

Противогриппозный химиопрепарат Дейтифорин

С. Н. ТАНДУРА¹, В. В. ЗАРУБАЕВ², П. М. АНФИМОВ², О. И. КИСЕЛЕВ²

¹ Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва

² ФГБУ «НИИ гриппа» Минздравсоцразвития, Санкт-Петербург

Deitiforine, an Antiinfluenza Chemotherapeutic

S. N. TANDURA, V. V. ZARUBAEV, P. M. ANFIMOV, O. I. KISELEV

N.D.Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow
Influenza Research Institute, St. Petersburg

Проблема профилактики и терапии гриппозной инфекции остается одной из приоритетных задач медицинской науки и практического здравоохранения. В обзоре рассматриваются вопросы противовирусной активности отечественного низкомолекулярного препарата Дейтифорин. Приведены литературные данные о токсичности препарата, спектре его специфической активности в опытах на культуре клеток, куриных эмбрионах и на лабораторных животных, а также обсуждается проблема резистентности вирусов гриппа к каркасным соединениям, в частности, ремантадину и Дейтифору.

Ключевые слова: гриппозная инфекция, профилактика, терапия, противовирусная активность, Дейтифорин.

The problem of prophylaxis and therapy of influenza infections remains one of the priority goals for medical science and practical health care. The review includes the discussion of antiviral activity of Deitiforine, a Russian chemotherapeutic. The data on the toxicity and the specific activity spectrum in cell cultures, chicken embryos and laboratory animals are presented. The problem of the influenza viruses resistance to cage compounds and in particular to rimantadine and Deitiforine is also discussed.

Key words: influenza, prophylaxis, therapy, antiinfluenza activity, Deitiforine.

Введение

До открытия вируса иммунодефицита человека грипп был последним неконтролируемым и остается наиболее распространенным и самым массовым инфекционным заболеванием людей на Земле, которым ежегодно болеет более 10–15% населения промышленно развитых стран. Вирус гриппа вызывает повторяющиеся эпидемии с массовыми заболеваниями людей и смертностью.

Среди вирусов, вызывающих ежегодные эпидемии в человеческой популяции, идет постоянная смена антигенных характеристик (антигенный «дрейф») в молекулах поверхностных белков вириона (гемагглютинина и нейраминидазы), не выводящая вирус за пределы подтипа. Случаи заражения людей новым вирусом «птичьего гриппа» H5N1 с высокой летальностью [1, 2], а также данные об инфицировании работников птицеферм вирусами гриппа других подтипов свидетельствуют о том, что существует реальная опасность возникновения вирусов-реассортантов с полной заменой гемагглютинина и нейраминидазы (антигенный «шифт»). В течение нескольких лет ожидалось, что мир может оказаться на поро-

ге новой глобальной эпидемии гриппа (пандемии) [3], что и произошло в 2009 г. с появлением нового подтипа вируса А (H1N1) 2009.

Высокая степень изменчивости антигенной структуры вирусов гриппа является основной причиной непредсказуемости и неуправляемости эпидемий. Для появления пандемических вирусов гриппа существует постоянный источник генов это водоплавающие и перелетные птицы, у которых установлено наличие всех 16 подтипов вируса гриппа А. Установлено, что вирус гриппа может преодолевать межвидовой барьер птица-человек напрямую, без промежуточного хозяина [4]. Регулярно выявляются новые вирусы гриппа А подтипа H1N1 с необычным геномом [5]. По мнению ведущих вирусологов, проблема гриппа остается одной из главных задач современной медицинской науки [6–9].

Очевидно, что профилактика эпидемий гриппа должна основываться на расширении антивирусных вакцин и химиопрепаратов [10]. В комплексе противоэпидемических мероприятий против гриппа и ОРЗ используют три основных способа предупреждения и лечения вирусных заболеваний — средства прямого действия: вакцинация и химиотерапия (специфическая защита), а также препараты непрямого действия (неспецифическая терапия). Несмотря на определённые

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 119991, г. Москва, Ленинский проспект, 47.
Институт органической химии им. Л. Д. Зелинского РАН

достижения в области фармакотерапии гриппа последних лет и создания новых противовирусных препаратов, в большой доле случаев больные используют симптоматические средства.

Как показала ситуация 2009 г., распространение нового пандемического вируса среди людей идет быстрее, чем практическая медицина способна осуществить производство вакцины и вакцинацию эпидемически значимой части населения. Поэтому поиск и создание эффективных противовирусных средств прямого действия и возможно более широкого спектра активности на основе продуктов синтетического происхождения остается чрезвычайно важной задачей практического здравоохранения.

В настоящее время современные противовирусные стратегии должны включать два основных фактора: новые препараты должны не только эффективно предохранять от инфекции гриппа, но и иметь доступную цену [11]. При массовом распространении гриппа люди, живущие в большинстве стран мира, не в состоянии купить лекарства, которые достаточно дороги при производстве. Для большей части человеческой популяции на Земле может потребоваться необходимость массового применения эффективных и доступных по цене противовирусных препаратов, которые можно легко и быстро произвести в больших количествах и переправить во все части мира.

Химиотерапия является одним из самых массовых, простых, достаточно эффективных и дешевых способов профилактики и лечения вирусных инфекций [12–18]. Роль химиопрофилактики особенно возрастает в период пандемий, когда появляется новый штамм гриппа с новой антигенной структурой [19, 20], а также если речь идет о пациентах с иммунодефицитами (реципиенты донорских органов и костного мозга, ВИЧ-инфицированные, пожилые и т. п.). С другой стороны, бесконтрольное применение химиопрепаратов, в особенности прямого действия, быстро приводит к селекции лекарственно-устойчивых штаммов, что существенно снижает эффективность не только профилактики, но и терапии уже заболевших людей.

Одной из причин появления устойчивых вирусных мутантов является крайне ограниченный набор противогриппозных химиопрепаратов [21]. Появление устойчивости к лекарствам зависит от набора используемых средств [22]. Известно, что имеется возможность предотвращения развития резистентных мутантов вируса гриппа при использовании комбинированного состава из двух препаратов с различным механизмом действия [23]. В последние годы было показано, что смеси из трёх уже известных лекарственных препаратов являются, возможно, наилучшим решением проблемы появления резистентных вирусов. Разви-

тие этого нового направления исследований в борьбе с сезонными заболеваниями входит в современную стратегию лечения гриппа [24]. Это позволяет надеяться, что негативные последствия резистентности вирусов можно минимизировать путём комбинирования и расширения ряда применяемых противовирусных средств.

Таким образом, учитывая опасность непредсказуемого распространения вируса гриппа для человечества, появления его резистентных мутантов и огромные сложности при создании эффективных противовирусных вакцин, более важную роль при эпидемических заболеваниях гриппом будет играть, вероятно, расширение набора доступных химиопрепаратов [25]. Настоящий обзор посвящен разработанному несколько десятилетий назад препарату Дейтифорин, который является достаточно эффективным и может внести свой вклад в реализацию современных стратегий лечения гриппозных инфекций.

1. Противовирусные препараты и каркасные органические соединения

Дейтифорин можно отнести к категории перспективных карбоциклических противовирусных препаратов, поставив его в один ряд с широко известными противогриппозными средствами Ремантадином, Амантадином и Адапромином.

Открытие этой группы препаратов связано с определённой случайностью. В начале 60-х годов фирмой Du Pont в США для лечения болезни Паркинсона разрабатывался препарат гидрохлорид 1-аминоадамантана — Амантадин (Amantadine), который имеет также и другие названия Симметрел (Symmetrel) и Мидантан (Midantanum). При проведении клинических испытаний в Бостонском госпитале произошла вспышка гриппа. Болели пациенты фактически на всех отделениях, кроме того, где пациенты принимали Амантадин. Амантадин был первым химиопрепаратом для профилактики и лечения гриппа А, который был лицензирован в США в 1966 г. После это началось активное изучение антивирусных соединений на основе производных адамантана и других карбоциклических производных, которое продолжается по сей день [26, 27].

Это наблюдение привело к бурному интересу к препаратам адамантанового ряда со стороны специалистов в области гриппа. Академик А. А. Смородинцев инициировал исследования адамантановых производных в СССР. В результате было получено около десятка новых производных (рис. 1).

