания. Так, совсем недавно, в 2018 году было сто лет, как мир настигла эпидемия гриппа. Пандемия 1918–1919 годов унесла жизни сотен миллионов людей по всему миру. Эта эпидемия была вызвана вирусом гриппа А H1N1, и данный штамм вируса всё так же является эпидемиологически опасным. По оценкам ВОЗ, ежегодные эпидемии гриппа поражают более 5% населения планеты, у 3–5 миллионов больных грипп приводит к тяжёлым осложнениям, 400–600 тысяч больных погибают. Возникшая в 2020 году пандемия родственной гриппу коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 дала по мировой статистике к марту 2021 года 123 млн заболевших, 70 млн выздоровевших и 2,7 млн смертей. Все выздоровевшие относятся к группе особого

риска для сезонных вирусных инфекций – гриппа и ОРВИ.

Для борьбы с вирусными заболеваниями человека существует несколько направлений. Первое – это предупреждение заболевания, в которое входит предупреждение распространения вируса (самоизоляция или использование масок в общественных местах) или предварительная вакцинация. Вакцинация, согласно стандартам ВОЗ, является первой и наиболее важной линией защиты против гриппа. Другое направление – поиск специфических химиотерапевтических



средств, эффективно ингибирующих репликацию вируса в организме. Применение химиопрепаратов, снижающих уровень репродукции вируса и, следовательно, скорость его распространения, длительность и тяжесть заболевания у конкретного пациента, является неотъемлемым способом борьбы с таким заболеванием, как грипп.

Наш коллектив химиков-органиков из отдела медицинской химии Новосибирского института органической химии им. Н. Н. Ворожцова СО РАН давно и плодотворно занимается химическими модификациями соединений природного ряда, в первую очередь терпенов и терпеноидов. Особое внимание нами уделяется поиску новых эффективных противовирусных агентов на основе соединений терпенового ряда. Работы по поиску биологически активных веществ новых структурных типов невозможны без тесного сотрудничества со специалистами в области биологического тестирования. Так, нами, совместно с вирусологами из НИИ Гриппа им. Смородинцева и НИИ Пастера г. Санкт-Петербурга было исследовано более 500 новых соединений на основе соединений терпенового ряда. В результате нам удалось открыть новый класс агентов, эффективных в отношении вирусов гриппа – иминоперициклинов на основе камфоры. При выборе соединения лидера мы основывались на принципах медицинской химии – синтез субстанции должен быть макси-



мально простым и воспроизводимым, вещество должно быть эффективным в своей специфической активности и безопасным при применении. Именно такое соединение – продукт взаимодействия камфоры и аминокэтанола, названный нами камфецин. Данное вещество обладает широким спектром противовирусной активности. Так, камфецин высокоактивен по отношению к штаммам вируса гриппа типа А H1N1 (свиной), H3N2 (гонконгский), H5N2 (птичий) и вируса типа В.

Для того чтобы новая молекула имела возможность в дальнейшем стать лекарством, необходимо, кроме фундаментальных исследований о механизме действия, разработать технологичный метод синтеза целевого соединения и высокочувствительные методы обнаружения этого агента в биологической среде: в плазме крови, в цельной крови или моче – и полностью их контролировать. Также необходимо изучить фармакокинетику и метаболизм этого вещества на животных, выявить, какой именно способ введения является наиболее эффективным, провести широкие доклинические изучения этого вещества.

Для понимания, каким образом действует противовирусное средство, необходимо знать, как вирус действует на клетку. Жизненный цикл вируса включает в себя несколько этапов: прикрепление к клетке-мишени, проникновение в клетку, разборка капсида, репликация, сборка вирусной частицы и выход из клетки. Каждый этап может служить потенциальной мишенью для разработ-

ки противовирусного препарата. Вход вириона в клетку осуществляется вследствие активности поверхностного белка вируса – пептида слияния. При этом у разных типов вирусов разные поверхностные гликопротеины. Далее вирусы проникают в клетку путём эндоцитоза – погружения участка клеточной мембраны в месте их адсорбции. Кислые значения рН способствуют слиянию вирусной оболочки и клеточной мембраны. При проникновении вирусов в клетку образуются вакуоли (эндосомы). После проникновения вирусов в цитоплазму происходит частичная депротенинизация вирионов и модификация их нуклеопротеида. После депротенинизации вирусы невозможно выделить из культуры клеток. Этот этап репродукции известен как теневая фаза, или фаза эклипса [от англ. eclipse, затмение]. Она включает репликацию нуклеиновых кислот вируса и синтез вирусных белков. Теневая фаза заканчивается после образования составных компонентов вируса, необходимых для сборки дочерних популяций. Образование дочерних вирусных частиц в заражённой клетке подразумевает необходимость трёх процессов:

