



УДК 547.597;578.828;615.281.8

СИНТЕЗ И ПРОТИВОЛЕЙКОЗНАЯ АКТИВНОСТЬ N-[1-(1-АДАМАНТИЛ)ЭТИЛ]-3-ГИДРОКСИЛУП-20(29)- ЕН-28-АМИДА¹

© 2025 г. К. А. Бармина*, И. И. Кулаков**, В. С. Власенко*, Н. Н. Новикова*,
Е. А. Вишневский*, И. В. Кулаков**, #

* ФГБНУ “Омский аграрный научный центр”, Россия, 644012 Омск, просп. Королева, 26

** Тюменский государственный университет, Школа естественных наук,
Россия, 625003 Тюмень, ул. Перекопская, 15а

Поступила в редакцию 27.02.2025 г.

После доработки 16.03.2025 г.

Принята к публикации 20.03.2025 г.

Представлены результаты по синтезу нового амидного производного бетулиновой кислоты – N-[1-(1-адамантил)этил]-3-гидроксилуп-20(29)-ен-28-амида, содержащего в структуре фармакофорную 1-(1-адамантил)этиламинную группу, и оценке его противовирусного действия *in vitro* и *in vivo*. Действие исследуемого соединения на вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС), находящийся в свежеполученной культуре лимфоцитов периферической крови от больной лейкозом коровы, изучали с помощью реакции прямой иммунофлуоресценции (пРИФ) путем двукратных его разведений (от 1000 до 0.48 мкг/мл) при 24-часовой инкубации в термостате. Установлено, что минимальная ингибирующая доза соединения составила 31.2 мкг/мл, о чем свидетельствовало отсутствие специфического свечения антиген-антительного комплекса в пРИФ. В то же время препарат сравнения римантадин не оказывал ингибирующего влияния на ВЛКРС. На следующем этапе был проведен эксперимент на морских свинках линии агути ($n = 25$). Животных опытных групп ($n = 5$) внутрибрюшинно инфицировали клеточной взвесью лимфоцитов, выделенной от больной лейкозом коровы, а затем подкожно вводили исследуемое соединение: 1-й группе – однократно за 2 ч до инфицирования в дозе 40 мкг/мг; 2-й группе – двукратно в той же дозе (за 2 ч до и на 7-е сутки после инфицирования); 3-й группе – трехкратно в той же дозе (за 2 ч до и на 7-е и 14-е сутки после инокуляции клеточной взвеси); 4-й группе препарат не вводили (положительный контроль). Животным контрольной группы ($n = 5$) вводили физиологический раствор. По результатам диагностических исследований в реакциях прямой и непрямой иммунофлуоресценции (нРИФ), а также ПЦР показано, что наиболее высокую противолейкозную активность исследуемое соединение проявляло во 2-й и 3-й группах морских свинок, в которых после 2–3-кратного его введения к 150-м суткам от начала эксперимента была выявлена провирусная ДНК ВЛКРС, а также специфическая флуоресценция лимфоцитов только у 20% животных. Полученные результаты позволяют рекомендовать исследуемое соединение для проведения испытаний на крупном рогатом скоте с целью профилактики развития и лечения клинко-гематологической формы лимфоидного лейкоза у животных, спонтанно инфицированных ВЛКРС.

Ключевые слова: лейкоз КРС, противовирусная активность, бетулин, бетулиновая кислота, амид бетулиновой кислоты, римантадин, морские свинки

DOI: 10.31857/S0132342325040116, **EDN:** LNWNEY

ВВЕДЕНИЕ

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) представляет собой онкогенный ретровирус, относящийся к роду *Deltaretrovirus* (семейство *Retroviridae*), который поражает преимущественно

В-лимфоциты и вызывает персистирующую инфекцию с различными клиническими исходами у крупного рогатого скота. Имея широкое распространение во всем мире, болезнь наносит значительный экономический ущерб вследствие сокращения производства молока, невозможности

¹ Статья посвящается нашему другу, коллеге и учителю, д-ру ветеринар. наук, профессору А.П. Красикову.

Сокращения: ВЛКРС – вирус лейкоза крупного рогатого скота; пРИФ – прямая реакция иммунофлуоресценции.

Автор для связи: (тел.: +7 (912) 077-59-57; эл. почта: i.v.kulakov@utmn.ru).

экспорта животных, семени и эмбрионов, а также смертности, связанной с лимфомой [1, 2]. В недавно опубликованной обзорной статье [3] представлено всестороннее исследование ВЛКРС, охватывающее его геномную структуру, эпидемиологию, способы передачи, клинические симптомы, методы обнаружения, опасности и стратегии контроля, что дает важную информацию многим ученым для будущих исследований.

В ранних наблюдениях не была доказана восприимчивость клеток человека к инфекции ВЛКРС, но в последние годы появляется все больше свидетельств о присутствии этого вируса у людей. Так, недавно проведенные исследования выявили фрагменты нуклеиновой кислоты вируса в тканях рака молочной железы человека, подтверждая гипотезу о том, что ВЛКРС – зоонозный агент [3–5].

В отсутствие эффективного лечения и вакцинации борьба с инфекцией ВЛКРС основана преимущественно на профилактических мерах, направленных на снижение передачи вируса, которые, за исключением некоторых стран ЕС, оказались безуспешными, прежде всего из-за огромных экономических затрат, необходимых для их реализации [6, 7].

В связи с этим крайне важно не только выявлять, диагностировать и контролировать распространение ВЛКРС на ранней стадии, но и проводить поиск новых терапевтических и профилактических стратегий. Несмотря на отсутствие официально одобренных вакцин и лекарственных средств против ВЛКРС, в настоящее время основные мероприятия по борьбе с ВЛКРС можно условно разделить на два направления: разработка новых экспериментальных вакцин и синтез новых противовирусных соединений. Так, в своей недавней работе [8] авторы на основе ослабленного провируса ВЛКРС путем удаления некоторых генов, не зависящих от инфекционности, разработали и испытали новую экспериментальную вакцину, которая показала достаточно высокую способность защиты от естественного заражения телят от лейкозной инфекции.

