

Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека

На правах рукописи

Волобуева Александрина Сергеевна

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ
ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ РОДА
ENTEROVIRUS

1.5.10. Вирусология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Зарубаев Владимир Викторович

Санкт-Петербург - 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Энтеновирусы, современные представления и общая характеристика	15
1.1.1 Краткая история открытия энтеровирусов	15
1.1.2 Физико-химические свойства энтеровирусов	16
1.1.3 Таксономия энтеровирусов	17
1.1.4 Строение энтеровирусов	19
1.1.5 Цикл репродукции энтеровирусов.....	21
1.2 Роль вирусов рода <i>Enterovirus</i> в инфекционной патологии человека.....	25
1.3 Профилактика и лечение заболеваний, вызванных энтеровирусами	31
1.4 Разработка этиотропных средств для терапии инфекций, вызываемых вирусами рода <i>Enterovirus</i> , на основе синтетических малых молекул	32
1.4.1 Ингибиторы структурных белков энтеровирусов и риновирусов	33
1.4.2 Ингибиторы неструктурных белков энтеровирусов и риновирусов	39
1.5 Заключение по разделу	47
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	49
2.1 Материалы исследований	49
2.1.1 Клетки и вирусы	49
2.1.2 Лабораторные животные	50
2.1.3 Исследуемые соединения	50
2.1.4 Питательные среды.....	50
2.2 Методы исследования.....	51
2.2.1 Определение инфекционного титра вирусов	51
2.2.2 Оценка цитотоксичности исследуемых соединений	51
2.2.3 Оценка цитопротективной активности исследуемых соединений	52
2.2.4 Изучение вирус-ингибирующего действия соединений-лидеров.....	53
2.2.5 Исследование вирулицидной активности соединений	53
2.2.6 Тест на термостабильность вирусного капсида	54

2.2.7	Исследование противовирусной активности соединений в зависимости от способа их применения	55
2.2.8	Тест на время добавления соединений-лидеров	56
2.2.9	Селекция устойчивых штаммов вируса Коксаки В3	57
2.2.10	Оценка бляшкообразования	57
2.2.11	Картирование мутаций резистентности	58
2.2.12	Оценка динамики роста вирусных штаммов.....	61
2.2.13	Оценка противовирусной активности соединений <i>in vivo</i>	62
2.2.14	Гистологическая оценка степени проявления панкреатита	64
2.2.15	Электронная микроскопия	65
2.2.16	Методы статистической обработки результатов	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ		67
3.1	Оценка противовирусной активности исследованных соединений в отношении вирусов рода <i>Enterovirus in vitro</i>	67
3.1.1	Исследование противовирусной активности <i>in vitro</i> новых аналогов плеконарила.....	67
3.1.2	Исследование противовирусной активности <i>in vitro</i> новых соединений группы бензолсульфамидов.....	71
3.1.3	Исследование противовирусной активности <i>in vitro</i> вердазилов и лейковердазилов	75
3.2	Изучение механизмов действия соединений-лидеров.....	84
3.2.1	Предварительные эксперименты	84
3.2.2	Изучение механизма действия нового аналога плеконарила	85
3.2.3	Изучение механизма действия соединений-лидеров из группы бензолсульфамидов.....	88
3.2.4	Изучение механизма действия соединения-лидера из группы лейковердазилов	90
3.3	Оценка противовирусной активности соединений <i>in vivo</i>	96
3.3.1	Адаптация модели энтеровирусного панкреатита у белых мышей ...	96

3.3.2	Активность аналога плеконарила на модели инфекции мышей BALB/c, вызванной вирусом Коксаки В5	98
3.3.3	Активность новых производных из группы бензолсульфамидов на модели инфекции мышей BALB/c, вызванной вирусом Коксаки В5	102
3.3.4	Активность соединения 65 из группы лейковердазилов на модели инфекции мышей BALB/c, вызванной вирусом Коксаки В5.....	104
3.4	Характеристика штаммов вируса Коксаки, устойчивых к соединениям-лидерам	106
3.4.1	Штамм вируса Коксаки В3, устойчивый к соединению 32	106
3.4.2	Штамм вируса Коксаки В3, устойчивый к соединению 65.....	111
ГЛАВА 4.	ОБСУЖДЕНИЕ.....	117
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	123
	ВЫВОДЫ	126
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	127
	ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	128
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	129
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	131
	ПРИЛОЖЕНИЕ А. Результаты исследования противовирусной активности соединений аналогов плеконарила, бензолсульфамидов, лейковердазилов и вердазилов в отношении вируса Коксаки В3 штамм Nancy	150
	ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Нуклеотидная последовательность вируса Коксаки В3, Nancy, резистентного к соединению 32	168
	ПРИЛОЖЕНИЕ В. Пространственное расположение аминокислотных остатков, подвергшихся замене при выработке устойчивости к соединению 32	170
	ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Последовательности геномов вирусов рода <i>Enterovirus</i> , использованные для построения консенсусов вирусного полипептида	173
	ПРИЛОЖЕНИЕ Д. Нуклеотидная последовательность вируса Коксаки В3, Nancy, резистентного к соединению 65	174

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Энтеровирусы представляют собой многочисленную группу безоболочечных РНК-содержащих вирусов рода *Enterovirus*, семейства *Picornaviridae*. Представители рода – полиовирусы, вирусы Коксаки, вирусы ЕСНО (enteric cytopathic human orphan, кишечные цитопатогенные человеческие «сиротские» вирусы), риновирусы являются возбудителями заболеваний человека. Особую опасность инфекции, вызываемые этими вирусами, представляют для детей младшего возраста. Полиомиелит – опасное острое вирусное заболевание с разными клиническими формами, самой тяжелой из которых является паралитическая. Заражение неполиомиелитными энтеровирусами в большинстве случаев не вызывает заболевания, тем не менее, ежегодно в мире регистрируются спорадические случаи и вспышки энтеровирусной инфекции с широким разнообразием клинических форм. На долю риновирусов приходится более половины всех случаев острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ). Все чаще диагностируются легочные и внелегочные осложнения при риновирусной инфекции. Также известно, что риновирусная инфекция является одной из причин обострения астмы и муковисцидоза у детей и хронического бронхита у взрослых.

Россия является страной, свободной от полиомиелита. С 2006 года в Российской Федерации была введена обязательная регистрация лабораторно подтвержденных случаев энтеровирусной инфекции (ЭВИ), что связано в первую очередь с глобальной программой ликвидации полиомиелита Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ).

С учетом высокой генетической изменчивости энтеровирусов в будущем возможно появление новых высокопатогенных штаммов. Из-за высокого генетического и серологического разнообразия энтеровирусов разработка вакцин для профилактики энтеровирусных инфекций затруднена. Специфическая вакцинопрофилактика доступна только в отношении полиовируса (вакцины одобрены ВОЗ) и EVA71 (вакцины зарегистрированы только в Китае).

В большинстве случаев ЭВИ протекает без осложнений, в основе терапии лежит лечение, направленное на облегчение наиболее тяжелых симптомов, с применением иммунокорректирующих, патогенетических и симптоматических средств. Пациенты с поражением нервной системы и других органов, а также дети до 7 лет (при вспышках ЭВИ) подлежат госпитализации [14].

Несмотря на усилия в области разработки этиотропных лекарственных средств для лечения инфекций, вызванных вирусами рода *Enterovirus*, на сегодняшний день в мире отсутствуют зарегистрированные этиотропные препараты для терапии ЭВИ. Наиболее разработанными препаратами, дошедшими до стадии клинических испытаний, являются плеконарил, дисоксарил, пиродавир, вапендавир, покапавир, рупинтривир, энвироксим [3, 28]. Ни один из них не был зарегистрирован по причине недостаточной эффективности или наличия нежелательных эффектов. Одним из недостатков применения этиотропных лекарственных средств является выработка вирусом резистентности к действующему веществу. Эту проблему помогает решить применение комбинаций лекарственных препаратов с различными механизмами действия [69; 70]. Таким образом, поиск новых химических соединений, обладающих прямой противовирусной активностью в отношении широкого спектра энтеровирусов, для их последующего применения в качестве монотерапии или в виде комбинаций является важным направлением исследований.