- 1) экспрессия генетического материала путём его транскрипции и последующей трансляции, что приводит к появлению вирусных белков;
- 2) синтез генетического материала вируса (репликация);
- 3) сборка из генетического материала и вирусных белков дочерних популяций. Наконец, вирус

должен открепиться от клетки-хозяина и продолжить размножение в других клетках.

Подавление размножения вирусов может происходить на разных этапах. Так, можно ингибировать ранние этапы – прикрепление вируса и эндоцитоз, можно угнетать синтез вирусных белков:

- а) «ранние» белки – ферменты,
- б) «поздние» белки.

Следующая мишень – угнетение синтеза вирусных ДНК и РНК. Можно ингибировать белки, ответственные за открепление вируса от клетки. И, наконец, можно уничтожать вирус-инфицированные клетки, чтоб предотвратить образование новых вирусов. В качестве вирусных мишеней для ингибирования химическими соединениями в терапии гриппа используются несколько вирусных белков. Среди применяемых в клинической практике это: блокатор протонного канала M2 – ремантадин; ингибиторы нейраминидазы: озельтамивир, занамивир, перамивир, ланинамивир; ингибиторы вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы: фавипиравир и рибавирин. Очень важно отметить, что для большинства существующих химиотерапевтических средств наблюдается

«привыкание» вируса к лекарству, или, как говорят, вирусологи – возникновение резистентности. Нашим коллективом исследователей совместно с вирусологами из НИИ Пастера под руководством д. б. н. Зарубаева Владимира Викторовича был изучен механизм противовирусного действия и доказана эффективность препарата с использованием животных моделей.

Проведённые исследования по изучению действия камфецина и его аналогов на ингибирование вируса гриппа в зависимости от времени добавления показывают, что соединения этого ряда проявляют активность на ранних стадиях вирусной репликации. Была проведена селекция камфецин-резистентных штаммов вируса гриппа и локализована мутация в структуре гемагглютинаина, обеспечивающая вирусу фенотип резистентности. Мутации в поверхностном белке гемагглютиниине в камфецин-резистентном штамме расположены вблизи пептида слияния субъединицы HA2. В том же районе находится сайт протеолиза для активизации гемагглютинаина при слиянии. На основании пространственной локализации этой замены мы предполагаем, что она влияет на межсубъединичные взаимодей-