Однако в нашей стране Амантадин не применялся, поскольку в Институте органического синтеза (г. Рига) в 1968 г. был синтезирован более эффективный препарат на основе адамантана — гидрохлорид 1-(1-аминоэтил) Адамантан (Реман-

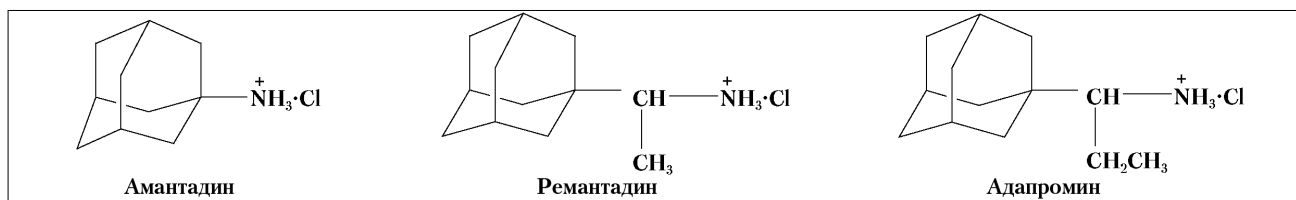


Рис. 1. Противогриппозные препараты — производные адамантана.

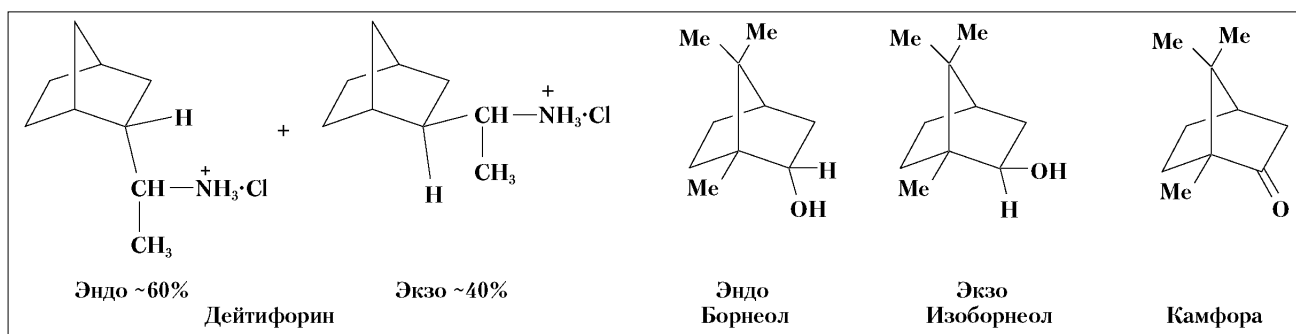


Рис. 2. Дейтифорин и производные Борнеола.

тадин), обладающий значительно меньшими побочными эффектами. Позднее в 1974 г. Ремантадин стал первым разрешённым к применению отечественным противовирусным средством, внедрён в производство и стал основным препаратом для лечения гриппа на период более 35 лет. Уже к концу 70-х годов был накоплен значительный опыт по применению ремантадина для профилактики и лечения гриппа. Опыт советских учёных подхватили в США только через 10 лет, но под другим, но сходным названием Rimantadin или Flumadine [28]. Амантадин и Ремантадин до настоящего времени широко применяются в Северной Америке [29, 30] и Европе [31]. Вся эта история весьма поучительна и вызывает глубочайшее уважение к создателям ремантадина.

Еще одним противовирусным препаратом на основе адамантана является Адапромин, который, в отличие от Ремантадина, оказался эффективен против вируса гриппа типа В, и был разрешен для медицинского применения в 1987 г. [32].

Карбоциклический остов адамантана блокирует трансмембранную функцию ионного канала белка М2 вируса типа А, необходимого на ранних стадиях после проникновения в клетку [25, 33, 34]. Стабильный полициклический каркас, который обладает конформационной жёсткостью и специфическими стерическими свойствами является, по-видимому, важной основой для создания новых препаратов с широкими возможностями для медицины, а также для изменения и улучшения фармакологических свойств существующих лекарств [35].

Другим перспективным противовирусным препаратом, производным карбоциклического ряда, является Дейтифорин (Deitiforine или эквивалентные названия Deitiforin, Deitiphorine,

Deutiforine). Он разрешён для медицинского применения в 1989 году. Дейтифорин содержит в молекуле бициклопентан (норборнан), а боковой фрагмент идентичен тому, который имеет ремантадин (рис. 2). Жёсткий каркас Дейтифорина имеет химическое строение подобное природному продукту борнеолу (borneol), который исторически называют камфорой с острова Борнео и который широко используется в народной медицине Китая и Индии [36—39].

Лекарственный препарат Дейтифорин представляет собой смесь эндо- и экзо-форм с соотношением примерно 60 и 40% соответственно [40]. Природный борнеол, входящий в группу бициклических терпенов, как и основная форма Дейтифорина, имеет эндо-ориентацию аминозаместителя (см. рис. 2). Изоборнеол, имеющий экзо-конфигурацию, в природе не встречается и получается синтетически при кинетическом контроле реакции.

Сравнение Дейтифорина с ремантадином свидетельствует, что замена адамантанового остова на норборнановый при идентичном боковом фрагменте приводит к расширению спектра антивирусной активности и уменьшению токсичности препарата, что особенно важно при разработке лекарственных форм для детей.

Впервые Дейтифорин был синтезирован в ИОХ АН Украины. Его противовирусная активность обнаружена в НИИЭМ Минздрава Республики Беларусь, а клинические испытания проведены в НИИ гриппа (Санкт-Петербург). В 1989 году Дейтифорин был разрешён для профилактики и лечения гриппа (Приказ Минздрава СССР № 535 от 22 сентября 1989 г.).

Технология синтеза Дейтифорина была несовершенна [41], что сдерживало широкое внедрение препарата в лечебную практику. Первая по-

Таблица 1. Влияние дейтифорина и ремантадина на общие синтезы ДНК, РНК и белка в клетках МДСК

Концентрация препаратов, мкг/мл	Ингибирование включения радиоактивных предшественников в клетках по сравнению с контролем, %					
	¹⁴ С тимидин		³ Н уридин		¹⁴ С аланин	
	дейтифорин	ремантадин	дейтифорин	ремантадин	дейтифорин	ремантадин
25	0	3	0	0	0	0
50	0	8	0	0	0	0
100	0	19	0	8	0	5
250	0	36	0	56	0	41
500	14	42	13	70	25	600
1000	67	100	30	100	53	100

пытка промышленной наработки субстанции в начале 90-х годов закончилась неудачно, поскольку опытная партия не соответствовала требованиям фармакопейной статьи по чистоте субстанции. При синтезе Дейтифорина самой сложной стадией является гидрирование оксима 2-ацетилнорборн-5-ена до 2-(1-аминоэтил)норборнана. Эта проблема в настоящее время успешно решена в ИОХ РАН при непосредственном участии его сотрудников Е. Ф. Литвина, Л. М. Козловой, Е. В. Шуваловой и В. З. Шарфа [39].

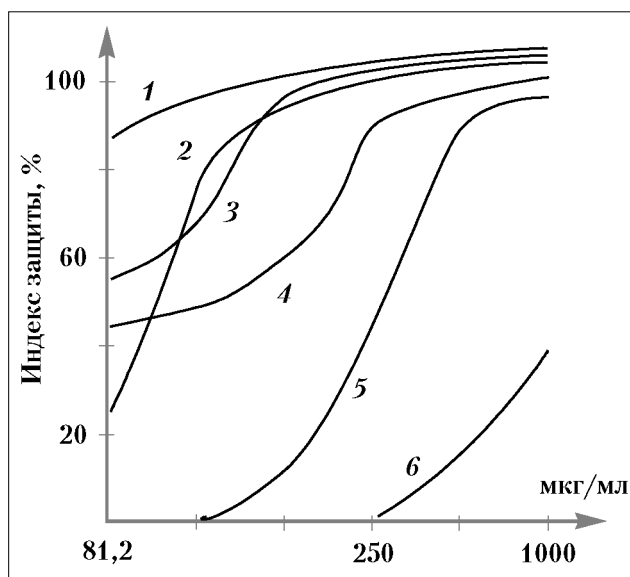
2. Биологическая активность Дейтифорина

2.1. Токсичность

Дейтифорин относится к малотоксичным препаратам, его токсичность для животных ($LD_{50} = 1265$) примерно вдвое ниже, чем у ремантадина ($LD_{50} = 620$) [42, 43]. Меньшая токсичность Дейтифорина дает возможность увеличения его дозировки при лечении гриппа и таким образом увеличивает антивирусный эффект по сравнению с ремантадином.

Для изучения влияния Дейтифорина на метаболические процессы в клетках МДСК был проведён радиографический анализ их РНК, ДНК и белков (табл. 1). Токсичность Дейтифорина в этих экспериментах проявлялась только при концентрации 500 мкг/мл, т. е. для клеток МДСК Дейтифорин был в 5 раз менее токсичен, чем ремантадин [44] (табл.1).