Степень разработанности темы исследования

Поиску препаратов для терапии инфекций, вызванных энтеровирусами, традиционно уделяется большое внимание. В этой области вирусологии было исследовано огромное количество химических соединений разных классов. Среди препаратов с охарактеризованной активностью в отношении энтеровирусов с известным механизмом действия, можно выделить следующие группы: ингибиторы, связывающиеся с капсидом вируса и препятствующие его проникновению в клетку (плеконарил, пиродавир, вапендавир, покапавир, дизоксарил), ингибиторы вирусных протеаз (рупинтривир), ингибиторы вирусных

полимераз (рибавирин, энвироксим, гемцитабин, амилорид), ингибиторы вирусной геликазы (дибукаин, флуоксетин) [132]. Тем не менее, ни один из перечисленных препаратов не прошел стадию клинических испытаний успешно.

Среди соединений групп оксадиазолов и бензосульфамидов ранее было выявлено несколько активных молекул: плеконарил, 4 –(диметиламино)-бензойная кислота, позже были синтезированы их производные. Был изучен механизм их действия, и было установлено, что соединения этих групп являются капсид-связывающими агентами [24]. Аналоги плеконарила из класса оксадиазолов реализуют свою активность путем связывания с гидрофобным карманом, образованным капсидным белком VP1. Производные 4 –(диметиламино)-бензойной кислоты из группы бензосульфамидов связываются с карманом на границе соседних протомеров вирусного капсида, образованного двумя белками VP1 и одним белком VP3.

Для соединений класса лейковердазилов были описаны антиоксидантные свойства в бесклеточной системе [52]. Энтеровирусная инфекция сопровождается окислительным стрессом, при этом показано, что генерация активных форм кислорода способствует репликации вирусного генома, а дефицит антиоксидантов усугубляет патогенез инфекции. Известно, что соединения с антиоксидантными свойствами могут обладать противовирусным действием. Например, на модели панкреатита мышей, зараженных вирусом Коксаки В4, применение дигидрокверцетина – антиоксиданта натурального происхождения – обеспечивало снижение титра вируса в ткани поджелудочной железы и восстанавливало нарушенные антиоксидантные свойства ткани [58]. Таким образом, использование антиоксидантов либо в монотерапии, либо в сочетании с различными этиотропными препаратами, воздействующими на разные этапы жизненного цикла вируса, может быть полезным для лечения вирусной инфекции.

Цель исследования: дать характеристику противовирусных свойств *in vitro* и *in vivo* новых гетероциклических соединений групп вердазилов, лейковердазилов,

аналогов плеконарила и производных бензолсульфамидов в отношении вирусов рода *Enterovirus*.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи исследования**:

1. провести первичный скрининг противовирусной активности и цитотоксичности тестируемых соединений в опытах *in vitro*, выявить среди них соединения-лидеры;
2. оценить вирус-ингибирующую активность идентифицированных соединений-лидеров в отношении различных типов энтеровирусов;
3. разработать модель энтеровирусного панкреатита у животных и оценить защитные свойства наиболее активных соединений *in vivo*;
4. определить стадию жизненного цикла вируса Коксаки – мишень действия соединений-лидеров при помощи тестов с использованием перmissive клеточной культуры;
5. получить устойчивые к наиболее перспективным соединениям-лидерам штаммы энтеровирусов, локализовать в них генетические изменения и аминокислотные замены, связанные с резистентностью.

Научная новизна исследования

Впервые в рамках одного исследования дана характеристика противовирусной активности новых гетероциклических соединений групп вердазилов, лейковердазилов, аналогов плеконарила и производных бензолсульфамидов в отношении вирусов рода *Enterovirus*.

Среди аналогов плеконарила выявлено новое соединение-лидер, преодолевающее резистентность вируса к прототипному препарату-плеконарилу. Для нового соединения-лидера впервые показана протективная активность *in vivo* на модели энтеровирусного панкреатита у мышей BALB/c. Впервые охарактеризован штамм вируса Коксаки, резистентный к новому соединению-лидеру из группы аналогов плеконарила, показана его сниженная репликативная активность, выявлены новые аминокислотные замены в белке VP1 (I207T, S225A, G254A, G264A) и белке VP3 (Y178F), соответствующие резистентному фенотипу.

В результате исследования выявлена новая группа химических веществ (лейковердазилы), обладающих высокой ингибирующей активностью в отношении широкого спектра энтеровирусов в культуре клеток. Впервые для данной группы соединений выполнен анализ «структура-активность», оценен вклад боковых заместителей в противовирусную активность соединений. Показано, что внесение объемных заместителей в положение 6 тетразинового кольца приводит к ухудшению активности соединений.

Впервые определена стадия жизненного цикла вируса, которую ингибирует соединение группы лейковердазилов. Показано, что соединение из группы лейковердазилов проявляет вирус-ингибирующую активность при добавлении в культуру клеток не позже начала репликации вирусного генома.

Впервые путем серийного пассирования в культуре показана возможность выработки резистентности к соединению группы лейковердазилов, и охарактеризован резистентный штамм вируса Коксаки. Впервые показано, что развитие резистентности к соединению из группы лейковердазилов сопровождается мутациями в белке 2С. Впервые показано, что штамм, резистентный к соединению-лидеру из группы лейковердазилов, несущий аминокислотные замены в вирусном белке 2С (S109I, H318Q), обладает сниженными ростовыми характеристиками в культуре клеток.

Теоретическая и практическая значимость исследования

В результате проведенного исследования получены сведения об активности и токсичности *in vitro* библиотеки химических соединений вердазилов, лейковердазилов, аналогов плеконарила и производных бензолсульфамидов. Результаты свидетельствуют о высоком потенциале соединений группы лейковердазилов как соединений – ингибиторов широкого спектра энтеровирусов. Полученные данные расширяют знания о биологической активности новых соединений групп вердазилов, лейковердазилов, аналогов плеконарила и производных бензолсульфамидов и пополняют теоретическую базу для их дальнейших исследований.

Охарактеризованы новые сайты в вирусных белках VP1, VP3 и 2С, мутации в которых ассоциированы с резистентностью и пониженными ростовыми характеристиками энтеровирусов. На основе полученных данных возможна разработка новых подходов к направленному синтезу мишень-ориентированных химических соединений.

Практическая значимость заключается в выявлении активного аналога плеконарила, обладающего широким спектром активности в отношении энтеровирусов, включая плеконарил-резистентный штамм вируса Коксаки В3, и риновируса, а также протективным действием *in vivo*. Преимуществом данного соединения являются пониженные ростовые свойства штамма, резистентного к нему. Таким образом, данное соединение можно рассматривать как потенциального кандидата для проведения расширенных доклинических исследований.

Методология и методы исследования

Цитотоксичность новых гетероциклических соединений оценивали с помощью классической методики метилтетразолиевого теста. Исследование противовирусной активности соединений *in vitro* проводили на культурах клеток Vero, RD, MRC5 по лечебно-профилактической схеме. Титр вируса в среде определяли методом предельных серийных разведений. Для исследуемых соединений определяли значения 50% цитотоксической концентрации (CC₅₀), 50% эффективной концентрации (EC₅₀), 50% ингибирующей концентрации (IC₅₀), рассчитывали индекс селективности (SI). Определение механизмов действия наиболее перспективных соединений выполняли с помощью вирусологических методов. Для характеристики резистентных штаммов вируса Коксаки В3 использовали вирусологические и молекулярно-биологические методы. Оценку активности выбранных соединений *in vivo* проводили по лечебно-профилактической схеме введения на модели коксакивирусной инфекции у мышей BALB/c. Результаты анализировали с помощью обоснованных статистических

методов. Значения $p \leq 0,05$ считали достаточными для вывода о статистической значимости различий полученных данных.

Положения, выносимые на защиту

1. Соединения групп лейковердазилов, аналогов плеконарила и бензолсульфамидов обладают способностью ингибировать репродукцию энтеровирусов. Применение соединения-лидера из группы аналогов плеконарила (3-(3-Метил-4-(3-(3-N,N-диметилкарбамоилизоксазол-5-ил)пропокси)фенил)-5-трифторметил-1,2,4-оксадиазола) в экспериментах *in vivo* на модели коксакивирусной инфекции у мышей приводит к статистически значимому снижению вирусной нагрузки в органе-мишени.

2. Наиболее активные соединения среди изученных аналогов плеконарила (соединение 32, 3-(3-метил-4-(3-(3-N,N-диметилкарбамоилизоксазол-5-ил)пропокси)фенил)-5-трифторметил-1,2,4-оксадиазол) и бензолсульфамидов (соединение 41, 2-((4-N-(4-карбоксифенил)сульфамоил)фенил)карбамоил) бензойная кислота, соединение 42, 4-((4-(3-карбоксипропаноиламино)фенил)сульфонамидо)бензойная кислота) относятся к группе капсид-связывающих агентов.