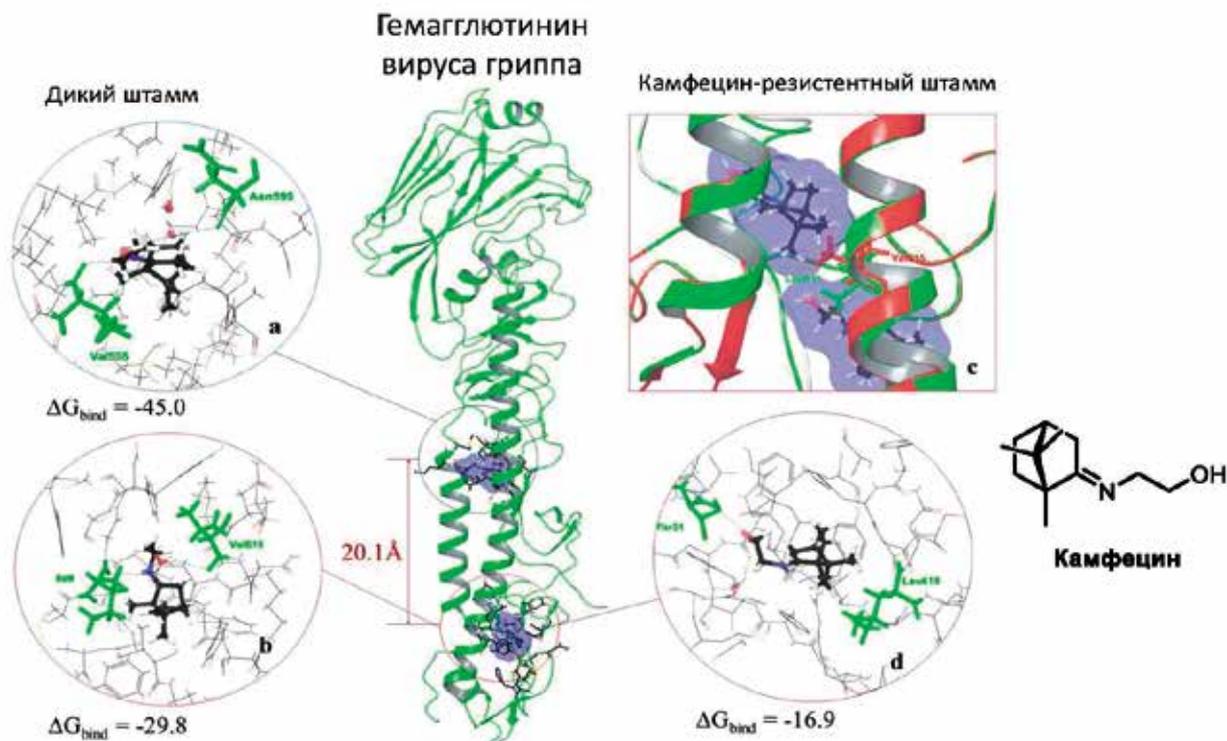


рисунок 1

ствия или же конформационно препятствует узнаванию сайта протеолиза ферментами хозяина, что в свою очередь снижает фузогенную активность гемагглютинаина. Моделирование взаимодействия камфeцина с вирусным гемагглютинином при помощи метода квантовой механики позволило выявить два сайта связывания. Один из них располагается на границе субъединиц HA1 и HA2 (аналогично сайту связывания ТВНО) в районе пептида слияния (рис. 1а), второй – в нижней части молекулы, в районе сайта протеолиза (рис. 1б). Различия в пространственной организации именно этой зоны меняют характер взаимодействия HA с камфeцином, разворачивая замещенную аминокислоту у мутанта V458(615)L и препятствуя тем самым образованию водородных связей, необходимых для формирования прочного комплекса. Энергия связывания в этом случае составляет –16,9 ккал/моль (рис. 33б), тогда как для HA дикого типа она вдвое выше (–29,8 ккал/моль, рис. 33д). Иными словами, при возникновении резистентности происходит изменение валина 458(615) на лейцин, что в свою очередь снижает возможность связывания камфeцина с указанным сайтом гемагглютинаина. В дальнейшем сайт связывания камфeцина в месте протеолиза нами назван как камфeциновый сайт связывания (СРН-сайт).

Для комплексной оценки биологических

свойств вируса гриппа, выработавшего устойчивость к камфeцину, нами было проведено тестирование его патогенности на модели гриппозной инфекции у белых мышей. Как было показано в ходе вирусологических исследований, инфицирование животных исходным, камфeцин-чувствительным (Cf-S) и пассированным в присутствии камфeцина, камфeцин-резистентным (Cf-R) вирусом приводило к принципиально разным типам патологического процесса. Так, при всех изученных дозах вируса отмечалось снижение веса и смертность животных, зараженных вирусом Cf-S, в то время как масса тела животных, инфицированных вирусом Cf-R, не менялась в ходе опыта (рис. 2). Приобретение вирусом камфeцин-резистентности, следовательно, приводит к снижению его патогенности для мышей. Данная информация является очень важной, поскольку можно предположить, что при широком использовании в клинической практике лекарственного средства на основе камфeцина при возникновении резистентности вирусов к камфeцину данные вирусы, вероятнее всего, станут менее патогенными.

С использованием теоретических расчетов мы также показали изменение энергии белкового комплекса поверхностного белка гемагглютинаина вируса гриппа. Согласно результатам расчета, замена валина на лейцин приводит к понижению внутренней энергии субъединицы тримера гема-

гглютина на 28 ккал/моль. Возможно, именно это приводит к стабилизации всего протеина в целом и затрудняет «разворачивание» полипептидных цепочек НА. Не исключено, что данный факт может быть одной из причин того, что патогенность камфецин-резистентного штамма вируса гриппа значительно ниже исходного. Иными словами, конформационные перестройки гемагглютина, необходимые для успешного входа вируса в клетку, могут требовать более высоких энергий. Блокада гемагглютина обладает рядом преимуществ перед механизмом действия основных противовирусных препаратов, применяемых для этиотропной терапии ОРВИ и гриппа: блокаторов нейраминидазы, антагонистов протонного канала М2 вирусов амантадина и препаратов на основе интерферона. В первую очередь это стабильность действия на различные подтипы вируса, включая устойчивые к другим препаратам, низкая токсичность и малая вероятность потери эффективности из-за мутации вируса.