Действие Дейтифорина на клетки изучалось также при измерении патологии репродукционного аппарата клеток на примере клеточной линии МДСК. Изучение митотических режимов показало, что Дейтифорин в течение первых 24 ч после внесения в культуру в пределах нетоксических для клеточной популяции концентраций не оказывал существенного влияния на соотношение фаз митозов. По мере дальнейшего увеличения времени воздействия Дейтифорина в интервале 24–96 ч происходило прогрессивное нарастание количества метафазных митотических фигур. При этом на всех сроках наблюдения обнаружено их строго линейная зависимость от дозы химиопрепарата: для 24 ч —

**Рис. 3.** Зависимость вирусингибирующего эффекта дейтифорина в отношении вирусов гриппа А и В от применяемых концентраций.

1 — А/PR/8/34(Н1N1); 2 — А/Виктория/35/72 (Н3N2); 3 — А/Гонконг/17/68(Н3N2); 4 — А/Минск/44/74 (Н3N2); 5 — А/Минск/10/77(Н1N1); 6 — В/СССР/69 [23].

коэффициент корреляции 0,989, 48 ч — 0,968, 72 ч — 0,999 и 96 ч — 0,999 [45, 46].

2.2. Противогриппозные свойства

Антивирусная активность 2-(1-аминоэтил)-бицикло[2.2.1]гептана известна давно [48–50] и достаточно хорошо изучена. Как противогриппозный препарат Дейтифорин оказывает равноценный с ремантадином защитный эффект при гриппозной инфекции [50] и способен не только эффективно подавлять вирусную репликацию, но и селективно воздействовать на вирусинфицированные клетки [51].

Оптически чистая экзо-форма 2-(1-аминоэтил)-бицикло[2.2.1]гептана, полученная из оптически чистого экзо-изомера 2-ацетилбицикло[2.2.1]гептана, была впервые предложена в качестве антивирусного средства в 1969 г. [47]. Позднее было показано, что при обычном гидрировании (в условиях термодинамического контроля реакции) из оксима 2-ацетилбицикло[2.2.1]гепт-5-ена получается смесь экзо/эндо

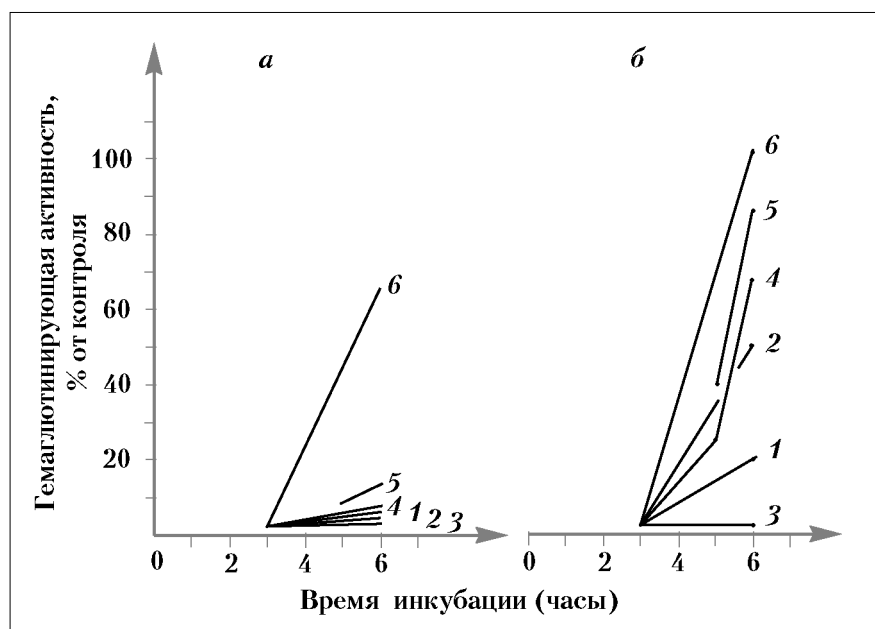


Рис. 4. Накопление гемагглютинирующей активности (ГА) в инфицированных клетках в присутствии Дейтифорина (а) и ремантадина (б). 1 — предобработка в течение 30 мин; 2 — внесение препаратов: на период адсорбции; 3 — сразу после абсорбции; 4 — через 30 минут после начала инкубации; 5 — через 3 ч от начала инкубации; 6 — контрольные пробы (без препаратов) [52].

изомеров 2-(1-аминоэтил)бицикло[2.2.1]гептана, которая (в форме гидрохлорида под названием Дейтифорин) также является активным ингибитором вирусной репродукции [49].

Спектр противовирусной активности Дейтифорина (рис. 3), показывает, что он достаточно эффективен против вирусов гриппа А. Действие Дейтифорина является вирусспецифическим, поскольку в исследованных концентрациях он не вызывает структурно-морфологических и функциональных изменений в клетках [50, 51].

В присутствии Дейтифорина в клетки проникало 23% внесённого на адсорбцию вируса, а в случае ремантадина несколько меньше — 16%. Однако в случае Дейтифорина большая часть радиоактивного изотопа накапливалась в ядерной фракции клеток (67%) в отличие от клеток, обработанных ремантадином, где значительная радиоактивность была сосредоточена в цитоплазматической фракции (65%). Полученные данные свидетельствуют, что имеется различие в механизмах действия Дейтифорина и ремантадина на репродукцию вируса гриппа.

Таблица 2. Распределение вирусных структур в клеточных фракциях в присутствии химиопрепаратов [52]

Исследуемый материал	Включение меченых предшественников, %		
	без препарата	Дейтифорин	ремантадин
Клеточный гомогенат	30	23	16
Цитоплазматическая фракция	50,3	33	65
Ядерная фракция	49,7	67	35

Таблица 3. Антивирусные свойства производного бициклогептана и ремантадина в отношении различных вирусов гриппа на куриных эмбрионах [43]

Вирус	Химиотерапевтический индекс			
	дейтифорин		ремантадин	
	МПК-500*	МПК-125**	МПК-62*	МПК-31**
A/PR8/34 (H1N1)	2	0	1	0
AI Гонконг/68 (H3N2)	16	4	16	4
A/Виктория/35/72 (H3N2)	16	4	16	4
A/Минск/44/74 (H3N2)	8	2	8	2
A/Минск/10/77 (H1N1)	>16	>4	>16	>4
B/СССР/69	0	0	0	0

Примечание. * — максимально переносимая концентрация (МПК, мкг/мл) на 3-й день инкубации; ** — МПК, определенная на 7-е сутки.

Таблица 4. Эффективность дейтифорина и ремантадина при экспериментальной гриппозной инфекции куриных эмбрионов (вирус А/Гонконг/1/68) [43]

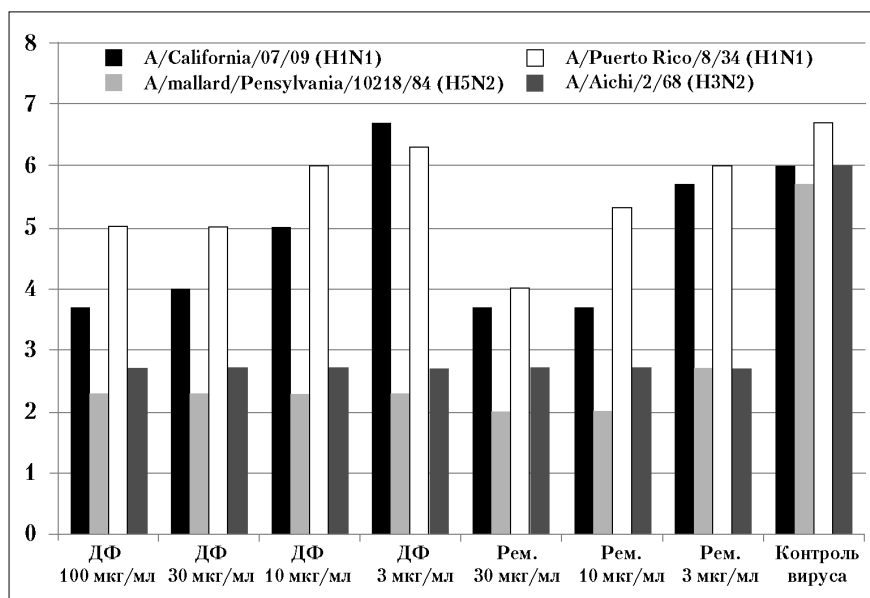
Препарат	Множественность инфекции, ЭИД ₅₀ /мл	Среднегеометрический титр вируса, log ₂ HAU*/0,2 mL	Разность с контролем, log ₂ HAU/0,2 mL
Дейтифорин	10	2,2	2,8
	100	5,9	3,1
Ремантадин	10	3,0	2,0
	100	7,2	1,8
Контроль вируса	10	5,0	0
	100	9,0	0

Примечание. * — гемагглютинирующих единиц.