3. Соединение 65 (2-(3,5-дифенил-5,6-дигидро-4Н-[1,2,4,5]тетразин-1-ил)-бензотиазол) из группы лейковердазилов ингибирует внутриклеточный этап репродукции энтеровирусов.

4. Резистентность вируса Коксаки В3 к соединению 32 сопровождается аминокислотными заменами в вирусных белках VP3 и VP1. Резистентность вируса Коксаки В3 к соединению 65 сопровождается аминокислотными заменами в вирусном белке 2С. Резистентные штаммы имеют сниженные ростовые характеристики.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности определяется достаточным количеством повторностей проводимых экспериментов, формированием групп сравнения и

контроля, адекватными вирусологическими моделями и методами исследования и корректными методами статистической обработки.

Основные результаты диссертационного исследования апробированы на всероссийских и международных конференциях: Весенняя школа-конференция ХимРар по медицинской химии «МедХимРар-21» (Москва, 2021); Первая школа по медицинской химии для молодых ученых «MedChemSchool-2021» (Новосибирск, 2021); XXVII Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2021» (онлайн формат, 2021); XXVIII Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2022» (онлайн формат, 2022); 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим – Россия 2021» (Волгоград, 2022); III Международный форум Дни вирусологии 2022 (Санкт-Петербург, 2022), «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Санкт-Петербург, 2023), Международный симпозиум - научная конференция «100 лет с именем Пастера», (Санкт-Петербург, 2023), «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (MOSM 2024) (Екатеринбург, 2024), VIII Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXVII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 2024).

Наиболее значимые тезисные сообщения:

1. Волобуева А.С., Зарубаев В.В., Шетнев А.А., Панова В.А., Васильева Д.М. Характеристика противовирусной активности новых капсид связывающих агентов производных сульфонамидобензойной кислоты. // Сборник тезисов III Международный форум Дни вирусологии 2022 (Санкт-Петербург, 3-5 октября 2022 г.) - Санкт-Петербург, 2022. - С.21

2. Волобуева А.С., Зарубаев В.В., Дерябина Т.Г. Характеристика противовирусной активности и механизма действия новых гетероциклических соединений группы лейковердазолов. // Сборник тезисов докладов Восьмой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты

Химии, Фармацевтики и Фармакологии» (Санкт-Петербург, 24-27 апреля, 2023 г.) / под редакцией К.В. Кудрявцева и Е.М. Паниной. – М.: «Перо», 2023. – С. 29.

3. Волобуева А.С., Зарубаев В.В., Федорченко Т.Г., Липунова Г.Н., Мин Хоанг. Характеристика противовирусной активности тиенил-содержащих лейковердазилов в отношении энтеровирусов. // Сборник тезисов VIII Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXVII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 5-7 июня 2024 г.) Проблемы медицинской микологии Т.26, №2, – Санкт-Петербург, 2024 - С.97.

Публикации по теме диссертации

Результаты диссертационного исследования опубликованы в 6 научных работах. Из них в журналах Перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук (Перечень ВАК) - 2 статьи, в научных изданиях, индексируемых в международных базах данных Web of Science и/или Scopus - 3 статьи. Получено патентов на изобретение в РФ – 1.

Личный вклад автора

Автором проведен сбор и анализ научной литературы по теме диссертационного исследования, сформулированы цель и задачи исследований, определены объекты и объем работы, проведен поиск методов и их обоснование для решения поставленных задач. Проведены эксперименты по изучению противовирусной активности и механизма действия новых гетероциклических соединений групп вердазилов, лейковердазилов, аналогов плеконарила и бензолсульфамидов *in vitro*, адаптации модели энтеровирусного панкреатита у белых мышей и оценке активности соединений-лидеров в условиях энтеровирусной инфекции *in vivo*, селекции и характеристике резистентных штаммов вирусов *in vitro*, подбору праймеров и подготовке ПЦР-фрагментов для секвенирования и анализу результатов секвенирования. Выполнено формирование базы данных и осуществлена обработка полученных результатов, проведено их

обобщение и обсуждение, выполнено оформление диссертации, подготовлены публикации по теме диссертации. Вклад соавторов заключается в приготовлении материалов для гистологического и электронно-микроскопического анализа, выполнении работ по секвенированию подготовленных ПЦР-фрагментов вирусного генома.

Внедрение результатов исследования

В международную базу данных была депонирована нуклеотидная последовательность части генома вируса Коксаки В3 (Nancy), резистентного к соединению 65 (GenBank: PP845344.1).

Полученные результаты были использованы в учебно-педагогическом процессе в центре химической инженерии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 1.5.10. Вирусология. Результаты проведенной работы соответствуют областям исследований: пунктам 4, 10, 11 паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 175 страницах машинописного текста, включает 18 таблиц, 46 рисунков. Состоит из введения, глав (обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты, обсуждение), заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 155 источников (21 публикация отечественных авторов и 134 – зарубежных авторов), и 5 приложений, включающих 5 таблиц, 5 рисунков.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Энтеровирусы, современные представления и общая характеристика

1.1.1 Краткая история открытия энтеровирусов

История открытия и изучения энтеровирусов началась с вирусов полиомиелита, возбудителей страшной болезни, известной с древнейших времен, впервые описанной Гиппократом [11]. Научные исследования полиомиелита начались с 19 века в трудах немецкого ортопеда Якоба Гейне (1840), русского невропатолога Алексея Яковлевича Кожевникова (1883) и шведского педиатра Карла Медина (1890), появилось название болезнь Гейне – Медина. В 20 веке началась триумфальная эра исследований полиомиелита. Первооткрывателями полиовируса считаются Карл Ландштейнер совместно с Эрвином Поппером, которые в 1908 году доказали инфекционную природу полиомиелита в экспериментах по заражению обезьян гомогенатом тканей центральной нервной системы (ЦНС) от больного 9-летнего мальчика [128]. Неплиомиелитные энтеровирусы впервые были обнаружены в 1948 году Гилберг Долдорф и Грейс Сайклз в ходе расследования вспышки полиомиелита в деревне Коксаки, Соединенные Штаты Америки (США). Они выделили вирус из фекалий больных детей и успешно заразили ими новорожденных мышей, у животных развился паралич. Уже было известно, что полиовирус не является патогенным для мышей. Дальнейшие исследования показали, что серологически вирус отличался от полиовируса. В 1949 году Джозеф Мелник с сотрудниками открыл вирус Коксаки В при заражении мышей инфекционным материалом детей с серозным менингитом.

В 1949 году Джоном Эндерсом, Томасом Уэллером и Фредериком Роббинсом был разработан метод культивирования живого полиовируса в культуре тканей (Нобелевская премия по физиологии и медицине, 1954). Затем, Джонас Солк создал инактивированную вакцину от полиомиелита в 1950 году, в 1961 году стала доступна живая вакцина, разработанная Альфредом Сэбином. Открытие способа культивирования полиовируса на культуре клеток способствовало впоследствии

выделению большого количества новых энтеровирусов, в том числе непатогенных для лабораторных животных. В 1951 году из фекалий здоровых детей были изолированы энтеровирусы, непатогенные для животных и не ассоциированные с заболеванием человека, они получили название ЕСНО [101]. Связь ЕСНО вирусов с заболеваниями человека была открыта позднее.

Риновирuсы человека были впервые выделены из образцов больных респираторными инфекциями (простудой) в 1950-х годах двумя лабораториями: Уинстоном Прайсом в 1956 году и коллективом Уильяма Пелона в 1957 году [99]. Изначально среди риновирусов выделяли два типа - А и В, позднее уже в 21 веке благодаря развитию методов секвенирования среди риновирусов выделили третий тип риновирусов - С.

1.1.2 Физико-химические свойства энтеровирусов

Энтеровирусы отличаются необычайной устойчивостью к неблагоприятным физическим и химическим факторам внешней среды благодаря простоте и жесткости своей структуры. Вирионы большинства энтеровирусов сохраняют стабильность в кислой среде ($\text{pH}=3-5$). Риновирuсы теряют стабильность при pH ниже 5-6. Отсутствие липидной мембраны приводит к тому, что 70% этанол, лизол, препараты аммония, эфир, дезоксихолат, детергенты не действуют на энтеровирусы и риновирусы. Инактивация энтеровирусов достигается обработкой 0,5% формальдегидом, 0,1 н HCl или окислительными агентами (хлором, хлорамином, озоном, двуокисью хлора). При этом наличие органических веществ может препятствовать успешной инаktivации.