Другим важным преимуществом камфецина является его синтез. Если смотреть с точки зрения медицинской химии, то синтез соединения, которое «готовится стать лекарством», должен включать не более четырёх стадий, не иметь стадии очистки колоночной хроматографией, быть воспроизводимым и в конечном итоге давать стабильное соединение с чистотой не менее 99,5%. Нам удалось разработать именно такой максимально технологичный синтез камфецина. Так, реакция идёт без применения растворителя в одну стадию, очистка вещества осуществляется

вакуумной перегонкой. В результате мы имеем стабильную субстанцию, чистота которой превышает 99,5%. Доклинические исследования «Камфецина» были проведены при поддержке Минпромторга России в рамках государственной программы «Фарма-2020» совместно с томской компанией ООО «Ифар», которая является аккредитованным R&D-центром по разработке, доклиническим и клиническим испытаниям лекарств. Компания «Ифар» имеет оснащённую современное оборудованием лабораторную и технологическую базу, а также квалифицированный опытный персонал для проведения широкого спектра доклинических исследований эффективности, безопасности и фармакокинетики в соответствии с российскими и международными стандартами. Доклинические исследования фармацевтической субстанции и лекарственного препарата «Камфецин» выполнены в полном объёме согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств», в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ 33044-2014. На сегодняшний день получено разрешение Минздрава России на проведение клинических испытаний, подготовлена клиническая база к проведению клинического исследования фазы I. Действующее вещество препарата защищено патентом RU2530554 – до 22.04.2033 (20 лет) с возможностью продления на 5 лет – до 22.04.2038.

Актуальность разработки новых препаратов для лечения ОРВИ и гриппа трудно переоценить,