Весьма актуальным остается и поиск новых природных соединений и их производных, эффективно снижающих уровень провирусной нагрузки при инфекции ВЛКРС. Так, в недавней работе [9] авторами был выделен достаточно простой метаболит грибка *violaceoid* E ((4*R*,5*S*)-3-гепт-1-енил-4,5-дигидрокси-2-(гидроксиметил)-циклогекс-2-ен-1-он), который в опытах *in vitro* препятствовал репликации вируса лейкоза крупного рогатого скота и снижал его транскрипционную активность.

В работе [10] было показано, что выделенные ранее из гриба *Talaromyces* sp. метаболиты *vanitarasin* A, B и C, содержащие в своей структуре базовый 1,2,3,4,5,6,7,8-октагидрофенантроновый цикл, также проявляют активность в отношении ВЛКРС.

Эти результаты подтверждают, что некоторые природные метаболиты и их производные с конденсированной системой алициклов могут оказаться эффективными скаффолдами в разработке новых препаратов против ВЛКРС.

Одним из таких стартовых природных объектов для возможной химической модификации в поиске новых противовирусных препаратов могут служить лупановые тритерпеноиды: бетулин (I), бетулоновая (II) и бетулиновая (III) кислоты (схема 1) и их производные, обладающие разнообразными биологическими свойствами и не вызывающие при этом каких-либо побочных эффектов [11].

О биологических эффектах лупановых тритерпеноидов известно с XIX века. В 1899 г. Вилер указал на антисептические свойства бетулина [12]. Бетулин (I) и его производные выступают перспективными ингибиторами безоболочечного РНК-содержащего вируса ЕСНО6, относящегося к возбудителям полиомиелита, риновирусной инфекции, лихорадочных и респираторных заболеваний. Показана активность бетулина и его производных в отношении вируса гриппа типа А [13], т.е. производные бетулина представляют интерес для медицины в качестве основы для разработки новых противовирусных агентов. Про-

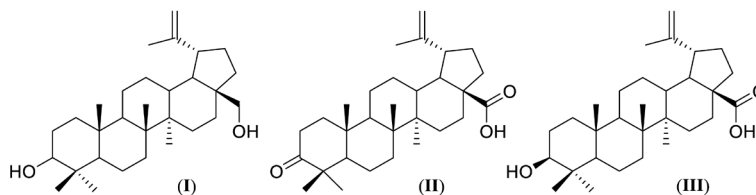


Схема 1. Структурные формулы бетулина (I) и его производных – бетулоновой (II) и бетулиновой (III) кислот.

изводные бетулина обладают также гипополипидемическим действием [14].

Бетулиновая кислота (3 β -гидрокси-луп-20(29)-ен-28-овая кислота) (III), выделенная в начале прошлого века под названием гратиолон [13], привлекла внимание исследователей в последнее десятилетие в связи с обнаружением у нее ряда полезных биологических свойств. Бетулиновая кислота обладает выраженной противоопухолевой активностью [15, 16] и противовоспалительными свойствами [17], способна стимулировать синтез коллагена в коже даже в большей степени, чем аскорбиновая кислота [18]. В 1994 г. была обнаружена анти-ВИЧ-активность бетулиновой и родственной ей платановой кислот, выделенных из листьев растения *Zyzygium claviflorum* [19], что послужило мощным стимулом для синтеза ее производных. Бетулиновая кислота подавляет репродукцию ВИЧ-1 в культуре клеток Н9-лимфоцитов [20]. Бетулин и бетулиновая кислота, активируя гуморальный иммунитет, также показали активность против микробактерии *Mycobacterium bovis*, возбудителя туберкулеза у крупного рогатого скота [21]. Среди производных бетулина и бетулиновой кислоты обнаружены ингибиторы вируса герпеса простого типа I [22]. Противовирусная активность производных лупановых тритерпеноидов сочетается с выраженным иммуностимулирующим действием [23].

Химическая модификация бетулиновой кислоты приводит к получению ее аналогов, обладающих в ряде случаев более высокой анти-ВИЧ-1-активностью. На основании большого числа экспериментальных исследований получены обнадеживающие данные по взаимосвязи “структура–активность”. Так, в обзоре [16], посвященном последним достижениям лаборатории природных продуктов Северной Каролины (США), показано, что производные бетулиновой кислоты превосходят активность 3'-азидо-3'-дезокситимидина (торговое название “Зидовудин”) – первого средства против ВИЧ.

Как показано в работе [24], среди производных лупановых тритерпеноидов, в т.ч. со сложноэфирной и амидной связью, обнаружены вещества с противовирусной активностью.

Таким образом, мы приходим к выводу, что бетулин и его производные обладают разнообразной ярко выраженной биологической активностью. Если бетулин довольно широко исследован в плане биологической активности, в том числе активно изучено его положительное применение в животноводстве и птицеводстве, то каких-либо

литературные данные по применению бетулоновой, бетулиновой кислот и их производных практически отсутствуют. В связи с этим представляет огромный интерес осуществление целенаправленной химической модификации бетулиновой кислоты (III) и проведение биологических исследований ее производных *in vivo* на примере различных животных для возможного лечения инфекционных болезней, в том числе смешанной этиологии.