При нагревании до 50 °C вирионы энтеровирусов разрушаются, однако добавление к вирусной суспензии дивалентных катионов (например, магния) обеспечивает термоустойчивость энтеровирусов в течение часа. Эта особенность обеспечила широкое применение MgCl_2 в качестве стабилизатора живой полиовакцины. Известно, что при комнатной температуре инфекционность энтеровирусов сохраняется в течение нескольких суток, а при хранении при +4 °C

– в течение нескольких недель. Риновирусы термостабильны, долго сохраняются при температуре 20–37 °С, а некоторые типы выдерживают нагревание до 50 °С. В замороженном состоянии суспензия вирусов выдерживает многолетнее хранение и сохраняет инфекционность при многократных циклах замораживания-оттаивания [13]. Под действием ультрафиолета и при высушивании энтеровирусы быстро инактивируются. Такие красители как нейтральный красный, акридиновый оранжевый, профлавин при соединении с вирионами приводят к их инаktivации видимым светом.

1.1.3 Таксономия энтеровирусов

Род *Enterovirus* относится к обширному семейству вирусов *Picornaviridae*, которое включает 63 вида [60]. Типовой представитель рода *Enterovirus* – вирус полиомиелита. Название рода *Enterovirus* происходит от греческого слова «enteron»- кишечник. В соответствии с первоначальной классификацией в зависимости от способности вызывать заболевание у лабораторных животных (обезьян или новорожденных мышей) и оказывать цитопатический эффект на культуры клеток человека и обезьян энтеровирусы разделяли на 4 большие группы:

- вирусы полиомиелита;
- вирусы Коксаки А;
- вирусы Коксаки В;
- вирусы ЕСНО.

В традиционной классификации не учитывались геномные характеристики вирусов. За годы изучения классификация энтеровирусов претерпела существенные изменения. По данным Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) вирусы рода *Enterovirus*:

- различаются менее чем на 30% по аминокислотной последовательности полипротеина;
- различаются менее чем на 40% по аминокислотной последовательности участка P1;

- различаются менее чем на 30% по последовательности неструктурных белков 2C + 3CD;

- имеют общую организацию генома.

В 2024 году была введена новая биномиальная номенклатура видов вирусов в пределах рода *Enterovirus*. Из 12 видов энтеровирусов и трех видов риновирусов только 7 видов включают типы, инфицирующие человека (Таблица 1) [60].

Таблица 1 - Классификация вирусов рода *Enterovirus*, инфицирующих человека

Вид	Типы вида
<i>Enterovirus alphacoxsackie</i> (ранее Энтеровирус А [117])	coxsackievirus A2-8, 10, 12, 14, 16 enterovirus A71, 76, 89-92, 114, 119-121
<i>Enterovirus alpharhino</i> (ранее Риновирус А)	rhinovirus A1-A2, A7-A13, A15-16, A18-25, A28-34, A36, A38-41, A43, A45-47, A49-51, A53-68, A71, A73-78, A80-82, A85, A88-90, A94, A96, A100-108, A1B
<i>Enterovirus betacoxsackie</i> (ранее Энтеровирус В)	coxsackievirus B1-6, A9, echovirus 1-9, 11-21, 24-27, 29-33 enterovirus B69, B73-75, B77-88, B93, B97-98, B100-101, B106-107, B110-113
<i>Enterovirus betarhino</i> (ранее Риновирус В)	rhinovirus B3-6, B14, B17, B26-27, D35, B37, B42, B48, B52, B69-70, B72, B79, B83-84, B86, B91-93, B97, B99-104
<i>Enterovirus cerhino</i> (ранее Риновирус С)	rhinovirus C1-51, C54-57
<i>Enterovirus coxsackiepol</i> (ранее Энтеровирус С)	poliovirus 1-3, coxsackievirus A1, A11, A13, A17-22, A24, enterovirus C95-96, C99, C102, C104-105, C109, C113, C116-118
<i>Enterovirus deconjuncti</i> (ранее Энтеровирус D)	enterovirus D68, D70, D94, D111, D120

1.1.4 Строение энтеровирусов

Трехмерная структура энтеровирусов (на примере полиовируса 1 типа) была определена методом рентгеноструктурного анализа в 1985 году [66]. Вирионы диаметром 30 нм лишены липидной оболочки, имеют икосаэдрическую форму. Белковый капсид состоит из 60 протомеров, организованных в 12 пентамеров (Рисунок 1). Каждый протомер образован структурными белками VP1, VP2, VP3, VP4: белки VP1-VP3 расположены на поверхности вириона, а белок VP4 с внутренней стороны капсида. Антигенные детерминанты, определяющие тип вируса, расположены на соединительных петлях и С-концах белков VP1-VP3. Вокруг каждого пентамера расположено углубление («каньон») в пяти белках VP1 субъединиц протомера, в котором находится сайт связывания с рецептором для вируса [91; 120; 137, 154].

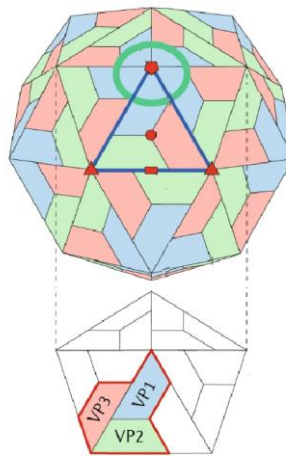


Рисунок 1 - Организация капсида вирусов рода *Enterovirus*. Зеленым контуром обозначен каньон вокруг вершины пентамера (адаптировано по Baggen, J. и др., 2018 [28])

Внутри капсида находится геном вирусов, представленный одноцепочечной (+) РНК длиной порядка 7100–7450 нуклеотидов. Все представители рода энтеровирусов имеют схожую организацию генома: VPg+5'-UTRIRES-I-[1A-1B-1C-1D/ 2A1pro(/2A2pro)-2B-2C1hel(-2C2pro)/ 3A-3B-3C-3D]-3'UTR-poly(A) [57]. Структура генома представлена на Рисунке 2.

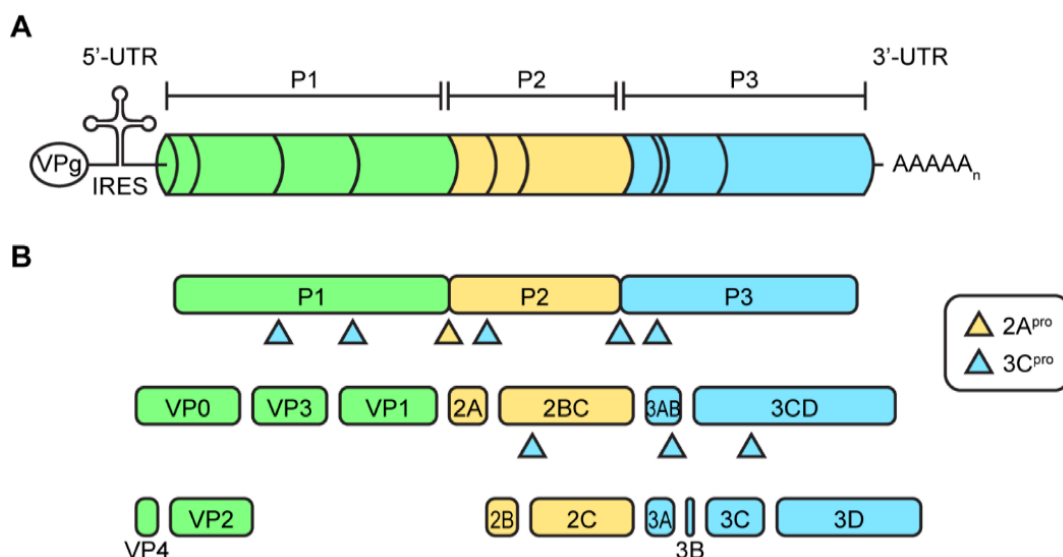


Рисунок 2 - Структура генома энтеровирусов. А. Организация генома энтеровирусов В. Полипротеин, кодируемый ORF, его процессинг в вирусные белки и стабильные предшественники белков (адаптировано по Linden, L. и др., 2015 [89])

Геном вирусов рода *Enterovirus* содержит структурированные 5'- и 3'-нетранслируемые участки (UTR, untranslated region), между ними находится открытая рамка считывания (ORF, open reading frame). РНК полиаденилирована на 3'-конце, но лишена кэпа, вместо него с 5' UTR ковалентно связан небольшой белок длиной 22 аминокислоты VPg (3В), который используется в качестве праймера при репликации вирусного генома.