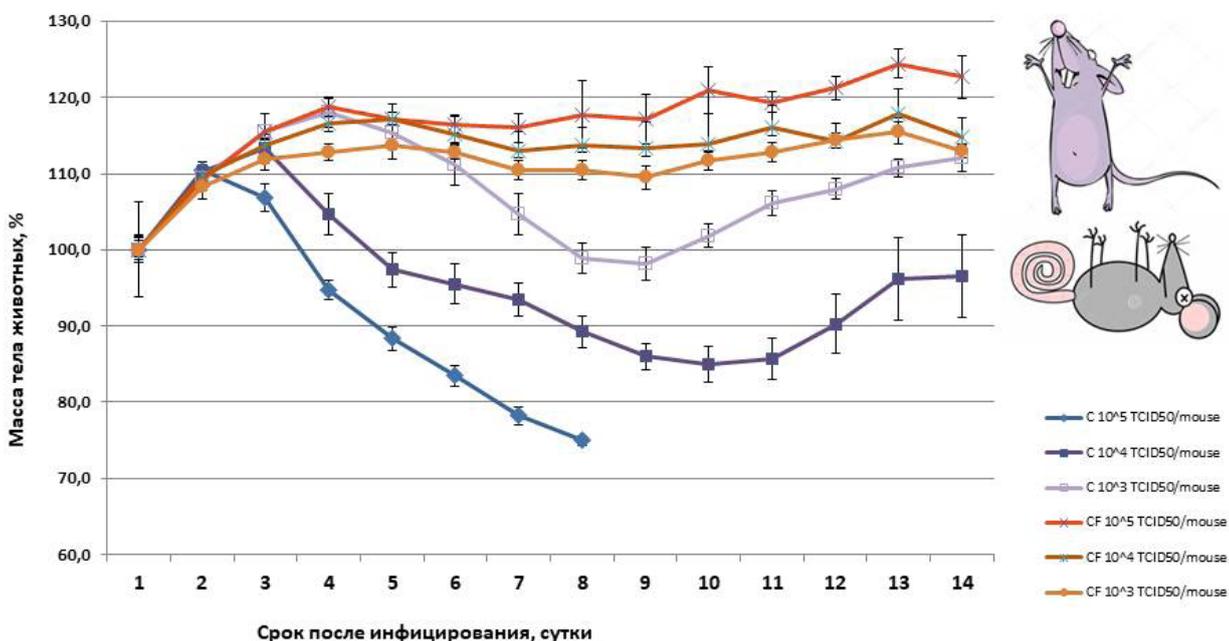


рисунок 2



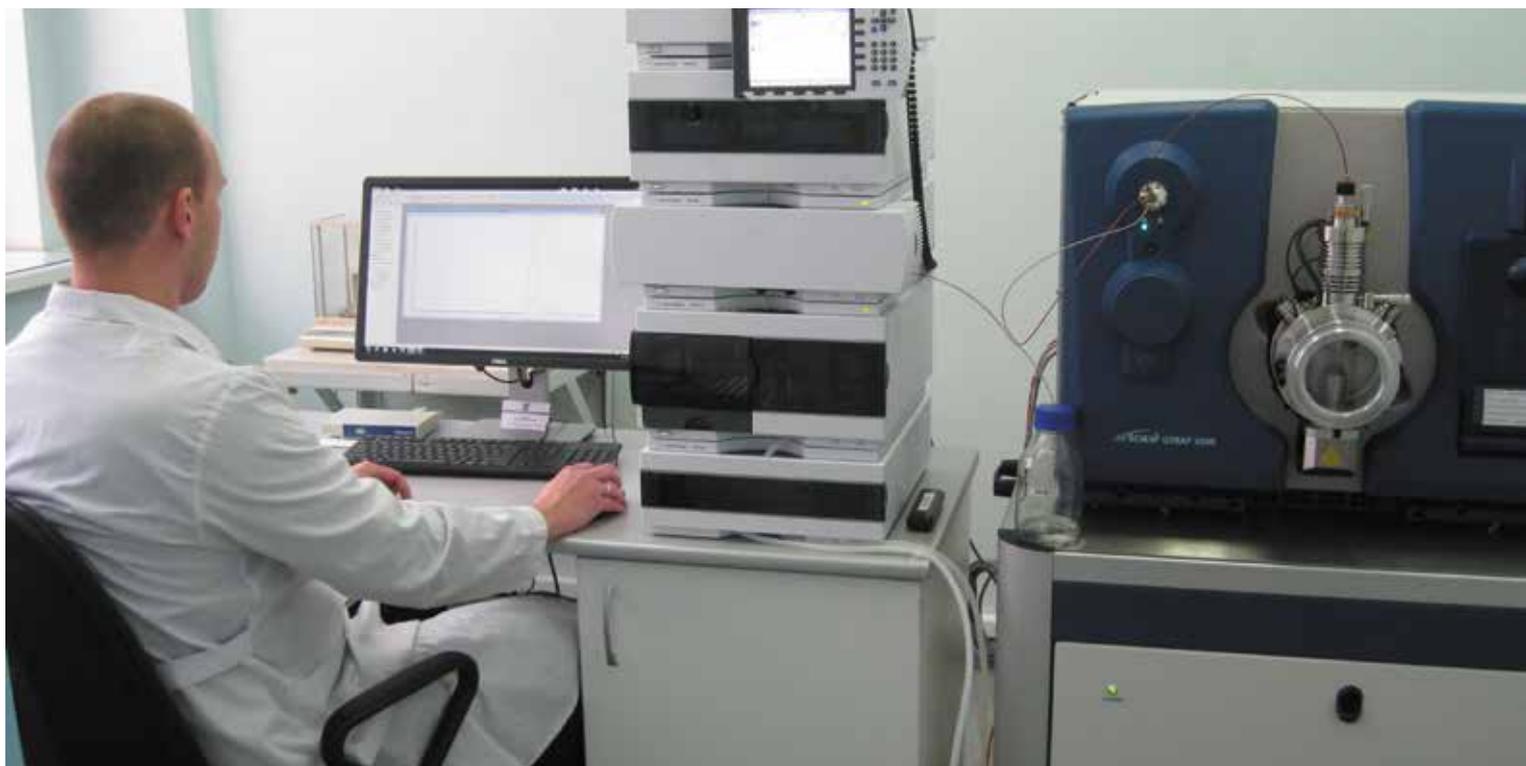
особенно в условиях пандемии коронавирусной инфекции и её последствий, связанных со снижением резистентности популяции, нарушением функции лёгких, являющихся барьерным органом для упомянутых вирусов, и других жизненно важных органов. С учётом фармацевтических свойств действующего вещества и возможных показаний к применению планируется создание парентеральной лекарственной формы препарата (раствора для инъекций), а также спрея для интраназального введения. Важно отметить, что низкая токсичность препарата позволяет прогнозировать в перспективе применение в педиатрической практике.