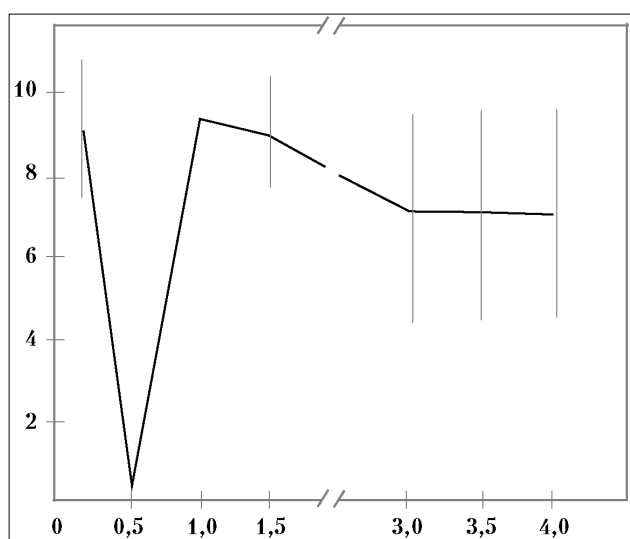
Дейтифорин, как и ремантадин, имеет примерно одинаковую степень активности в отношении 6 вирусов гриппа (табл. 3). Оба препарата обладают наиболее высокой активностью против вируса А/Минск/10/77 (H1N1), проявляют слабую активность в отношении вируса А/PR8/34 (H0N1) и не активны против вируса В/СССР/69. Дейтифорин при сравнимой с ремантадином дозировке проявлял высокую антивирусную активность в отношении вируса гриппа А/Гонконг/68 (H3N2) (табл. 4).

По данным нашей лаборатории, активность Дейтифорина и ремантадина в отношении четырёх вирусов гриппа разных подтипов была сходной (рис. 5). Дейтифорин обладал приблизительно втрое меньшей токсичностью, однако индексы селективности и спектр чувствительных вирусов для обоих препаратов оказались близкими.

Одним из факторов, определяющих характер действия известных производных адамантана, как и любых биологически активных соединений, является используемая концентрация. Рядом авторов показано, что каркасные соединения имеют довольно широкий диапазон нетоксических концентраций. Однако при определённых условиях максимальная активная концентрация может быть значительно ниже максимально переносимой концентрации (рис. 6). Таким образом, зависимость эффекта таких соединений от концентрации своеобразна, нелинейна и характеризуется снижением способности подавлять размножение вируса при дозах, превышающих максимально эффективную концентрацию. Это является общим свойством ингибиторов вирусов карбоциклического строения. Распространённость данного эффекта и воспроизводимость в различных тест-системах (в культуре клеток с ви-

**Рис. 5.** Противовирусная активность ремантадина и дейтифорина в отношении вирусов гриппа разных подтипов.

ДФ — дейтифорин; Рем. — ремантадин. По оси ординат — инфекционный титр вируса (lg EID₅₀/0,2 мл).

**Рис. 6.** Противовирусная активность ремантадина в отношении вируса гриппа А/Аichi/2/68 (H3N2) в экспериментах на куриных эмбрионах [54].

По оси ординат — инфекционный титр вируса (lg EID₅₀/0,2 мл), по оси абсцисс — концентрация ремантадина (мкг/мл).

Таблица 5. Влияние Дейтифорина на развитие вирусного токсикоза у мышей [55]

Время введения препарата, до, одновременно и после заражения	Гибель мышей в день опыта, %		
	1-й	2-й	3-й
-48	60	70	80
-24	40	70	90
-1	10	10	10
0 (одновременно с вирусом)	10	20	20
+1	40	60	60
+12	40	60	60
Контроль	80	100	100

Таблица 6. Результаты сравнительного исследования токсических и защитных свойств Дейтифорина и ремантадина при экспериментальной гриппозной инфекции белых мышей [44].

Препарат	Защитные свойства						
	доза, мг/кг	погибшие мыши/всего	летальность	индекс защиты, %	ЕД ₅₀ , мг/кг	ЛД ₅₀ /ЕД ₅₀	средняя продолжительность жизни, дни
Дейтифорин	100	5/17	29,41	67,32	28	45,2	13,29
	20	29/41	58,05	35,48			11,02
	5	21/25	84,00	6,54			8,24
Ремантадин	100	7/48	14,58	83,97	17	36,5	13,94
	20	19/47	40,42	55,16			12,40
	5	12/24	95,83	0			7,67
Контроль (без препарата)	0	63/70	90,0	0	0	0	8,58

русами гриппа А и В, РС-вирусом, на куриных эмбрионах и лабораторных животных) позволили определить его как феномен парадоксального снижения антивирусного действия [53, 54].

В экспериментах на животных было показано, что Дейтифорин, как и ремантадин, особенно активен при профилактическом способе применения (за 1 час до заражения), или при одновременном введении вместе с вирусом (табл. 5).

При изучении противовирусных свойств ремантадина и Дейтифорина на белых мышах, инфицированных вирусом гриппа А/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 5 LD₅₀, было показано, что оба препарата вызывают защитный эффект. Было показано, что у белых мышей через 1 час после заражения вирусом происходит повышение уровня общих фосфолипидов сурфактанта лёгких и в дальнейшем он остается повышенным. Однако эти показатели при введении Дейтифорина начинают уменьшаться, что свидетельствует о том, что защитная активность Дейтифорина, возможно, связана с коррекцией им уровня фосфолипидов, что может свидетельствовать о наличии у Дейтифорина комплексного механизма протективной активности при экспериментальной гриппозной инфекции [56, 57].

В другом исследовании на белых мышах было показано, что максимальный эффект Дейтифорина и ремантадина достигался при введении животным дозы 100 мг/кг (500 мг/кг на курс). При этом индекс защиты Дейтифорина и ремантадина на 14-й день наблюдения составил примерно 67 и 84% соответственно (табл. 6) [43].

Сополимеры смеси N-поливинилпирролидона и акриловой кислоты с производными адамантана и особенно Дейтифорином проявляют более высокую антивирусную активность и существенно тормозят репродукцию вирусов в перmissive клетках и в куриных эмбрионах [58].

Также были проведены испытания на цыплятах, которым однократно вводили Дейтифорин и одновременно заражали (в дозе от 50 до 200 ЛД₅₀) тремя штаммами вируса гриппа птиц, относящихся к трём серотипам. Выживало в среднем 66% птиц, тогда как в контрольных (не подвергавшихся лечению) группах выживало не более 10%. Аналогичные результаты были получены при трёхкратном применении Дейтифорина через 1, 2 и 3 суток после заражения цыплят этими же штаммами в таких же дозах. Важно отметить, что после заражения и последующего лечения у всех птиц формировался устойчивый иммунитет к соответствующему типу вируса [59].

Таким образом, Дейтифорин, обладающий более низкой токсичностью для клеточных культур и белых мышей, имеет высокие показатели эффективности в отношении вирусов гриппа, не уступающие хорошо известному противогриппозному средству ремантадину.