В ORF энтеровирусов и риновирусов выделяют три участка, кодирующие 11 вирусных белков: P1, кодирующий структурные белки (VP1, VP2, VP3, VP4), и два участка P2 и P3, кодирующих неструктурные белки 2А, 2В и 2С (участок P2) и белки 3А, 3В, 3С, 3D (участок P3), участвующие в процессах репликации вирусного генома.

5'-UTR содержит внутренний сайт посадки рибосомы (IRES, internal ribosome entry site) для обеспечения независимой от кэпа трансляции. Существование такой структуры как IRES было впервые открыто при изучении пикорнавирусов. IRES энтеровирусов относится к 1 типу IRES пикорнавирусов и представляет собой очень сложную структуру, в которой выделяют 6 доменов (Рисунок 3).

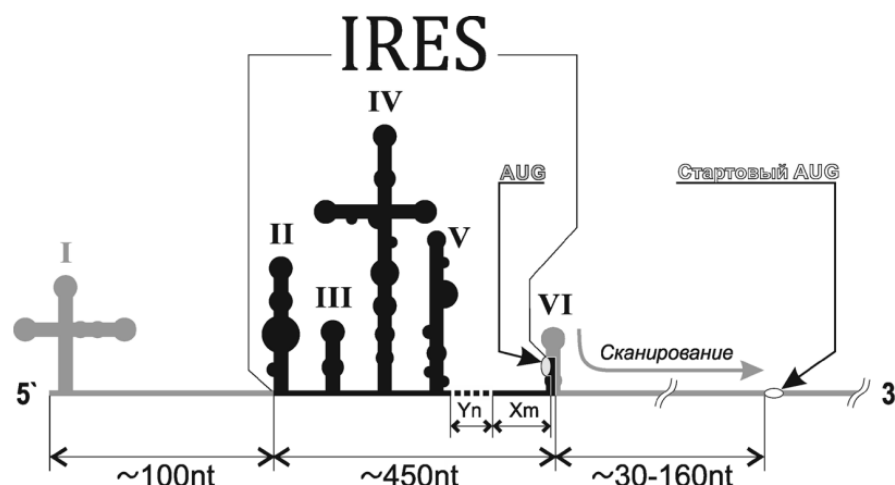


Рисунок 3 - Организация IRES энтеровирусов (I тип IRES пикорнавирусов). Представлены домены IRES I-VI. Мотив Yn–Xm–AUG рассматривается как предполагаемое место посадки рибосомы (адаптировано по Никонов О.С. и др., 2017 [18])

Необходимо отметить, что в 2019 году у энтеровирусов А, В, С была обнаружена вторая открытая рамка считывания - upstream open reading frame (uORF) в 5'UTR [96]. Продуктом ее трансляции является малый белок (UP), который обнаруживается только в инфицированных клетках кишечного эпителия, но отсутствует в традиционно используемых при изучении энтеровирусов клеточных культурах. Считается, что экспрессия этого белка способствует репликации вируса именно в эпителиальных клетках кишечника — месте первоначальной вирусной инвазии.

1.1.5 Цикл репродукции энтеровирусов

Жизненный цикл энтеровирусов и риновирусов подробно изучен и описан во многих публикациях ранее [28; 120]. Продолжительность цикла репродукции этих вирусов в пермиссивных клеточных культурах составляет 6-8 часов. Их жизненный цикл схематично изображен на Рисунке 4 и состоит из следующих последовательных этапов: связывание с рецептором на клеточной мембране, проникновение внутрь клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза или макропиноцитоза, «раздевание» капсида в эндосоме с высвобождением генома

вируса в цитоплазму, где происходит трансляция и процессинг вирусного полипротеина, а затем репликация РНК и ее упаковка в капсидные белки и выход вирионов из клетки.

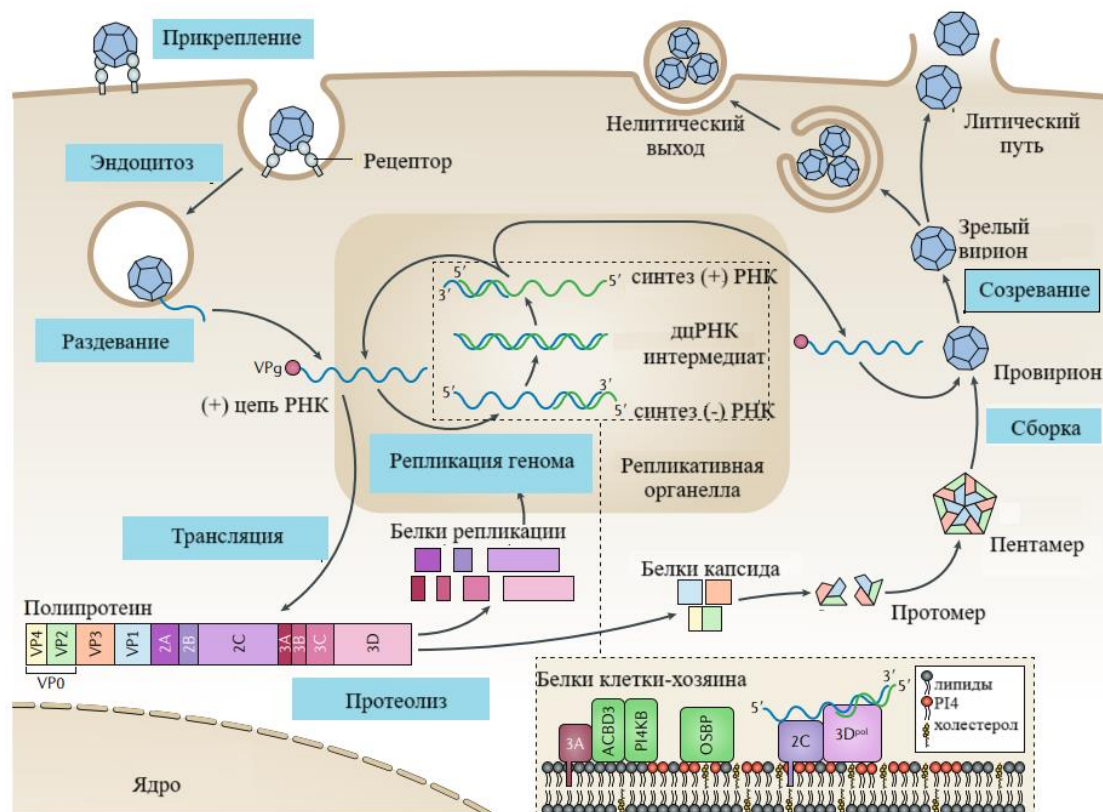


Рисунок 4 - Этапы жизненного цикла энтеровирусов (адаптировано по Baggen, J. и др., 2018 [28])

Разные виды энтеровирусов и риновирусов используют широкий диапазон рецепторов [147]. В зависимости от функции выделяют рецепторы для прикрепления к поверхности, которые обеспечивают прикрепление вируса к клетке и способствуют его поглощению, и рецепторы для раздевания вируса, взаимодействие вируса с которыми вызывают конформационные изменения капсида и опосредуют высвобождение вирусного генома в цитоплазму [149]. Считается, что тропизм вируса определяется типом рецептора для прикрепления.

Связывание вируса в эндосоме с рецептором для раздевания происходит в «каньоне» пентамера капсида, при этом из гидрофобного кармана белка VP1 высвобождается липидный фрагмент («карманный фактор»), что приводит к коллапсу кармана. Для большинства энтеровирусов этого достаточно для

дестабилизации и расширения капсида зрелого инфекционного вириона и его превращения в интермедиат, известный как «А-частица» [28]. Для некоторых энтеровирусов для образования А частицы еще необходимо закисление pH эндосомы, а для риновирусов А2 достаточно только закисления среды и не требуется связывания с рецептором для раздевания. А-частицы являются гидрофобными из-за необратимой экстернализации N-конца VP1, который содержит амфипатическую спираль, позволяющую вириону взаимодействовать с мембраной эндосомы. Экстернализованный N-конец VP1 закрепляет вирион на эндосомальной мембране, а высвобожденный миристоил-VP4 образует в мембране поры, через которые вирусная РНК попадает в цитоплазму.

Для высвобождения РНК из капсида необходимо его раскрытие с потерей трех прилегающих друг к другу пентамеров. Такое раскрытие позволяет высвобождать геном энтеровирусов с сохранением двуцепочечных участков РНК (IRES) [33]. В этом процессе участвует и белок клетки-хозяина PLA2G16 (фосфолипаза A2 16 группа). PLA2G16 обеспечивает своевременную доставку РНК вируса в цитоплазму до того, как клеточный сенсор галектин 8 обнаружит индуцированное вирусом нарушение целостности эндосомальной мембраны и направит вирион по пути аутофагии [27; 130].