По результатам исследования острой токсичности фармацевтическая субстанция и препарат «Камфецин» относятся к 4-му (самому низкому) классу опасности химической продукции в соответствии с ГОСТ 32419–2013, что позволяет прогнозировать перевод препарата в группу безрецептурного отпуска и возможность безопасного применения у широких слоёв населения.

В целом «Камфецин» в терапевтических дозах и дозах, близких к терапевтическим, не обладает выраженной токсичностью, как при однократном, так и при многократном применении. «Камфецин» не обладает кумулятивным эффектом, не

оказывает отрицательного воздействия на систему крови и биохимические показатели. Гепатотропный и нефротоксический эффекты при приёме препарата появляются только на дозах, заметно превышающих терапевтические. Препарат не обладает тератогенным, иммуногенным, выраженным аллергизирующим и местнораздражающим действием. «Камфецин» не подвергается метаболизму в микросомальной фракции в фазе окисления, не подвергается метаболизму в кислой и нейтральной среде, стабилен в плазме крови. «Камфецин» имеет низкую степень связывания с белками микросом печени, не оказывает ингибирующее влияние на активность микросомальных цитохромов, в частности, цитохрома P450. Эти данные свидетельствуют об отсутствии зависимости эффекта препарата от рациона питания и приёма лекарственных средств, подвергающихся превращению в печени, а также об отсутствии ограничений в приёме пациентами с поражением печени. Нами изучено распределение противовирусного средства в органах животных и показано, что вещество может проходить через ГЭБ, что также является его достоинством в лечении особых форм гриппа.

Мировой рынок препаратов данной группы



так же, как и рынок России и стран ЕАЭС, постоянно растёт как в натуральном, так и в денежном выражении. При сохранении нынешних тенденций продажи противовирусных препаратов в РФ к моменту вывода нового препарата на рынок (в 2023) могут составить от 340 млн долларов США, а к 2030 году – 375 млн долларов. Прогноз дан без учёта продаж новых препаратов для лечения COVID-инфекции, а также препаратов интерферона, симптоматических и гомеопатических препаратов. Консервативный прогноз рассчитан на занятие новым препаратом не менее 5% соответствующего сегмента рынка РФ в денежном выражении, что составит от 16,125 млн долларов ежегодно. Однако, учитывая специфику препарата, его преимущества по сравнению с конкурентами, при наличии у инвестора достаточных sales force, реальная доля «Камфецина» на рынке РФ и ЕАЭС может быть кратно больше.

Сценарии выхода внешнего инвестора из проекта позволяют прогнозировать ROI от 150 % при выходе на промежуточных этапах и более 250 % при продаже прав на готовый к маркетингованию продукт.

Ожидаемые преимущества нового препарата по результатам доклинических исследований перед основными противогриппозными препаратами:

**1. Эффективность против широкого спектра вирусов гриппа и ОРВИ, включая резистентные к озельтамивиру («Тамифлю»).**

**2. Медленное развитие резистентности с потерей вирулентности вирусами резистентных штаммов.**

**3. Высокий профиль безопасности, позволяющий безрецептурное применение.**

Следует отметить, что по результатам всех проведённых исследований по синтезу, противовирусной активности, молекулярному моделированию, фармакологическим особенностям и разработкам аналитических методик были подготовлены материалы и после независимой экспертной оценки научного сообщества опубликованы нами в ведущих специализированных журналах. Мы будем рады, если эти публикации послужат ещё и началу диалога с заинтересованными коллегами. (Ссылки на эти публикации или сами материалы можно запросить у авторов данной статьи.)

Важно добавить, что результаты полученных исследований, выполненных под руководством Салахутдинова Н. Ф. в течение последних десяти лет, опубликованы в более чем в 200 статьях в ведущих международных журналах и патентах РФ. На основе ряда полученных научных результатов ведётся международное патентование изобретений. Высокий научный уровень результатов, полученных под руководством Салахутдинова Н. Ф., обеспечил широкое международное признание российских научных исследований в медицинской химии растительных метаболитов. ■