2.3. Активность Дейтифорина в отношении других респираторных вирусов человека

Сведения об ингибирующем действии Дейтифорина на вирус парагриппа немногочисленны. В работе [60] противовирусную активность Дейтифорина оценивали по способности тормозить репродукцию эталонного штамма ПГ-3 в культуре

Таблица 7. Ингибирующее влияние Дейтифорина на репродукцию вируса парагриппа типа 3 (ПГВ-3) в культуре клеток Нер-2 [60]

Препараты	Концентрация дейтифорина (мкг/мл)	Количество пробирок с ТГД ₅₀ в % от общего числа зараженных пробирок	Индекс защиты (%)
Дейтифорин + ПГВ-3	500	0	90
	250	0	90
	125	30	69,9
	60	90	9,9
Плацебо + ПГВ-3 (контроль)	—	100	

Таблица 8. Ингибирующее влияние Дейтифорина на выделение вируса парагриппа типа 3 из лёгких зараженных новорождённых мышей [60]

Препараты	Доза дейтифорина, мг/мышь	Доза вируса, lg ID ₅₀	Количество заражённых мышей	Количество мышей, у которых выделен ПГ-3		Индекс защиты, %
				абс	%	
Дейтифорин + ПГВ-3	0,24	4,0	9	3	33	64
Плацебо+ПГ-3 (контроль)			9	8	90	0
Дейтифорин + ПГВ-3	0,25	2,0	9	0	0	0
Плацебо+ПГ-3 (контроль)			9	3	33	0
Дейтифорин + ПГ-3	0,6	4,0	20	12	60	33
Плацебо + ПГ-3 (контроль)			19	17	90	0

Таблица 9. Результаты серологических и вирусологических исследований у добровольцев с наличием и отсутствием клинических реакций после иммунизации живой парагриппозной вакциной типа 3 [60]

Группы доброво- льцев	Препараты	Клинические реакции		Серологические исследования					Выделение вируса	
				I степени		время взятия сыворотки	СТГ антител (обратные величины)	прирост антител		ПГ-3 от лиц
		абс.	%	нет	4-кратный и более			с клиническими реакциями	без клинических реакций	
										абс.
24 чел.	Дейтифорин + вакцина ПГВ-3	1	1,2	1*	50,0	0	0	0	0	3
				2**	182,0	10	14	58,3		
				3***	128,8	10	14	58,3		
15 чел.	Плацебо + вакцина ПГВ-3	5	33,3	1	39,8	0	0	0	2	4
				2	223,9	3	12	80,0		
				3	158,5	3	12	80,0		

Примечание. * — до вакцинации; ** — через 10 дней после вакцинации; *** — через 21 день после вакцинации.

клеток Нер-2, а также защищать мышей от развития парагриппозной инфекции (табл. 7). Отчётливое действие препарата отмечалось как при введении за один час до заражения, так и в первые 4 дня наблюдения, когда даже незначительная его концентрация (60 мкг/мл) тормозила репродукцию вируса. При концентрации 500 мкг/мл Дейтифорин тормозил размножение вируса на всех сроках наблюдения (8 дней). Дейтифорин также активно тормозил развитие парагриппозной инфекции и в опытах на животных (табл. 8).

Высокая активность Дейтифорина выявлена на лошадях при заражении парагриппом типа 3 и др. Эксперименты на животных показали меньшую токсичность Дейтифорина в сравнении с ремантадином. Это позволяет использовать большие дозы Дейтифорина и, следовательно, отсюда его большая эффективность [43].

Противовирусная активность Дейтифорина была изучена также и на добровольцах, привитых живой вакциной ПГ-3 (табл. 9) [60]. Достоверный (4-кратный и более) прирост антител в сыворотке крови к ПГВ-3 выявлен у 12 из 15 человек (80%), не получавших Дейтифорин. У добровольцев, по-

лучавших Дейтифорин и привитых ПГ-3 вакциной, установлено заметное снижение уровня достоверных сероконверсий 58,3% (у 14 из 24 человек). Из табл. 9 видно, что предварительный приём Дейтифорина в небольшой дозе вызывает у добровольцев вакцинальные реакции в 5-6 раз реже, чем у лиц, получивших вместо Дейтифорина плацебо. Таким образом, профилактический приём Дейтифорина отчётливо препятствует репликации вакцинального вируса парагриппа у людей.

До сих пор не установлено, на какие именно биохимические реакции оказывают влияние карбоциклические каркасные соединения при взаимодействии вируса гриппа с клеткой. Эта способность может быть следствием ингибирования ими активации протеинкиназы С в соответствующих лимфоидных клетках [61]. Защитное действие Дейтифорина от гриппозного токсикоза может быть связано со способностью предотвращать проникновение М-белка вируса гриппа в клетку путем модификации структуры мембраны [62]. Предположено также, что взаимодействие молекулы Дейтифорина с белками М1 и М2 может осуществляться за счёт гидрофобных связей непо-

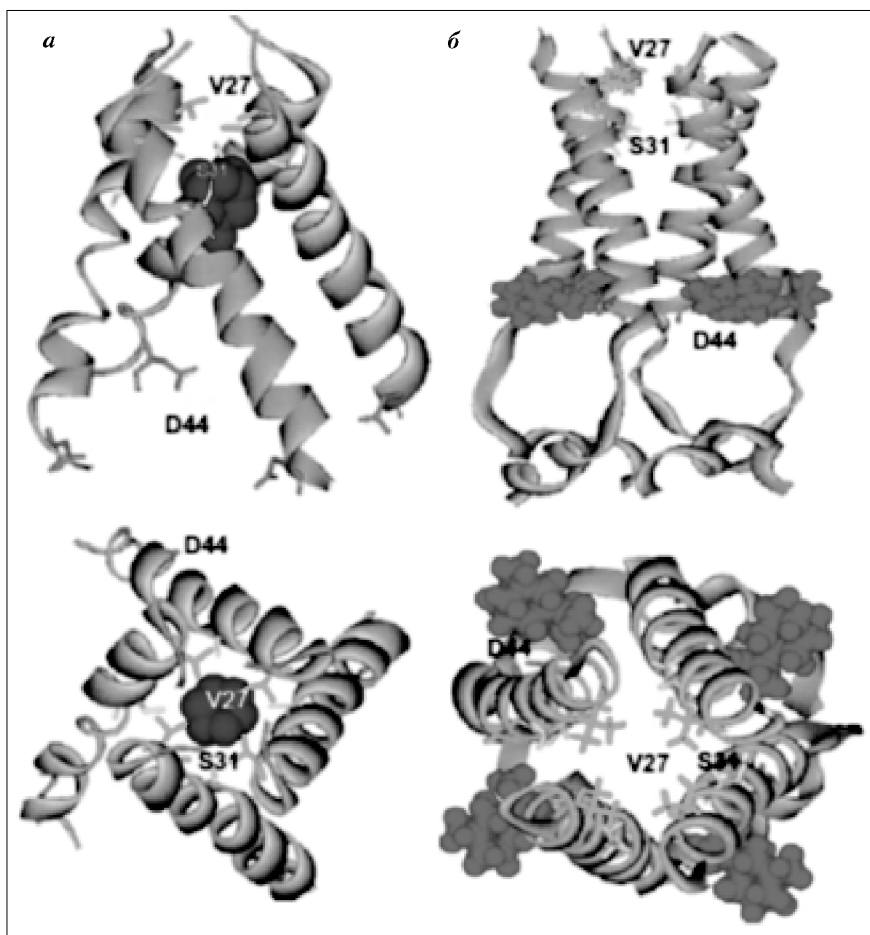


Рис. 7. Исследование механизма активности с помощью электронного магнитного резонанса.

лярной части молекулы, которая погружена в мембрану, а также водородных и электростатических связей её полярной части [63–66].

В основе противовирусного действия карбоциклических производных лежит способность блокирования ряда этапов развития вируса в клетке хозяина, в основе которых лежит активность ионного канала М2-белка [63]. Во-первых, блокируется процесс высвобождения нуклеиновой кислоты из вирусной частицы (декапсидация). Во-вторых, карбоциклические производные нарушают процесс почкования вирионов с последующим формированием и отделением их от клеточной мембраны [17].

Как и противогриппозные препараты из числа производных адамантана, при обработке до заражения Дейтифорин снижает гемагглютинирующую активность инфицированных вирусом клеток и вызывает модификацию клеточных мембран, которые участвуют в последующем инфекционном процессе [67]. В целом полученные данные показывают, что Дейтифорин достаточно эффективен против гриппа А — он снижает уровень репликации и инфекционность вирусов, не влияя при этом на синтез клеточных белков.

Исследования механизма действия Дейтифорина при помощи современных методических подходов не получили серьёзного развития. Конкретные механизмы его активности, исходя из сходства его строения с ремантадином, могут быть похожими. Так, в одном из исследований анализ комплекса М2-белка с ремантадином при помощи электронного магнитного резонанса обнаружил четыре равноценных сайта связывания (рис. 7), доступных со стороны липидного бислоя между трансмембранными участками тетрамера М2. При этом ремантадин ингибирует ионный канал аллостерически, т. е. не связываясь непосредственно с активным центром, а стабилизируя закрытое состояние М2 [68]. Альтернативная модель предполагает прямое блокирование ионной поры молекулой ремантадина, которая гидрофобным адамантильным участком координируется с гидроксилом аминокислоты серин в 31 положении белка — аминокислоты, которой при

замене традиционно приписывается ведущая роль в развитии лекарственной устойчивости вирусов гриппа [69].