В цитоплазме рибосомы связываются с IRES вирусной РНК, и в результате ее кэп-независимой трансляции образуется полипротеин длиной порядка 2100 - 2200 аминокислот, который протеолизуется до белков-предшественников P1, P2 и P3, а затем ко- и посттрансляционно расщепляется вирусными протеазами 2A^{Pro}, 3C^{Pro}. Белок-предшественник P1 расщепляется на первом этапе протеолиза с получением капсидных белков VP3, VP1 и VP0, VP0 затем расщепляется до белков VP4 и VP2. Белок-предшественник P2 подвергается первоначальному процессингу с образованием вирусной протеазы 2A и полипротеина 2BC, который далее расщепляется на два неструктурных белка: 2B (белок ионный канала) и 2C (многофункциональный белок). Белок-предшественник P3 сначала протеолизуется до 3AB и 3CD, а затем с образованием белков 3A (мембранно-связанный белок), 3B (VPg), 3C (протеаза) и 3D (полимераза) [153]. При этом

вирусные протеазы способны проникать в ядро клетки и расщеплять ряд клеточных белков (eIF4G, eIF4A, OCT-1, CREB, TBP, поли(А)-связывающий белок (PABP)) с целью оптимизации репликации своего генома и подавления развития иммунного ответа [88; 89].

Инициация репликации вирусной РНК происходит с участием 3'UTR и 5'UTR, ее катализирует вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза 3D, в процесс репликации вовлекается ряд вирусных белков и белков клетки-хозяина. Репликация вируса включает синтез отрицательной комплементарной цепи (–) РНК, на матрице которой происходит синтез положительных нитей РНК (+) РНК. Праймером для синтеза обеих нитей РНК является вирусный белок 3В (VPg), уридилированный по тирозиновому остатку полимеразой 3D.

Репликация РНК энтеровирусов и риновирусов происходит в специализированных вирус-индуцированных структурах в цитоплазме клетки – репликативных органеллах (РО) диаметром 200-400 нм, которые образуются из мембран комплекса Гольджи и/или эндоплазматического ретикулума (ЭПР) [57; 118]. Считается, что такие структуры обеспечивают концентрирование необходимых для репликации белков и вероятно способствуют избеганию врожденного иммунного ответа на двуцепочечный РНК (дцРНК) интермедиат [72]. В процессе развития инфекции пикорнавирусов отмечается динамика морфологии РО: от одномембранных трубочек к двумембранным везикулам и затем к многоламеллярным везикулам через наложение, обертывание и слияние мембран [86]. Помимо морфологических изменений ЭПР и Гольджи, репликация вируса вызывает изменения липидного состава клеточных мембран. В составе мембран РО преобладают фосфатидилхолин, фосфатидилинозитол-4-фосфат (PI4) и холестерол. В образовании РО участвуют вирусные белки и белки клетки-хозяина. Неструктурные белки 2В/2ВС и 3А вируса связываются с мембранами ЭПР и Гольджи и привлекают к ремоделированию мембран белки клетки: белок, содержащий ацил-СоА-связывающий домен 3 (ACBD3), фосфатидилинозитол-4-киназа-бета (PI4Kb), оксистеролсвязывающий белок (OSBP), фактор обмена

гуаниновых нуклеотидов 1, специфичный для Гольджи, устойчивый к брэфельдину А (GBF1) [92; 112].

Для энтеровирусов и риновирусов описан как выход из клетки посредством разрыва клеточной мембраны, так и выход вирионов в составе одно мембранных везикул путем использования механизма аутофагии [108; 109]. Нахождение вирионов внутри везикул препятствует доступу нейтрализующих антител к вирусным частицам, обеспечивая беспрепятственное распространение вируса по организму.

1.2 Роль вирусов рода *Enterovirus* в инфекционной патологии человека

Представители рода *Enterovirus* являются возбудителями полиомиелита, энтеровирусных (неполио) инфекций и риновирусной инфекции. Попав в организм, эти вирусы активно размножаются в слизистых оболочках пищеварительного/дыхательного тракта, затем там же в лимфоидной ткани, при этом выделение вируса из зева пациента наблюдается в течение нескольких дней до проявления клинических симптомов, а выделение вируса с фекалиями продолжается до 4 недель [147]. На стадии первичной виремии вирус активно распространяется по организму с кровью, в большинстве случаев, не вызывая тяжелых клинических симптомов. Однако в тяжелых случаях происходит попадание вируса в орган-мишень (головной и спинной мозг, мягкие мозговые оболочки, сердце, легкие, поджелудочная железа, мышечная ткань, кожа, сосуды глаз) через взаимодействие с соответствующими тканеспецифичными рецепторами и начинается вторичная виремия, сопровождающаяся тяжелой органопатологией [13; 14].

Полиомиелит – антропонозное острое вирусное заболевание, вызываемого поливирусами 1, 2, 3 типов. У 90% инфицированных заболевание протекает бессимптомно, менее чем в 1% случаев инфекция вызывает необратимые параличи, 5-10% парализованных умирают из-за паралича дыхательных мышц. Американский, Западно-Тихоокеанский, Европейский и регион Юго-Восточной

Азии сертифицированы как регионы, свободные от полиомиелита. Из трех типов дикого полиовируса (ДПВ) в настоящий момент в мире циркулируют только полиовирусы 1 типа в эндемичных странах (Афганистан, Пакистан). Тем не менее регулярно регистрируют случаи полиомиелита в странах Африки к югу от Сахары, вызванные нейровирулентными полиовирусами вакцинного происхождения (ПВВП). ПВВП дивергировали от вирусов вакцинных штаммов оральной полиовакцины (ОПВ) Сэбина из-за генетических изменений генома. Опасность представляют также поствакцинальные осложнения в виде вакциноассоциированного паралитического полиомиелита (ВАПП) у непривитых детей с иммунодефицитными состояниями при их тесном контакте с детьми, недавно вакцинированными ОПВ, вследствие реверсии нейротропных свойств отдельных клонов вакцинных штаммов в кишечнике иммунизированного ребенка [14].

С 2002 года Российская Федерация (РФ) обладает статусом свободной от полиомиелита страны, в которой не циркулируют дикие полиовирусы [35]. Однако существуют риски завоза ДПВ 1 типа с неблагополучных по полиомиелиту территорий, завоз/появление ПВВП, утечка полиовируса с производства вакцин или из лабораторий, продолжающих работу с полиовирусом, выделение ПВВП лицами с первичными иммунодефицитами, связанными с В-клетками. Последние случаи полиомиелита, вызванные диким полиовирусом, были зарегистрированы в России в 2010 году (14 случаев) в результате завоза дикого полиовируса типа 1 из Республики Таджикистан, где была крупная вспышка инфекции ДПВ 1 типа индийского происхождения (485 случаев) [2; 21].

ЭВИ распространены во всем мире чаще всего у детей до 10 лет. В странах умеренного климата инфекции регистрируют летом и осенью, в тропических регионах – круглый год [13]. Трудовая миграция и международный туризм способствуют распространению энтеровирусов между странами. Во внешней среде энтеровирусы долго сохраняются в хозяйственно-бытовых сточных водах, загрязненных фекалиями. Механизм передачи вируса - фекально-оральный (водный, пищевой, контактно-бытовой путь) и аэрозольный (контактно-бытовой,

воздушно-капельный, воздушно-пылевой путь). Дети более восприимчивы к ЭВИ, чем взрослые, максимальная заболеваемость наблюдается у детей 2-5 лет, после чего она снижается благодаря сформированной невосприимчивости в связи с перенесенным ранее инфицированием энтеровирусами.

В большинстве случаев ЭВИ протекают бессимптомно, но приблизительно в 1% случаев наблюдается тяжелое течение. Одним из самых частых проявлений ЭВИ является неспецифическая лихорадка – острое кратковременное заболевание без симптомов поражения ЦНС и внутренних органов. Иногда ЭВИ проявляется в форме респираторных заболеваний верхних дыхательных путей (без пневмонии), острого гастроэнтерита. Следует отметить крупную вспышку тяжелого респираторного заболевания, вызванного EV-D68 в странах Северной Америки в 2014 году (более 1000 подтвержденных случаев в 49 штатах США и более 200 случаев в Канаде) [104].