Цель данной работы – синтез нового биологически активного соединения – амида бетулиновой (3 β -гидрокси-луп-20(29)-ен-28-овая кислота (V) – и изучение его противовирусной активности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез бетулиновой кислоты и его производного. Бетулиновая кислота получена в две стадии окислением бетулина (I) реактивом Джонса до бетулоновой кислоты (II), а затем ее восстановлением натрийборгидридом в изопропанол с получением мажорного природного биоактивного 3 β -эпимера (легко очищаемого от минорного 3 α -изомера простой перекристаллизацией). В качестве аминной функции в синтезе соединения (V) применяли синтетическое производное адамантана – рацемический 1-(адамантан-1-ил)этан-1-амин (IV). Выбор в качестве нового фармакофора аминопроизводного адамантана (римантадина), с одной стороны, обусловлен его широкой противовирусной активностью (против вирусов гриппа А, простого герпеса типа I и II, клещевого энцефалита), а с другой – он оказывает антитоксическое и иммуномодулирующее действие и, кроме того, индуцирует выработку α - и γ -интерферонов, а также увеличивает функциональную активность Т- и В-лимфоцитов [25, 26]. Сочетание в одной молекуле (V) таких двух фармакофоров (бетулиновой кислоты (III) и 1-(адамантан-1-ил)этан-1-амин (IV)) на наш взгляд может привести к усилению противовирусных свойств.

Модификацию бетулиновой (3 β -гидрокси-20(29)-лупаен-28-овой) кислоты (III), полученной по методике [27], проводили с гидроклоридом 1-(адамантан-1-ил)этан-1-амин (V) через стадию получения *in situ* (без выделения) соответствующего хлорангидрида бетулиновой кислоты хлористым тионилем в растворе диметилформамида в присутствии поташа (схема 2). Строение синтезированного N-[1-(1-адамантил)этил]-3-гидрокси-луп-20(29)-ен-28-амида (V) подтверждено с помощью ^1H -, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения.

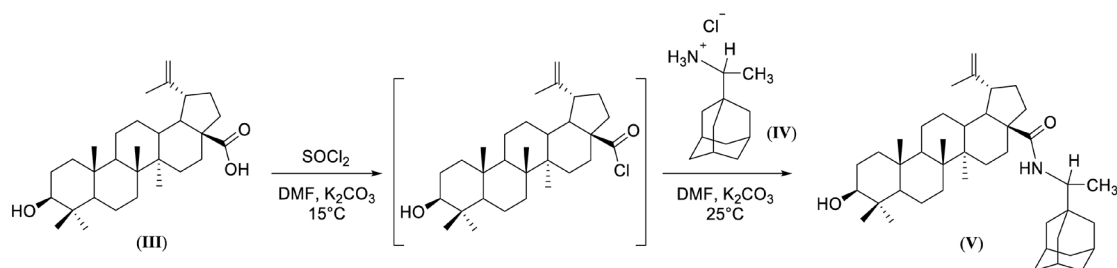


Схема 2. Синтез *N*-[1-(1-адамантил)этил]-3-гидроксилуп-20(29)-ен-28-амида (V).

Оценку противовирусного действия полученного соединения (V) проводили в культуре лимфоцитов периферической крови и на морских свинках, которые были инфицированы клеточной взвесью лимфоцитов, выделенной от коровы, больной лейкозом в гематологической стадии.

Противовирусная активность *in vitro*. Оценку действия соединения (V) проводили в 96-луночных пластиковых иммунологических планшетах по результатам прямой реакции иммунофлуоресценции (пРИФ). С этой целью культуру лимфоцитов периферической крови, содержащую ВЛКРС, инкубировали в термостате с исследуемыми веществами (соединение (V), бетулиновая кислота (III) и препарат сравнения римантадин), растворенными методом последовательных разведений в поддерживающей среде в концентрациях 1000, 500, 250 ... 0.48 мкг/мл. В качестве контроля определяли титр ВЛКРС в культуре лимфоцитов

до и после инкубации с поддерживающей средой без исследуемого вещества.

Титр вируса в контрольной культуре лимфоцитов периферической крови (без внесения веществ) перед инкубацией, а также инкубируемых в течение 24 ч в термостате при 37°C при пониженном доступе воздуха был неизменным и соответствовал 1 : 1024, а специфическое свечение антигена оценивали в четыре креста. Идентичную картину наблюдали после 24-часовой инкубации культуры клеток с препаратами сравнения – римантадином и бетулиновой кислотой (III), что свидетельствовало об отсутствии их ингибирующего действия на ВЛКРС (табл. 1). В то же время внесение исследуемого соединения (V) с концентрацией от 1000 до 31.2 мкг/мл способствовало подавлению вирусной активности, на что указывало полное отсутствие или наличие слабого свечения, которое обозначили “++” в табл. 1.

Таблица 1. Противовирусная активность соединения (V) *in vitro* в сравнении с римантадином и бетулиновой кислотой

№	Разведения исследуемого препарата, мкг/мл	Контроль без препарата	Соединение (V)	Римантадин	Бетулиновая кислота (III)
1	1 : 1000	++++	—	++++	++++
2	1 : 500	++++	++	++++	++++
3	1 : 250	++++	++	++++	++++
4	1 : 125	++++	++	++++	++++
5	1 : 62.5	++++	++	++++	++++
6	1 : 31.2	++++	++	++++	++++
7	1 : 15.6	++++	++++	++++	++++
8	1 : 7.8	++++	++++	++++	++++
9	1 : 3.9	++++	++++	++++	++++
10	1 : 1.95	++++	++++	++++	++++
11	1 : 0.97	++++	++++	++++	++++
12	1 : 0.48	++++	++++	++++	++++

Примечание: (++++) – очень яркая люминесценция, четко контрастирующая на темном фоне; (+++) – яркая люминесценция; (++) – слабое свечение; (–) – отсутствие люминесценции.

На рис. 1а показана отрицательная реакция, свидетельствующая об инактивации вируса в культуре лимфоцитов после 24-часовой инкубации, а на рис. 1б – положительная реакция в контрольной лунке без внесения исследуемых веществ.