Компьютерное моделирование структуры комплекса фрагмента белка М2 с ремантадином показало, что группа NH_2 ремантадина образует сильную водородную связь с карбоксильными группами ионного канала. При этом основность последней резко уменьшается, что приводит к сложности нового протонирования и удерживанию канала в закрытой конформации [70]. Методом рентгенографии и спектроскопии ЯМР в кристаллах и растворах показано, что активация трансмембранного домена М2 в присутствии амантадина происходит за счёт образования конформации со значительным скручиванием канала [71]. В настоящее время преобладает гипотеза о наличии в М2-белке двух сайтов связывания молекулы ремантадина — одного в районе аминокислот 26–31, другого — в районе 41–44 в цитоплазматической области протонного канала, отвечающей за открытое или закрытое его состояние [68].

2.4. Резистентность вирусов гриппа к карбоциклическим производным

Каркасные соединения, наряду со средствами повышения неспецифической резистентности организма, представляются успешными компонентами в борьбе с гриппом и другими ОРВИ. Тем не менее, эти заболевания остаются плохо контролируемы. Причин такой парадоксальной ситуации много, это высокая контагиозность вирусов, скорость и массивность поражения, полиэтиологичность возбудителей, смешанный характер инфекций, выраженная изменчивость антигенных свойств вирусов, нерациональная фармакотерапия, ограниченность специфической профилактики, а также быстро развивающаяся резистентность вирусов к препаратам.

При использовании синтетических соединений в качестве монотерапии вирусных инфекций в последние десятилетия было обнаружено появление резистентности, что стало основной причиной ограниченного использования противогриппозных химиопрепаратов. В начале 80-х годов были опубликованы первые данные о вирусах, резистентных к ремантадину и Дейтифоруину [72, 73]. Вирусы гриппа H1N1 and H3N2, устойчивые к Дейтифоруину, ремантадину и адапромину, были выделены на территории России и Монголии начиная с 1982 года. Резистентность вирусов обусловлена не только спонтанной мутацией под действием химиопрепаратов, но и влиянием используемых вакцин [73]. Была изучена также чувствительность дейтифоринорезистентного варианта вируса гриппа к другим противогриппозным препаратам, в частности, вариант вируса FPV обнаружил высокую чувствительность к рибавирину, но практически нечувствительность к имеющим сходное строение ремантадину [74] и адапромину [75]. Устойчивая резистентность к Дейтифоруину, ремантадину и адапромину была обнаружена у штаммов вируса гриппа A(H1N1), выделенных в 1985–1988 годах, отличительной особенностью которых явилось несоответствие антигенной структуры доминирующим вариантам [76]. Мониторинг антивирусной резистентности среди выделенных вирусов показал, что при использовании известных препаратов изменения происходят в различных генах, оставаясь внутри одного подтипа вируса H1N1 [77].

Два старых препарата, амантадин и ремантадин, в настоящее время имеют очень малый эффект против вирусов гриппа. Исследования, проведённые в США [78] и в азиатских странах [79] показали, что в случае вируса гриппа A/H3N2, устойчивые мутанты отличаются примерно у 90% больных, принимающих ремантадин. Масштабы устойчивости вируса A к производным адамантана становятся глобальными. Современные изоляты пандемического вируса гриппа A(H1N1)2009 практически на 100% являются ремантадиноустойчивыми.

Резистентность к препаратам каркасного ряда появляется в результате точечной мутации вируса. У мутантов изменяется структура трансмембранного домена M2 белка, что приводит к изменению структуры ионного канала вируса [71]. В результате доступность ключевого аминокислотного остатка резко ограничивается, карбоциклический остов химиопрепаратов оказывается неспособным проникнуть в полость ионного канала и, следовательно, блокировать обмен протонов. Недавние исследования показали, что устойчивые к лекарству вирусы-мутанты ослабляют связывание химического препарата за счёт дестабилизации спиральной молекулярной структуры [80].

Проблема появления устойчивости вируса гриппа к лекарствам, особенно адамантанового ряда, происходит в ситуации, когда набор противовирусных препаратов крайне мал. Вследствие этого у больных наблюдается селекция устойчивых к лекарствам штаммов, и вероятность их появления нарастает с увеличением продолжительности лечения и широте использования препаратов в клинической практике. Известно, что имеется возможность предотвращения развития резистентных мутантов вируса гриппа в результате комбинированного использования двух препаратов с различным механизмом действия [81]. В последние годы появились сообщения, что использование «коктейлей» из трёх противовирусных препаратов оказалось ещё более эффективным в борьбе с резистентными вирусами [82–84].

Компьютерная модель появления резистентности при различных сценариях использования современных лекарственных средств с учётом реальной плотности населения в определённых районах Земли также предполагает необходимость использования новых препаратов для профилактики и лечения гриппа [85, 86].

Современная стратегия лечения гриппа включает дальнейший поиск новых методов борьбы с вирусными мутантами. Важнейшей составляющей этой работы является как необходимость существенного расширения самого ряда противовирусных препаратов, так и создания новых лекарств на их основе, включая композиционные смеси.

2.5. Сравнение с мировыми аналогами

Сравнительные данные клинико-экспериментальных исследований ремантадина, арбидола, Дейтифоруина и адапромина для лечения и профилактики гриппа [32] представлены в табл. 10.

Заключение

Применение химиопрепаратов для профилактики и лечения гриппа и других ОРВИ является общепризнанным мировым стандартом, и многолетние клинические исследования достоверно выявили их высокую лечебно-профилактическую значимость.

Таблица 10. Сравнительные данные клинико-экспериментальных исследований ремантадина, арбидола, Дейтифорина и адапромина для лечения и профилактики гриппа

Препарат	Вид гриппа				Токсичность LD ₅₀ , мг/кг	Растворимость в воде	Побочные действие
	A	B	Пара-	РС			
Амантадин	+	—	—	—	135	+	Токсикоз, синдром Рея
Ремантадин			—	—	144—285	+	Токсикоз, синдром Рея
Арбидол					340	—	Иммуностимулятор
Дейтифорин		±			1265	+	Радиопротектор
Адапромин					445	+	Синдром Рея
Тамифлю			—	—		+	Неврологические расстройства

Однако в настоящее время ограниченное использование препаратов вызвано появлением резистентных вирусов-мутантов, чему способствует крайне ограниченный набор применяемых химиопрепаратов. Это усиливает беспокойство относительно широкого использования противовирусных лекарств при очередных гриппозных эпидемиях. Увеличение существующего набора антивирусных препаратов может быть эффективным и недорогим способом борьбы с появлением резистентных штаммов. Учитывая серьёзную проблему быстрого создания эффективной вакцины против гриппа, противовирусные препара-

ты будут иметь основную роль на первой стадии лечения новых вирусных инфекций.

Для достижения максимального терапевтического эффекта в борьбе с развитием резистентных мутантов вируса гриппа наиболее целесообразным является комбинированное использование нескольких противовирусных препаратов, что соответствует современной противовирусной стратегии. Поэтому крайне важно иметь как можно более широкий набор противогриппозных препаратов с различным механизмом действия. Список известных и широко используемых лекарств может быть расширен благодаря Дейтифору.