В большинстве случаев прогноз при инфекции неполиомиелитными энтеровирусами (НПЭВ) благоприятный, серьезный при менингите, миелите и энцефалите. Тем не менее, у новорожденных НПЭВ могут стать причиной сепсис-подобного заболевания с летальным исходом с некрозом печени и поражением легких, сердца, поджелудочной железы и мозга. Примечательно, что одни и те же клинические синдромы, наблюдаемые при ЭВИ, могут быть связаны с разными типами энтеровирусов (ЭВ), а один и тот же ЭВ способен вызывать разнообразные клинические формы заболевания. Однако, некоторые ЭВ имеют уникальные ассоциации заболеваний, например, E7, CVA-24 и EV-70 с острым геморрагическим конъюнктивитом [15]. Наиболее значимы с эпидемиологической точки зрения вспышки энтеровирусного серозного менингита, менингоэнцефалита, энтеровирусного везикулярного стоматита с экзантемой, эпидемических миалгий в детских коллективах и медицинских организациях.

Одна из наиболее значимых клинических форм ЭВИ – это серозный менингит. НПЭВ вызывают до 90% менингитов вирусной этиологии. Энтеровирусный менингит (ЭВМ) – это синдром, отражающий характер

воспаления мозговых оболочек головного или спинного мозга. Стационарное лечение при ЭВМ продолжается до 3 недель.

ЭВИ может проявляться в виде синдрома острого вялого паралича (ОВП). ОВП представляет собой остро развившееся (в течение 7 суток) состояние вялости любой части тела ребенка до 15 лет или любое паралитическое заболевание независимо от возраста при подозрении на полиомиелит [16].

Для энтеровирусной экзантемы характерно появление розовой полиморфной сыпи (в течение 1-8 суток) на фоне лихорадки (до 7-8 дней), интоксикационного синдрома, часто в сочетании с пятнами и везикулами на слизистых полости рта, которые превращаются в эрозии и мелкие язвочки при вскрытии. Вариантом энтеровирусной экзантемы является высоко контагиозная «hand-foot-and-mouth disease» (HFMD, «болезнь рука-нога-рот»), которая сопровождается поражением кистей, стоп и полости рта в основном у детей в возрасте до 5 лет [155]. Иногда возможны осложнения со стороны многих систем органов (ЦНС, сердечно-сосудистой системы, легких, желудочно-кишечного тракта).

Особую опасность для общественного здоровья вспышки HFMD представляют в Азиатско-Тихоокеанском регионе. Большинство вспышек зарегистрировано в Малайзии, Вьетнаме, Китае, Камбодже и Индии, где заболеваемость составляет 115–197 случаев на 100 тыс. человек в год [85]. В частности, в Китае первая вспышка HFMD произошла в 2008 году, и в период с 2008 по 2018 China Center for Disease Control and Prevention было зарегистрировано 20,537,199 случаев HFMD, из них 3667 с летальным исходом [55].

Плевродиния (болезнь Борнхольма, дьявольский грипп) – острое заболевание, которое сопровождается лихорадкой и миалгией в области грудной клетки и живота, объясняется миотропизмом вирусов Коксаки. Заболевание начинается остро с подъема температуры тела до фебрильной и резкой боли в груди и/или животе, что объясняется вовлечением в патологический процесс межреберных мышц и мускулатуры передней брюшной стенки.

Особое место среди ЭВИ, вызванных НПЭВ, занимают кардиомиопатии и панкреатиты. Кардиотропными свойствами обладают вирусы Коксаки В,

некоторые типы Коксаки А и ЕСНО [1; 106]. В основе кардитов лежит как прямое повреждение сердечной мышцы вирусом, так и иммунные механизмы, опосредуемые Т-цитотоксическими лимфоцитами и аутоантителами. По характеру течения выделяют острые, подострые, abortивные, рецидивирующие, хронические миокардиты. Клинические проявления ЭВ миокардитов неспецифичны, зачастую заболевание протекает бессимптомно. Течение заболевания и прогноз могут быть разными, но больные подлежат обязательной госпитализации. Была изучена ассоциация диабета 1 типа и энтеровирусной инфекции [78; 95; 150]. В ряде исследований было показано, что Коксаки В4 может инфицировать бета-клетки поджелудочной железы, а также может вызывать иммунный ответ, что способствует гибели бета-клеток.

В России ведется эпидемиологический надзор за ЭВИ, полиомиелитом и ОВП [15]. На Рисунке 5 представлена динамика заболеваемости ЭВИ и ЭВМ за 2010-2023 г.г. по данным Роспотребнадзора.

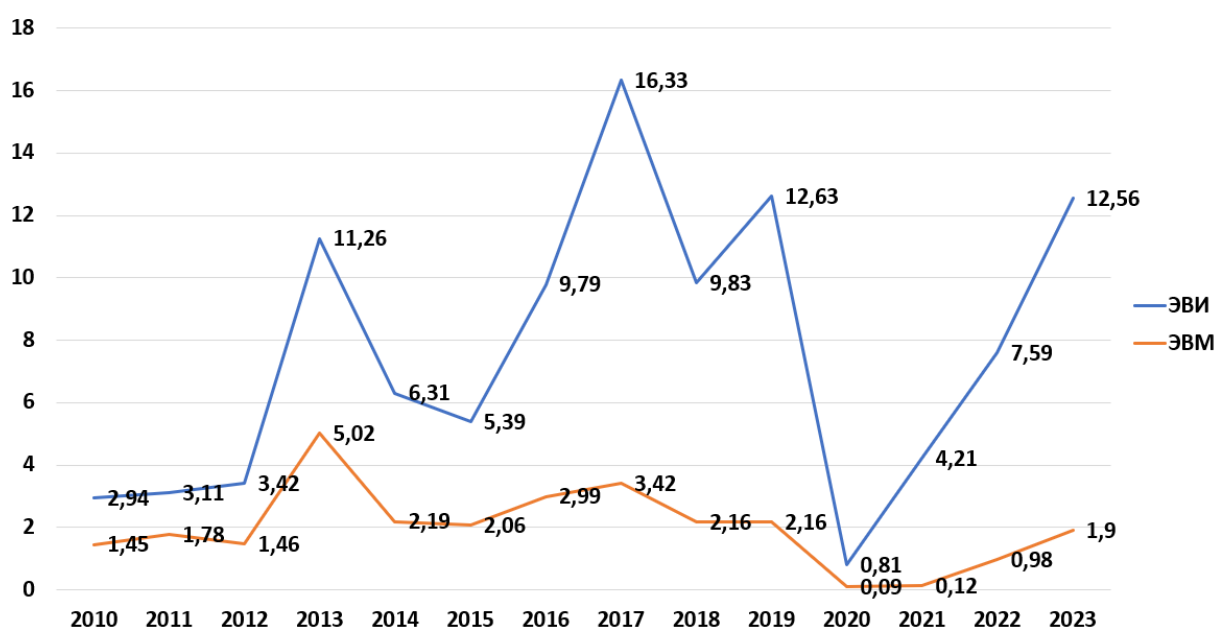


Рисунок 5 - Динамика заболеваемости ЭВИ и ЭВМ в РФ на 100 тысяч населения (2010-2023 гг.) (адаптировано по материалам Государственных докладов О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации за 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023 годы [5-10])

Согласно представленным данным с начала 2000-х годов динамика заболеваемости ЭВИ характеризуется периодическими подъемами и многократным снижением заболеваемости в 2020 г в связи с ограничительными мероприятиями, связанными с пандемией новой коронавирусной инфекции (COVID-19). В 2021, 2022 и 2023 годах отмечается постепенный рост и возвращение показателей заболеваемости ЭВИ к среднемноголетнему уровню до пандемии COVID-19. В России в клинической структуре заболеваний ЭВИ в течение многих лет преобладали экзантемные и «малые» формы (острая лихорадочная кратковременная болезнь без поражений ЦНС и внутренних органов). Доминирующее положение среди этиологических агентов ЭВИ занимают вирусы представителей вида *Enterovirus A*: Коксаки А16, Коксаки А6, Коксаки А10. Удельный вес ЭВМ составил 15% (2023 год), 12 % (2022 год), 2,8 % (2021 год), 11% (2020 год), 17,1 % (2019 год).

Риновиральная инфекция распространена во всех возрастных группах по всему миру круглый год, в странах умеренного климата пик заболеваемости риновирусной инфекцией приходится на осень и весну [12]. Инфекция распространяется больным человеком в основном воздушно-капельным путем, также возможна передача через предметы обихода. Риновирусы поражают верхние и нижние дыхательные пути. На долю риновирусов приходится более половины всех случаев ОРВИ, однако эпидемиологический надзор за риновирусами еще до конца не отлажен, поэтому сложно подсчитать точное количество случаев ОРВИ, ассоциированных с риновирусной инфекцией. Показано, что риновирусная инфекция может тормозить развитие гриппа и коронавирусной инфекции. Имеющиеся результаты исследований говорят о возрастающем эпидемиологическом и клиническом значении этой инфекции [12].