Противовирусная активность *in vivo*. Для оценки противовирусной активности 25 морских свинок были разделены на пять равных групп ($n = 5$). Животным 1–3-й групп за 2 ч до инфицирования ВЛКРС вводили подкожно соединение (V) в дозе 40 мкг/кг, затем особям 2-й группы производили повторную инъекцию соединения (V) на 7-е сутки, а 3-й группы – на 7- и 14-е сутки тем же способом. Особи 4-й группы после инокуляции вирусосодержащей клеточной взвеси соединение (V) не получали, а животные 5-й группы служили в качестве контроля (интактные).

Через 21, 45, 90 и 150 суток после инфицирования ВЛКРС у морских свинок проводили отбор проб крови для оценки инфекционного статуса.

По результатам диагностических исследований с помощью ПЦР и пРИФ у морских свинок, инфицированных ВЛКРС, которых не подвергали обработке соединением (V) (4-я группа), к 150-м суткам от начала эксперимента была обнаружена ДНК провируса ВЛКРС, а также показано специфическое свечение антиген-антительного комплекса в мазках крови (рис. 2а) в 100% случаев. В контрольной группе животных результат ПЦР и пРИФ был отрицательным (рис. 2б) у всех животных (табл. 2).

При однократном введении соединения (V) инфицированным животным (1-я группа) к 90-м суткам от начала эксперимента наблюдали отсутствие ПЦР-положительных проб, но, несмотря на это, специфическую иммунофлуоресценцию в мазках крови отмечали у четырех из пяти морских свинок.

Наиболее высокую противовирусную активность соединение (V) проявляло при неоднократном его введении. Так, во 2-й опытной группе на 21-е сутки после инокуляции ВЛКРС отмечали специфическую флуоресценцию лимфоцитов у 100% особей, на 45-е – у 60%, на 90-е – у 20% и на 150-е сутки – ее отсутствие. В то же время провирусная ДНК была выявлена у только одного животного во все сроки исследования, за исключением 45-х суток, когда были обнаружены две

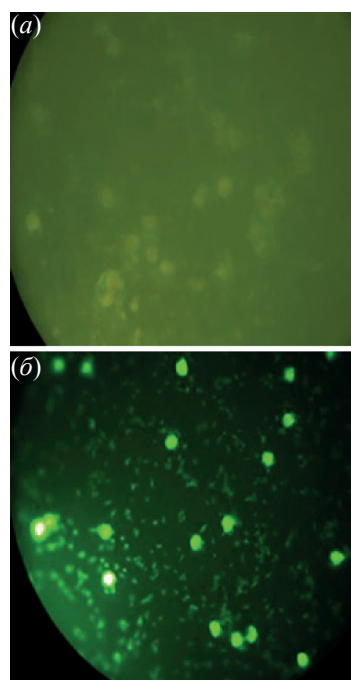


Рис. 1. Реакция иммунофлуоресценции прямым методом в культуре лимфоцитов: (а) – отрицательная реакция после воздействия исследуемых веществ; (б) – положительная реакция в контрольной лунке без внесения исследуемых веществ, увеличение $\times 100$.

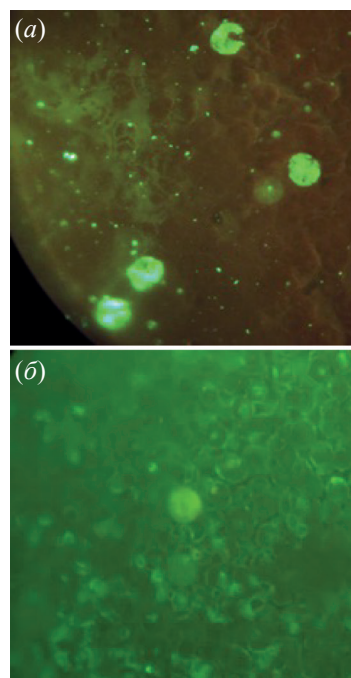


Рис. 2. Реакция иммунофлуоресценции прямым методом в мазках крови: (а) – положительная реакция у морских свинок, инфицированных ВЛКРС (4-я группа, положительный контроль); (б) – отрицательная реакция у интактных морских свинок (5-я группа, отрицательный контроль).

Таблица 2. Противовирусная активность соединения (V) *in vivo*

Группа животных	Метод исследования	Срок после инфицирования, сут			
		21	45	90	150
1-я группа	ПЦР	3/5	2/5	0/5	0/5
	пРИФ	5/5	4/5	4/5	4/5
2-я группа	ПЦР	1/5	2/5	1/5	1/5
	пРИФ	5/5	3/5	1/5	0/5
3-я группа	ПЦР	0/5	1/5	1/5	1/5
	пРИФ	1/5	2/5	2/5	1/5
4-я группа	ПЦР	2/5	2/5	4/5	5/5
	пРИФ	5/5	4/5	5/5	5/5
Контроль	ПЦР	0/5	0/5	0/5	0/5
	пРИФ	0/5	0/5	0/5	0/5

Примечание: числитель – количество животных с положительной реакцией, знаменатель – количество животных в группе.

ПЦР-положительные морские свинки. Схожая картина наблюдалась у особей, подвергнутых трехкратной обработке испытуемым соединением (3-я группа), но с той разницей, что уже на 21-е сутки от начала эксперимента только у одного животного регистрировали положительную пРИФ.

Эти результаты также подтверждали тестированием сывороток крови с помощью реакции непрямой иммунофлуоресценции (нРИФ) на наличие антител (табл. 3). На протяжении всего эксперимента титр антител в 4-й группе (положительный контроль) находился на высоком уровне, несмотря

на его снижение по мере увеличения срока исследования. Так, к 150-м суткам титр антител составил от 1 : 128 и выше.