ЛИТЕРАТУРА

- Rivera S. J. Avian influenza (H5N1) — the next pandemic? In print. 2006; 53: 3: 56, 58, 62.
- Enserink M. Avian influenza — H5N1 moves into Africa, European Union, deepening global crisis. Science 2006; 311: 5763: 932.
- Peiris J. S. M., de Jong M. D., Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 2: 243—267.
- Деева Э. Г., Ерошкин М. Ю., Григорьева В. А., Ахмедгалеева Ю. Н., Коротков А. В., Зайцев Ф. Н., Киселев О. И. Эпизоотии гриппа птиц как манифестация пандемии. Журн микробиол эпидемиол иммунол 2006; 1: 81—87.
- Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. N Engl J Med 2009; 360: 25: 2605—2615.
- Wolinsky S. M. The monster at our door — the global threat of avian flu. Science 2006; 311: 5762: 780—781.
- Flahault A. Global monitoring of influenza: potential contribution of national networks from a French perspective. Expert Rev Antiinfect Ther 2006; 4: 3: 387—393.
- Enserink M. Avian influenza. Pushed by an outsider, scientists call for global plan to share flu data. Science 2006; 313: 5790: 1026.
- Colizza V., Barrat A., Barthelemy M., Vespignani A. The role of the airline transportation network in the prediction and predictability of global epidemics. Proc Nat Acad Scien USA 2006; 103: 7: 2015—2020.
- Ferguson N. M., Cummings D. A., Fraser C., Cajka J. C., Cooley P. C., Burke D. S. Strategies for mitigating an influenza pandemic. Nature 2006; 442: 7101: 448—452.
- Sugrue R. J., Tan B.-H., Yeo D. S., Sutejo R. Antiviral drugs for the control of pandemic influenza virus. Ann Acad Med. Singapore 2008; 37: 6: 518—524.
- Карпунин Г. И. Профилактика и лечение гриппа. Л.: 1991; 192.
- Ершов Ф. И. Антивирусные препараты. М.: 1998, 186.
- Киселев О. И. и др. Антивирусные препараты для лечения гриппа и ОРВИ. СПб.: 2000.
- Ершов Ф. И., Чижов Н. П., Тазулахова Э. Б. Противовирусные средства. СПб.: 1993; 11—15.
- Киселев О. И. Антивирусные препараты для лечения гриппа и ОРЗ. Дизайн препаратов на основе полимерных носителей. СПб.: 2002.
- Narain J. P., Kumar R., Bhatia R. Pandemic (H1N1)2009: epidemiological, clinical and prevention aspects. Nat Med J India. 2009; 22: 5: e1—e6.
- Meanwell N. A., Belega M., Carini D. J., D'Andrea, S. V., Kadow J. F., Krystal M., Naidu B. N., Regueiro-Ren A., Scola P. M., Sit S. Y., Walker M. A., Wang T., and Yeung K. S. Developments in antiviral drug design, discovery and development in 2004. [Review]. Curr Drug Targ — Infect Dis 2005; 5: 4: 307—400.
- McCullers J. A. The clinical need for new antiviral drugs directed against influenza virus. J Infect Dis 2006; 193: 6: 751—753.
- Islam T., von Itzstein M. Anti-influenza drug discovery: are we ready for the next pandemic? Advan Carbohydr Chem Biochem 2008; 61: 293—352.
- Lipsich M., Cohen T., Murray M., Levin B. R. Antiviral resistance and the control of pandemic influenza. PLoS Medicine 2007; 4: 1: 111—121.
- Handel A., Regoes R. R., Antia R. The role of compensatory mutations in the emergence of drug resistance. PLoS Comput Biol 2006; 2: 10: 1262—1270.
- Moghadas S. M., Bowman C. S., Rost G., Wu J. Population-wide emergence of antiviral resistance during pandemic influenza. PLoS One 2008; 3: 3: 1—8.
- Alexander M. E., Bowman C. S., Feng Z., Gardam M., Moghadas S. M., Rost G., Wu J., Yan P. Emergence of drug resistance: implications for antiviral control of pandemic influenza. Proc Royal Soc London B. 2007; 274: 1619: 1675—1684.
- Geldenhuys W. J., Malan S. F., Bloomquist J. R., Marchand A. P., van der Schyf C. J. Pharmacology and structure-activity relationships of bioactive polycyclic cage compounds: a focus on pentacycloundecane derivatives. Med Res Rev 2005; 25: 1: 21—48.
- Zoidis G., Fytas C., Papanastasiou L., Foscolos G. B., Fytas G., Padalko E., de Clercq E., Naesens L., Neyts J., Kolocouris N. Heterocyclic rimantadine analogues with antiviral activity. Bioorg Medic Chem 2006; 14: 10: 3341—3348.
- Antiviral drug therapy. Amer Fam Phys 1991; 43: 1: 197—204.
- Prober C. G. Antiviral therapy for influenza virus infections. Semin Pediatr Infect Dis 2002; 13: 1: 31—39.
- Townsend K. A., Eiland L. S. Combating influenza with antiviral therapy in the pediatric population. Pharmacotherapy 2006; 26: 1: 95—103.
- Clercq E. Influenza virus inhibitors available for the chemotherapy and/or chemoprophylaxis of influenza virus infections. Verh K Acad Geneesk Belg 2006; 68: 2: 121—137.
- Чижов Н., Аникин В., Романцев М. Перспективы использования отечественных противовирусных препаратов. Врач. 1993; 3: 43—44.
- Киселев О. И., Блинов К. Н., Козелецкая К. Н. Молекулярный механизм действия антивирусных препаратов адамантанового ряда. Вестник РАМН 1993; 3: 10—15.