У морских свинок, обработанных соединением (V), особенно у которых при диагностическом исследовании мазков крови регистрировали отрицательную нРИФ, отмечали очень низкий титр антител. Так, в 1-й группе титр антител составил 1 : 8, во 2-й – не более 1 : 16 и в 3-й группе – 1 : 4. В то же время у животных этих же групп, имеющих статус нРИФ (+), титр антител был значительно выше – от 1 : 64 и более.

Таблица 3. Титр антител в сыворотке крови морских свинок в разные сроки после инфицирования

Группа животных	Статус животных	Срок после инфицирования, сут			
		21	45	90	150
1-я группа	пРИФ (–)	н/и	1 : 16	1 : 16	1 : 8
	пРИФ (+)	≥1 : 256	≥1 : 256	≥1 : 128	≥1 : 64
2-я группа	пРИФ (–)	н/и	≤1 : 64	≤1 : 64	≤1 : 16
	пРИФ (+)	≥1 : 256	≥1 : 256	≥1 : 128	н/и
3-я группа	пРИФ (–)	≤1 : 64	≤1 : 16	1 : 8	1 : 4
	пРИФ (+)	1 : 1024	1 : 128	1 : 64	1 : 64
4-я группа	пРИФ (–)	н/и	1 : 128	н/и	н/и
	пРИФ (+)	≥1 : 512	≥1 : 256	≥1 : 128	≥1 : 128

Примечание: н/и – не исследованы по причине отсутствия животных данного статуса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и оборудование. Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР регистрировали на спектрометре Jeol ECX 400A (Япония) с рабочей частотой 400.13 МГц. Химические сдвиги измеряли по отношению к сигналу внутреннего стандарта –

тетраметилсилана. Масс-спектр и точные измерения молекулярной массы производили на масс-спектрометре высокого разрешения Double Focusing System (DFS, Thermo Electron Corp., США) в режиме электронной ионизации с энергией ионизирующих электронов 70 эВ. Образцы

в металлической вials ввели в масс-спектрометр при помощи системы прямого ввода. Измерения точных масс ионов проводили относительно линий стандарта — перфторкеросина (ПФК). Контроль за ходом реакции и чистотой полученных соединений осуществляли методом ТСХ на пластинках Sorbfil (Sorbfil, Россия), проявление осуществляли парами иода или УФ-светом. Температуру плавления определяли на приборе Stuart SMP10 (Stuart, Великобритания).

Бетулиновая (3β-гидрокси-20(29)-лупаен-28-овая) кислота (III). Синтез бетулиновой кислоты проводили по методике [28]. Выход 90%, белые кристаллы, т. пл. 287–290°C. При этом, согласно данным [29], после нескольких перекристаллизаций был выделен мажорный биологически активный 3β-эпимер бетулиновой кислоты. ИК- и ^1H -, ^{13}C -ЯМР-спектры кислоты (III) соответствовали представленным в литературе.

Синтез N-[1-(1-адамантил)этил]-3-гидрокси-луп-20(29)-ен-28-амида (V). Раствор 3.65 г (8 ммоль) бетулиновой кислоты и 1.67 г (12 ммоль) поташа в 60 мл ДМФА перемешивали 0.5 ч при 15°C. После этого к раствору прикапывали 2.9 мл (40 ммоль) тионилхлорида. Перемешивание реакционной смеси продолжали при комнатной температуре в течение 5 ч, затем добавляли еще 2.22 (16 ммоль) поташа и через 15 мин 1.73 г (8 ммоль) гидрохлорида римантадина. Через 24 ч раствор с осадком солей фильтровали через бумажный складчатый фильтр в стакан со смесью 150 мл воды и 150 г льда. Выпавший осадок фильтровали, промывали водой до нейтральной среды и сушили на воздухе. Продукт очищали колоночной хроматографией (элюент CH_2Cl_2 –*i*-PrOH (4 : 1)) на силикагеле. Выход 3.40 г (69%), мелкокристаллический осадок светло-бежевого цвета, т. пл. 260–262°C. Спектр ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3): 0.66 (уш. д, 1H, *J* 9.2, H-5), 0.73 (с, 3H, 24-CH₃), 0.79 (с, 3H, 26-CH₃), 0.80–0.87 (м, 1H, H-1_b), 0.90 (с, 3H, 23-CH₃), 0.94 (с, 6H, 25-CH₃, 27-CH₃), 0.97–1.07 (м, 1H, H-12_b), 1.13 (д, 3H, *J* 7.6, NHCHNCH₃), 1.17–1.43 (м, 9H, H-15_b, H-9, H-11_b, H-21_b, H-22_b, H-11_a, H-6_b, CH₂-7), 1.43–1.52 (м, 6H, H-6_a, H-16_b, H-15_a, H-18, CH₂-2), 1.53–1.60 (м, 6H, H-2,8,9 Ad); 1.66 (с, 3H, 30-CH₃), 1.60–1.74 (м, 9H, H-4,6,10 Ad, H-22_a, H-1_a, H-12_a), 2.02 (уш. с., 3H, H-3,5,7 Ad), 2.20–2.30 (м, 3H, H-13, H-16_a, H-21_a), 2.69 (к, *J* 6.10, 1H, H-1 Ad), 3.02 (дт, 1H, *J* 10.7, 5.3, H-19), 3.17 (дд, 1H, *J* 12.2, 4.6, H-3),

4.57 (уш. с., 1H, H-29_b), 4.69 (с, 1H, H-29_a), 5.77 (уш. с., 2H, NH, OH). ^{13}C -ЯМР (101 МГц, CDCl_3): 14.3, 14.6, 15.4, 16.0, 16.1, 18.2, 19.3, 20.9, 25.5, 27.3, 28.0, 28.2 (3C, C-3,5,7 Ad), 29.7, 30.7, 32.5, 34.3, 35.0, 36.9 (3C, C-4,6,10 Ad), 37.1, 37.3, 37.8 (3C, C-2,8,9 Ad), 38.2, 38.6, 38.8, 40.6, 42.4, 47.1, 49.2, 50.4, 55.3, 55.8, 56.5, 78.9 (COH), 109.3 (C=CH₂), 151.1 (C=CH₂), 181.6 (C=O). Нумерация атомов приведена на схеме 3.

Масс-спектр высокого разрешения (HRMS) *m/z* рассчитано для $\text{C}_{42}\text{H}_{67}\text{NO}_2^+ [M]^+$: 617.5172; найдено $(\text{C}_{42}\text{H}_{65}\text{NO}_2)^+ [M - 2]^+$: 615.5025, рассчитано для $(\text{C}_{42}\text{H}_{65}\text{NO}_2)^+ [M - 2]^+$: 615.5015.

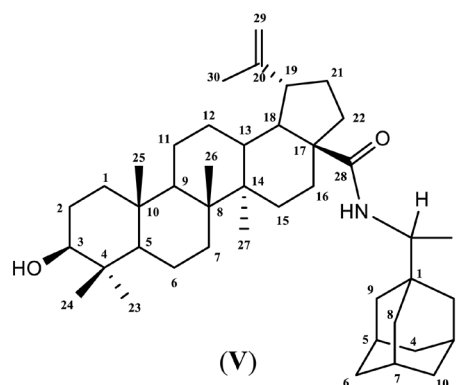


Схема 3. Структурная формула полученного N-[1-(1-адамантил)этил]-3-гидрокси-луп-20(29)-ен-28-амида (V).

Противовирусная активность *in vitro*. В пластиковый иммунологический планшет с 96 лунками вносили по 0.1 мл культуры лимфоцитов, выделенных из свежеполученной стабилизированной крови от коровы, находящейся в гематологической стадии лейкоза, при градиенте плотности 17%-ного раствора тразографа [30]. Затем на лимфоциты наслаивали в том же объеме (0.1 мл) поддерживающую среду, содержащую исследуемые вещества (соединение (V), бетулиновая кислота (III) и римантадин (ПАО “Биосинтез”, Россия) с кратностью разведения 1 : 2, начиная с концентрации 1000 до 0.48 мкг/мл. Планшет с закрытой крышкой помещали в эксикатор для создания условий пониженного доступа воздуха и инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 ч. По истечении времени осуществляли постановку реакции прямой иммунофлуоресценции [31]. В качестве контроля иммунофлуоресцентным методом определяли титр ВЛКРС в культуре лим-

фоцитов периферической крови до инкубации, а также после инкубации в термостате с поддерживающей средой без исследуемого вещества.

Противовирусная активность *in vivo*. Для эксперимента отбирали 25 морских свинок, из которых формировали пять групп по пять особей в каждой. Животных первых четырех групп внутрибрюшинно инфицировали вирусосодержащей клеточной взвесью лимфоцитов, выделенной от коровы, больной лейкозом в гематологической стадии, в объеме 1 мл [32]. Особям 1-й группы вводили однократно за 2 ч до инфицирования подкожно соединение (V) в дозе 40 мкг/кг; 2-й группы – двукратно, за 2 ч до и на 7-е сутки после инфицирования тем же способом; 3-й группы – трехкратно, за 2 ч до и на 7- и 14-е сутки после инокуляции вирусной суспензии тем же способом. Морским свинкам 4-й группы соединение (V) не вводили (положительный контроль). Остальные пять особей (5-я группа) оставались интактными и служили в качестве отрицательного контроля.

На 21-е, 45-е, 90-е и 150-е сутки после инфицирования производили отбор проб крови из ретроорбитального венозного сплетения с помощью микропипетки для оценки инфекционного статуса животных с помощью иммунофлуоресцентных методов диагностики нРИФ и пРИФ, а также ПЦР.

Динамику титра антител определяли в нРИФ путем микротитрования сыворотки крови морских свинок в 96-луночной планшете для иммунологических исследований методом двукратных последовательных разведений в соответствии с методическими рекомендациями [33]. В качестве компонентов реакции были взяты гомологичные иммунные сыворотки, а также кроличья люминесцирующая сыворотка против глобулинов морской свинки (ФГБУ “НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России). Микроскопию мазков осуществляли на микроскопе AxioStar Plus (Carl Zeiss, Германия), используя 4-крестную систему со специфическим свечением не менее чем на три креста.

Антиген ВЛКРС определяли в мазках крови путем постановки пРИФ с применением диагностических флуоресцирующих иммуноглобулинов против ВЛКРС в титрах 1 : 640 – 1 : 1280 в соответствии с методическими рекомендациями [34]. Микроскопию также осуществляли на микроскопе AxioStar Plus по 4-крестной системе.

Выделение ДНК провируса ВЛКРС из крови морских свинок, а также постановку ПЦР проводили в соответствии с инструкцией производителя по применению коммерческих наборов. В работе использовали комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала ДНК-сорб-В, а также тест-систему “ЛЕЙКОЗ” для выявления вируса крупного рогатого скота методом ПЦР вариант FRT50 F (ФБУН “ЦНИИ эпидемиологии” Роспотребнадзора). Амплификацию осуществляли на анализаторе-термоциклере для детекции нуклеиновых кислот методом ПЦР в реальном времени ICycler iQ5 (Bio-Rad, США).

Статистический анализ. Достоверность различий между группами оценивали по *t*-критерию Стьюдента в программе Microsoft Excel. Различия результатов считали статистически достоверными при уровне значимости $p \leq 0.05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных диагностических исследований можно констатировать, что соединение (V) оказывало выраженное ингибирующее воздействие на ВЛКРС как в свежеполученной культуре лимфоцитов периферической крови от больной лейкозом коровы, так и в организме морских свинок, экспериментально инфицированных ВЛКРС. Минимальная подавляющая доза соединения (V) в культуре лимфоцитов составила 31.2 мкг/мл, а наиболее высокая противовирусная эффективность наблюдалась у морских свинок при 2–3-кратном введении исследуемого соединения.