33. Kollerova E., Betakova T. Influenza viruses and their ion channels (Review). *Acta Virologica* 2006; 50: 1: 7–16.
34. Pinto L. H. and Lamb R. A. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J Biol Chem* 2006; 281: 14: 8997–9000.
35. Bensky D., Gamble A. Chinese Herbal Medicine: Materia Medica. 1993.
36. Huang Bingshan, Wang Yuxia. Thousand formulas and thousand herbs of traditional chinese medicine. Heilongjiang Education Press. Harbin. 1993.
37. Nadkarni K. M. Indian Materia Medica. 1976.
38. Справочник по лекарствам китайской медицины. М.: 2003; 273–275.
39. Тандура С. Н., Шумский А. Н., Литвин Е. Ф., Козлова Л. М., Шувалова Е. В., Шарф В. З., Колесников С. П. Изучение диастереомерии 2-(1-аминоэтил)бицикло[2.2.1]гептана и его гидрохлорида (дейтифорина) методом спектроскопии ЯМР. *Известия АН, Сер Хим* 2001; 6: 971–978.
40. Касьян Л. И., Красновская О. Ю., Касьян А. О., Оковитый С. И., Даниленко Г. И., Кривошеева Н. Г., Гужова Н. Г. *Ж орг хим* 1997; 33: 7: 1037–1043.
41. Тандура С. Н., Шелудяков В. Д., Лебедева А. Л., Лебедев А. В. Способ получения гидрохлорида 2-(1-аминоэтил)бицикло[2.2.1]гептана. Патент RU 2307827 C1 от 27.04.2006.
42. Вотяков В. И., Бореко В. И., Русяев В. А., Шашихина М. Н., Казак Н. Ф. Характеристика степени и спектра противовирусной активности 2-(1-аминоэтил)бицикло[2.2.1]гептан хлоргидрата. *Вопр вирусол* 1982; 27: 4: 172–176.
43. Votiakov V. I., Erokchina I., Amvros'eva N. V., Rusiaev V. A. Pathology of the reproductive apparatus of cells under the action of remantadine and deitiforin. *Biull Eksp Biol Med* 1989; 108: 9: 356–358.
44. Вотяков В. И., Ерохина И. Р., Амеросьева Т. В. Трехфазная реакция клеток культуры МДСК на длительное воздействие противовирусных химиопрепаратов. *Бюлл экспер биол мед* 1989; 107: 595–598.
45. Вотяков В. И., Ерохина И. Р., Амеросьева Т. В., Русяев В. А. О патологии репродукционного аппарата клеток при действии ремантадина и дейтифорина. *Бюлл экспер биол мед* 1989; 108: 9: 346–348.
46. Kormendy C. G. Pat. 3444302. 1969. (USA).
47. Deyde V. M., Sheu T. G., Trujillo A. A., Okomo-Adhiambo M., Garten R., Klimov A. I., Gubareva L. V. Detection of molecular markers of drug resistance in 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses by pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 3: 1102–1110.
48. Pat. Brit. GB 1146389 19690326. Antiviral bicycle[2.2.1]heptane derivatives. (Smith Kline and French Laboratories): 2 pp.
49. Киселев О. И., Мишин Е. Б., Ерошкин В. И., Усова Е. В., Руденко В. И., Чупахин О. Н. Вторичная структура белка М2 вируса гриппа типа А и его роль в формировании резистентности к ремантадину и дейтифору. *Мол биол* 1994; 28: 5: 1009–1013.
50. Галицкая Н. Н., Русяев В. А., Шашихина М. Н., Жаврид С. В., Бореко Е. И., Юнусова Д. А., Солоухин В. З. Перспективы научной разработки противовирусных веществ. Минск, 1978; 55–60.
51. Грибкова Н. В., Казак Н. Ф., Судник Ю. М., Черенкевич С. Н., Подольская И. А., Мухина Л. Н., Садническая Т. Д. Перспек науч разраб противовирус в-в. Минск, 1978; 97–100.
52. Вотяков В. И., Бореко Е. И., Запорожец Л. К., Судник Ю. М. Нуклеозиды, производные бициклопептана и адамантана, другие антивирусные вещества. Минск, 1981; 3–8.
53. Грибкова Н. В., Казак Н. Ф. Сравнительное изучение влияния 2-(1-аминоэтил)бицикло[2.2.1]гептан хлоргидрата и ремантадина на репродукцию вируса гриппа. Нуклеозиды, производные бициклопептана и адамантана, другие антивирусные вещества. Минск, 1981; 53–56.
54. Бореко Е. И., Павлова Н. И., Вотяков В. И. Особенности противовирусного действия соединений карбоциклического ряда в зависимости от их концентрации. *Вопр вирусол* 1996; 41: 129–133.
55. Павлова Н., Бореко Е. И., Вотяков В. И. Феномен парадоксального снижения антивирусного действия ремантадина и ряда других карбоциклических соединений. А. с. № 1751204 СССР (1997). «Способ получения ремантадинзависимого вируса гриппа».
56. Ильенко В. И., Платонов В. Г., Ветласенин А. В., Прозорова И. Н. Проблемы и перспективы изучения нуклеозидов, бициклопептана, адамантана и других противовирусных соединений в эксперименте и клинике. Минск, 1982; 49–53.
57. Казинец О. Н., Амеросьева Т. В., Русяев В. А. Изменения фосфолипидных компонентов сурфактанта лёгких при экспериментальной гриппозной инфекции и их коррекция ремантадином и дейтифорином. *Вопр вирусол* 2002; 47: 2: 22–25.
58. Rybalko S., Nesterova N., Diadiun S., Danylenko G., Danylenko V., Guzova S., Maksimov Y., Arkadiev V., Ivans'ka N., Maksymenok O., Vrnycianu N., Zhtrebtsova E., Grygoreva T. Therapeutical effect of modified adamantane copolymer compounds: study of molecular mechanisms. *Acta Biochimica Polonica* 2001; 48: 1: 241–249.
59. Власов Н. А., Зубаиров М. М., Васильев Д. А., Козин А. И. Антибиотики и химиопрепараты для борьбы с инфекционными болезнями животных: Новые методы в профилактике и лечении инфекц. болезней. Учеб пос Ульяновская гос. с.-х. акад., Каф. микробиол вирусол эпизоотол вет-сан эксперт. Ульяновск, 1997; 66.
60. Болдасов В. К., Калинина Н. А., Ревунова О. В., Гусева В. М., Леонов В. М., Сухинин В. П., Ильенко В. И. Противовирусная активность дейтифорина в парагриппозной инфекции. *Вопр вирусол* 1991; 36: 5: 389–392.
61. Столяров З. Е., Федорчук А. Г., Прищепа Л. А. Механизм антивирусной активности ремантадина. *Хим-фармац журн* 1993; 27: 4–8.
62. Федеров А. Н., Ел-Карадаги С., Русяев В. А., Харитоненков И. Г., Твердислов В. А., Ярославцева Н. Г. Молекулярный механизм антивирусной активности 2-(1-аминоэтил)бицикло[2.2.1]гептан хлоргидрата. *Вопр вирусол* 1988; 33: 4: 403–407.
63. Блинов В. М., Рсенчук С. М., Каргинов В. А., Мишин В. П., Козелецкая К. Н., Сандахчиев Л. С., Киселев О. И. Изучение молекулярного механизма резистентности к вирусу гриппа. *ДАН СССР, сер. Биохимия* 1991; 319: 6: 1480–1484.
64. Киселев О. И., Мишин Е. Б., Ерошкин В. И., Усова Е. В., Руденко В. И., Чупахин О. Н. Вторичная структура белка М2 вируса гриппа типа А и его роль в формировании резистентности к ремантадину и дейтифору. *Мол биол*. 1994; 28: 5: 1009–1013.
65. Hay A. J. The action of adamantanines against influenza A viruses inhibition of the M2 ion channel protein. *Sem Virol* 1992; 3: 21–30.
66. Kiselev O. I. Influenza Antiviral Drug Discovery. In: «Strengthening Influenza Pandemic Preparedness Through Civil-Military Cooperation». Eds. James Neville. Oleg I. Kiselev. NATO Public Diplomacy Division. NATO Science Series. 2003; 360: 47–56.
67. Вотяков В. И., Грибкова Н. В., Казак Н. Ф., Подольская И. А. Механизм активности 2-(1-аминоэтил)бицикло[2.2.1]гептан хлоргидрата. *Вопр вирусол* 1982; 27: 4: 169–172.
68. Rosenberg M. R., Casarotto M. G. Coexistence of two adamantane binding sites in the influenza A M2 ion channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 31: 13866–13871.
69. Pielak R. M., Schnell J. R., Chou J. J. Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 18: 7379–7384.
70. Du Q.-S., Wang S.-Q., Huang R.-B., Chou K.-C. Computational 3D structures of drug-targeting proteins in the 2009-H1N1 influenza A virus. *Chem Phys Lett* 2010; 485: 191–195.
71. Yi M., Cross T. A., Zhou H.-X. Conformational heterogeneity of the M2 proton channel and a structural model for channel activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 32: 13311–13316.
72. Козелецкая К. Н., Блинов В. М., Каргинов В. А., Бурмистрова В. В., Сняжков А. Н., Голубев Д. Б. Изменение функциональной активности и первичной структуры белка М2 у резистентных к ремантадину и дейтифору вариантов вируса гриппа: общие и индивидуальные отличия от исходного штамма. *Мол ген микробиол вирусол* 1989; 6: 33–38.
73. Козелецкая К. Н., Каргинов В. А., Киселев О. И., Мишин В. П., Гринбаум Е. Б., Бурмистрова В. В. Происхождение резистентности к химиопрепаратам у природных изолятов вируса гриппа А. *Вестник РАМН* 1995; 5: 36–41.
74. Грибкова Н. В., Казак Н. Ф., Вотяков В. И. Изучение чувствительности к ремантадину и рибавируну вируса гриппа А, резистентного к 2-(1-аминоэтил)бицикло[2.2.1]гептан хлориду. *Вопр вирусол* 1984; 29: 5: 619–621.
75. Козелецкая К. Н., Медведев М. Л., Голубев Д. Б. Чувствительность к ремантадину и другим химиопрепаратам вирусов типа А 1982–1983 гг. выделения. *Микробиол журн* 1986; 48: 4: 67–71.
76. Козелецкая К. Н., Гринбаум Е. Б., Жамсрангийн М., Бурмистрова В. В., Киселев О. И. Выделение и изучение свойств современных вирусов гриппа А (H1N1) с природной резистентностью к ремантадину. *Вопр вирусол* 1990; 35: 289–293.
77. Cheng P. K. C., Leung T. W. C., Ho E. C. M., Leung P. C. K., Ng A. Y. Y., Lai M. Y. Y. and Lim W. L. Oseltamivir- and amantadine-resistant influenza viruses A (H1N1). *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 6: 966–968.
78. Bright R. A., Shay D. K., Shu B., Cox N. J., Klimov A. I. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005–2006 influenza season in the United States. *JAMA* 2006; 295: 8: 891–894.

79. Deyde V. M., Xu X., Bright R. A., Shaw M., Smith C. B., Zhang Y., Shu Y., Gubareva L. V., Cox N. J., Klimov A. I. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2 and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J Infect Dis* 2007; 196: 2: 249–257.
80. Wang J.-F., Wei D.-Q., Chou K.-C. Insights from investigating the interactions of adamantane-based drugs with the M2 proton channel from the H1N1 swine virus. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388: 2: 413–417.
81. Еропкин М. Ю., Гудкова Т. М., Коновалова Н. И., Щеканова С. М., Ягловская И. Б., Еропкина Е. М., Киселев О. И. Противовирусная активность антиоксидантов/антигипоксантов и их комбинаций с ремантадином против вируса гриппа А в опытах *in vitro*. *Экспериментальная фармакология* 2007; 70: 5: 33–37.
82. Moghadas S. M., Bowman C. S., Rost G., Wu J. Population-wide emergence of antiviral resistance during pandemic influenza. *PLoS One* 2008; 3: 3: 1–8.
83. Nguyen J. T., Hoopes J. D., Le M. H., Smee D. F., Patick A. K., Faix D. J., Blair P. J., de Jong M. D., Prichard M. N., Went G. T. Triple combination of amantadine, ribavirin, and oseltamivir is highly active and synergistic against drug resistant influenza virus strains *in vitro*. *PLoS One* 2010; 5: 2: e9332.
84. Wu J. T., Leung G. M., Lipsitch M., Cooper B. S., Riley S. Hedging against antiviral resistance during the next influenza pandemic using small stockpiles of an alternative chemotherapy. *PLoS Med* 2009; 6: 5: e1000085.
85. Regoes R. R., Bonhoeffer S. Emergence of drug-resistant influenza virus: population dynamical considerations. *Science* 2006; 31.
86. Brockmann S. O., Schwehm M., Duerr H. P., Witschi M., Koch D., Vidondo B., Eichner M. Modeling the effects of drug resistant influenza virus in a pandemic. *Vir J* 2008; 5: 133–138.