Полученные положительные результаты позволяют предположить возможное использование соединения (V) в области ветеринарии, вирусологии и фармакологии для профилактики развития и лечения клинико-гематологической формы лимфоидного лейкоза у животных, спонтанно инфицированных ВЛКРС.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено в “Центре природовдохновленного инжиниринга” ТюмГУ при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках стратегического проекта “Приоритет-2030” (национальный проект “Наука и университеты”), а также в рамках государственного задания Минобрнауки Омского аграрного научного центра по теме: FNUN-2022-0035 “Разработать эффективную систему обеспечения продовольственной и биологи-

ческой безопасности на основе создания новых биологических препаратов для диагностики и профилактики социально-значимых болезней животных, оптимизации технологии кормопроизводства и анализа селекции племенного дела” (№ гос. рег. 122070700055-5).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей в качестве объектов исследования.

Все исследования на морских свинках проведены в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других целях от 18.03.1986 (Protocol of Amendment to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS no. 170)).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

КАБ, ННН и ЕАВ провели биологические исследования; ИИК – подготовка и характеристика соединений; ВСВ и ИВК – подготовка оригинального текста и его финальное редактирование.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ruiz V., Porta N.G., Lomónaco M., Trono K., Alvarez I. // *Front. Vet. Sci.* 2018. V. 5. P. 267–273. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00267>
2. Bartlett P.C., Ruggiero V.J., Hutchinson H.C., Droscha C.J., Noby B., Sporer K.R.B., Taxis T.M. // *Pathogens*. 2020. V. 9. P. 1058. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121058>.
3. Lv G., Wang J., Lian S., Wang H., Wu R. // *Animals*. 2024. V. 14. P. 297. <https://doi.org/10.3390/ani14020297>
4. Canova R., Weber M.N., Budaszewski R.F., da Silva M.S., Schwingel D., Canal C.W., Kreutz L.C. // *One Heal*. 2021. V. 13. P. 100252. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100252>.
5. Olaya-Galán N.N., Blume S., Tong K., Shen H., Gutierrez M.F., Buehring G.C. // *Front. Microbiol.* 2022. V. 13. P. 793348. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.793348>
6. Rodríguez S.M., Florins A., Gillet N., de Brogniez A., Sánchez-Alcaraz M.T., Boxus M., Boulanger F., Gutiérrez G., Trono K., Alvarez I., Vagnoni L., Willems L. // *Viruses*. 2011. V. 3. P. 1210–1248. <https://doi.org/10.3390/v3071210>
7. Gutiérrez G., Rodríguez S.M., de Brogniez A., Gillet N., Golime R., Burny A., Jaworski J.P., Alvarez I., Vagnoni L., Trono K., Willems L. // *Viruses*. 2014. V. 6. P. 2416–2427. <https://doi.org/10.3390/v6062416>
8. Suárez Archilla G., Gutiérrez G., Camussone C., Calvino L., Abdala A., Alvarez I., Petersen M., Franco L., Destefano G., Monti G., Jacques J.-R., Joris T., Willems L., Trono K. // *Front. Immunol.* 2022. V. 13. P. 980514. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.980514>.
9. Murakami H., Murakami-Kawai M., Kamisuki S., Hisanobu Sh., Tsurukawa Yu., Uchiyama J., Sakaguchi M., Tsukamoto K. // *Virology*. 2021. V. 562. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.06.010>
10. Kamisuki S., Shibasaki H., Murakami H., Fujino K., Tsukuda S., Kojima I., Ashikawa K., Kanno K., Ishikawa T., Saito T., Sugawara F., Wataishi K., Kuramochi K. // *J. Antibiot.* 2023. V. 76. P. 75–82. <https://doi.org/10.1038/s41429-022-00585-9>.
11. Толстиков Г.А., Флехтер О.Б., Шульц Э.Э., Балтина Л.А., Толстиков А.Г. // *Химия в интересах устойчивого развития*. 2005. № 13. С. 1–30.
12. Wheeler J. // *Pharm. J.* 1899. V. 12. P. 494.
13. Boreko E.I., Pavlova N.I., Savinova O.V. // *News Biomed. Sci.* 2002. V. 3. P. 86.
14. Ohara S., Hishiyama S. // *Mokuzai Gakkaishi*. 1994. V. 40. P. 444–451.
15. Pisha E., Chai H., Lee I.S., Chagwedera T.E., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Beecher C.W., Fong H.H., Kinghorn A.D., Brown D.M., Wani M.C., Wall M.E., Hieken T.J., Das Gupta T.K., Pezzuto J.M. // *Nature Med.* 1995. V. 1. P. 1046–1051. <https://doi.org/10.1038/nm1095-1046>
16. Selzer E., Thallinger C., Hoeller C., Oberkleiner P., Wacheck V., Pehamberger H., Jansen B. // *Mol. Med.* 2002. V. 8. P. 877–884. <https://doi.org/10.1007/BF03402094>
17. Recio C.M., Giner R.M., Manes S., Gueho J., Julien H.R., Hostettmann K., Ríos J.L. // *Planta Med.* 1995. V. 61. P. 9–12. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957988>
18. Cho S.H., Gottlieb K., Santhanam U. // *Eur. Pat. Appl.* EP 717983, 1996.
19. Fujioka T., Kashiwada Y., Kilkuskie R.E., Cosentino L.M., Ballas L.M., Jiang J.B., Janzen W.P., Chen I.S., Lee K.H. // *J. Nat. Prod.* 1994. V. 57. P. 243–247. <https://doi.org/10.1021/np50104a008>

20. Kashiwada Y., Hashimoto F., Cosentino L.M., Chen C.H., Garrett P.E., Lee K.H. // *J. Med. Chem.* 1996. V. 39. P. 1016–1017.
<https://doi.org/10.1021/jm950922q>
21. Koshkin I.N., Vlasenko V.S., Pleshakova V.I., Alkhimova L.E., Elyshev A.V., Kulakov I.V. // *Vaccines*. 2022. V. 10. P. 2084.
<https://doi.org/10.3390/vaccines10122084>.
22. Carlson R.M., Krasutsky P.A., Karim M.R.U. // *Patent US5750578*, 1998.
23. Толстиков Г.А., Петренко Н.И., Еланцева Н.В., Щульц Э.Э., Плясунова О.А., Илычева Т.Н., Борисова О.А., Проняева Т.Р., Покровский А.Г. // Патент RU 2211843 C1, 2003.
24. Pavlova N.I., Savinova O.V., Nikolaeva S.N., Boreko E.I., Flekhter O.B. // *Fitoterapia*. 2003. V. 74. P. 489–492.
[https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(03\)00123-0](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(03)00123-0)
25. Громова О.А., Торшин И.Ю. // *Медицинский алфавит. Современная поликлиника*. 2020. № 21. С. 33–48.
<https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-21-33-48>
26. Karako N.I., Boreko E.I., Kirillov V.A., Votiakov V.I. // *Vopr. Virusol.* 1989. V. 34. P. 43–46.
27. Koshkin I.N., Vlasenko V.S., Kulakov I.V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 837–844.
<https://doi.org/10.1134/S1068162021040142>
28. Flekhter O.B., Nigmatullina L.R., Baltina L.A., Galin F.Z., Tolstikov G.A., Boreko E.I., Pavlova N.I., Nikolaeva S.N., Savinova O.V., Eremin V.F. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2003. V. 29. P. 296–301.
<https://doi.org/10.1023/A:1023948919315>
29. Власенко В.С., Вишневский Е.А., Новикова Н.Н., Борисов Е.С. // *Методы диагностики и оценки предрасположенности молодняка крупного рогатого скота к инфицированию вирусом лейкоза: Методические рекомендации*. Омск, 2021. 22 с.
30. Новикова Н.Н., Власенко В.С., Вишневский Е.А., Бармина К.А. // Патент RU 2810589 C1, 2023.
31. Власенко В.С., Бармина К.А., Новикова Н.Н., Денгис Н.А., Вишневский Е.А. // Патент RU 2802150 C1, 2023.
32. Новикова Н.Н., Байсеитов С.Т., Власенко В.С., Красиков А.П. // *Применение реакции непрямой иммунофлюоресценции для диагностики лейкоза крупного рогатого скота: Методические рекомендации*. Алматы, 2020. 17 с.
33. Новикова Н.Н., Власенко В.С., Вишневский Е.А., Бармина К.А. // *Применение прямого метода реакции иммунофлюоресценции для диагностики лейкоза крупного рогатого скота: Методические рекомендации*. Омск, 2024. 20 с.

Synthesis and Anti-Leukemia Activity *N*-[1-(1-Adamantylethyl)-3-hydroxylup-20(29)-en-28-amide

K. A. Barmina*, I. I. Kulakov**, V. S. Vlasenko*, N. N. Novikova*,
E. A. Vishnevsky*, and I. V. Kulakov**, #

Phone: +7 (912) 077-59-57; e-mail: i.v.kulakov@utmn.ru

* Federal State Budgetary Scientific Institution "Omsk Agrarian Scientific Center",
prosp. Koroleva 26, Omsk, 644012 Russia

** School of Natural Sciences, Tyumen State University, ul. Perekopskaya 15a, Tyumen, 625003 Russia

The paper presents the results of synthesis of a new amide derivative of betulinic acid – *N*-[1-(1-adamantyl)-ethyl]-3-hydroxylup-20(29)-en-28-amide containing a pharmacophoric 1-(1-adamantyl)ethylamine group in its structure and evaluation of its antiviral action in vitro and in vivo. The effect of the preparation on the virus presents in a freshly obtained culture of peripheral blood lymphocytes from a cow with leukemia was studied by a micromethod using its two-fold dilutions (from 1000 to 0.48 µg/mL) with 24-h incubation in a thermostat. It was found that the minimum inhibitory dose of the substance was 31.2 µg/mL, as evidenced by the absence of specific luminescence of the antigen-antibody complex in the direct immunofluorescence reaction (DIF). At the same time, rimantadine had no inhibitory effect on the bovine leukemia virus. At the next stage, an experiment was conducted on agouti guinea pigs ($n = 25$). Animals of the experimental groups ($n = 5$) were infected intraperitoneally with a cell suspension of lymphocytes isolated from a cow sick with leukemia, and then the substance was injected subcutaneously: group 1 – once 2 h before infection at a dose of 40 µg/mg; group 2 – twice at the same dose (2 h before and on the 7th day after infection); group 3 – three times at the same dose (2 h before and on the 7th and 14th days after inoculation of the viral suspension); Group 4 did not receive the drug (positive control). Animals of the control group ($n = 5$) were injected with saline. Based on the results of diagnostic studies in direct and indirect immunofluorescence reactions (DIIF), as well as PCR, it was shown that the drug exhibited the highest anti-leukemic activity in the 2nd and 3rd groups of guinea pigs, in which, after 2–3 times the administration of the test substance, positive tests were noted in only 20% of animals by the 150th day from the start of the experiment. The obtained results allow us to recommend the studied compound for testing on cattle for the purpose of preventing the development and treatment of the clinical and hematological form of lymphoid leukemia in animals spontaneously infected with BLV.

Keywords: bovine leukemia, antiviral activity, betulin, betulinic acid, betulinic acid amides, rimantadine, guinea pigs