Основным клиническим синдромом, связанным с риновирусной инфекцией, является заболевание верхних дыхательных путей, которое традиционно называют «простудой». Продолжительность заболевания в большинстве случаев составляет не более 7 суток. Часто вспышки риновирусной инфекции регистрируются в детских коллективах и в медицинских учреждениях. Риновирусная инфекция

связана с бронхиолитом (у младенцев) и пневмонией (у пациентов с ослабленным иммунитетом). Однако все чаще диагностируются легочные и внелегочные осложнения при риновирусной инфекции. Также известно, что риновирусная инфекция является одной из причин обострения астмы и муковисцидоза у детей и хронического бронхита у взрослых [71].

1.3 Профилактика и лечение заболеваний, вызванных энтеровирусами

Специфическая профилактика в виде оральной полиовакцины (ОПВ) и инаktivированной полиовакцины (ИПВ) доступна для полиомиелита. Разработка вакцин против широкого спектра НПЭВ затруднена ввиду их чрезвычайно высокого серологического разнообразия. Из всех НПЭВ вакцина доступна против EV-A71, в Китае компаниями Sinovac Biotech, Beijing Vigoo Biological и Китайской академией медицинских наук были получены три инаktivированные вакцины, показавшие высокую эффективность и безопасность [19].

Лечение заболеваний, вызванных инфекцией энтеровирусами, определяется тяжестью интоксикации и выраженностью клинических симптомов, и включает применение симптоматических, патогенетических, иммуномодулирующих лекарственных средств [14]. Антибиотики применяются только при развитии бактериальных осложнений (бронхиты, пневмонии). Госпитализации подлежат пациенты с поражением нервной системы, сердца, печени и других тяжелых клинических формах заболевания. Лечение риновирусной инфекции симптоматическое. Для полиомиелита специфического лечения не существует. В зависимости от формы большое внимание уделяется дегидратационной терапии, соблюдению постельного режима и физического покоя, применению патогенетических средств в сочетании с физиотерапией, массажем, лечебной физкультурой.

1.4 Разработка этиотропных средств для терапии инфекций, вызываемых вирусами рода *Enterovirus*, на основе синтетических малых молекул

В настоящее время выделяют следующие принципиальные подходы к поиску противовирусных лекарственных препаратов: фенотипический скрининг обширных библиотек химических соединений, которому обычно противопоставляют мишень-ориентированный подбор ингибиторов [67]. При этом библиотеки соединений могут быть созданы на базе известного фармакофора путем модификации существующих противовирусных препаратов с целью улучшения их свойств или могут быть составлены из новых синтезированных химических соединений с ранее не описанной биологической активностью. Также перспективным является поиск новых противовирусных средств среди препаратов, зарегистрированных для других нозологий (перепрофилирование зарегистрированных лекарственных средств).

Этиотропные препараты направлены на устранение причины развития заболевания. Мишенями действия этиотропных противовирусных препаратов могут быть как вирусные белки, так и белки клетки-хозяина, критически важные для успешного размножения вируса [29]. Препараты прямого противовирусного действия, взаимодействуют со структурными или неструктурными вирусными белками. Преимуществами таких препаратов является высокая специфичность и потенциально низкий риск развития токсических эффектов, а самым существенным недостатком – неизбежная выработка к ним резистентности, в отличие от ингибиторов, направленных на белки клетки-хозяина. Преимуществом последних является активность в отношении широкого спектра вирусов за счет ингибирования общей для них мишени. Тем не менее, нельзя исключать возможность возникновения нежелательных эффектов в виде токсичности при нарушении функции белков клетки-хозяина. Следует также отметить, что в литературе описаны случаи выработки резистентности к ингибиторам клеточных белков [139, 141].

Основным способом повысить барьер для выработки резистентности является использование комбинаций лекарственных средств с разными механизмами действия, направленных на разные мишени, в том числе, на вирусную и на клеточную [83; 143; 146]. Кроме аддитивности в комбинации можно достичь синергического эффекта компонентов, что позволяет снизить дозы каждого компонента комбинации.

Ниже приведен краткий обзор синтетических малых молекул - этиотропных ингибиторов вирусов рода *Enterovirus*, для которых был охарактеризован механизм действия и показана активность *in vitro* и/или *in vivo*.

1.4.1 Ингибиторы структурных белков энтеровирусов и риновирусов

Капсид энтеровирусов и риновирусов разных типов имеет сложную поверхность с выступами, понижениями, карманами. Описано три группы мишеней для связывания противовирусных агентов на поверхности вирусного капсида: гидрофобный карман на дне каньона капсида, вершина капсида и карман на границе двух протомеров капсида [24]. Агенты, направленные на эти мишени, являются наиболее исследованной и многочисленной группой этиотропных ингибиторов энтеровирусов и риновирусов (Таблица 2).

Таблица 2 - Некоторые ингибиторы структурных белков вирусов рода *Enterovirus*

Наименование	Ингибирует	EC ₅₀ , мкМ	Источник
Плеконарил	ECHO3-7, 9, 11, 24, 30	0,01 - 0,31	[117]
	CVA9	0,005	[117]
	CVB1-5	0,001-0,05	[117]
	PV2	1,1	[45]
	PV3	0,22	[45]
	Разные штаммы EV-D68	0,38- 4,44	[119]
	Вирусы вида <i>Enterovirus alpharhino</i>	0,1-0,2	[80]

Продолжение Таблицы 2

Наименование	Ингибирует	EC ₅₀ , мкМ	Источник
	Вирусы вида <i>Enterovirus betarhino</i>	0,1-0,3	[80]
Пиродавир	PV1	10,0	[45]
	PV2	1,7	[45]
	PV3	0,56	[45]
	Различные геноварианты EV-A71	0,3-0,7	[134]
	Разные штаммы вируса EV-D68	2,4-9,6	[134]
	Вирусы вида <i>Enterovirus alpharhino</i>	0,05-39,2	[25]
	Вирусы вида <i>Enterovirus betarhino</i>	0,05-23,6	[25]
	CVA11, 13, 18	0,6-0,41	[25]
	CVB1,3,4	2,1-23,1	[25]
	ECHO9,11,12	0,05- 3,52	[25]
Вапендавир	Различные геноварианты EV-A71	0,4-0,9	[134]
	Вирусы вида <i>Enterovirus alpharhino</i>	3,8	[53]
	Вирусы вида <i>Enterovirus betarhino</i>	5,0	[53]
Покапавир	PV1	0,047	[113]
	PV2	0,012	[113]
	PV3	0,086	[105]
	CVA19	0,21	[34]
	ECHO4, 6, 11	0,04- 0,26	[34]
C603	EV-A71	74 ,0	[80]
	CVB3	>313	[80]
	ECHO11	2,5	[80]
	PV1	25,0	[80]
	Вирусы вида <i>Enterovirus alpharhino</i>	0,9-8,9	[80]
	Вирусы вида <i>Enterovirus betarhino</i>	0,01-15,0	[80]
OBR-5-340	CVB3 Nancy	0,16	[100]

Продолжение Таблицы 2

Наименование	Ингибирует	EC ₅₀ , мкМ	Источник
PR66	Различные геноварианты EV-A71	0,006- 0,058	[65]
	CVA16	0,19	[65]
4EDMAB	CVB3	9,1	[98]
Соединение 17	CVB1, 3-6	0,7-37,0	[22]
Бриллиантовый черный	Различные геноварианты EV-A71	2,39- 28,12	[103]

Первой обнаруженной мишенью на поверхности капсида стал VP1-гидрофобный карман, вход в который расположен на дне каньона - впадины вокруг каждого пентамера капсида. Этот сайт обычно занят «карманным фактором» (жирной кислотой), но связывание химически оптимизированных соединений приводит к вытеснению липидного фактора из-за более высокой аффинности связывания с карманом.

В 1976 – 1990х гг фармацевтической компанией Sterling—Winthrop были разработаны WIN- соединения с высокой ингибирующей активностью в отношении энтеровирусов, самые известные представители этой группы - препарат плеконарил (WIN 63843), дизоксарил (WIN 51711) и их производные [117]. Было показано, что WIN соединения замещают карманный фактор, что приводит к энтропийной стабилизации капсида и не позволяет происходить конформационным изменениям (образованию «А-частиц»), необходимым для раздевания вируса и высвобождения его генома (Рисунок 6).

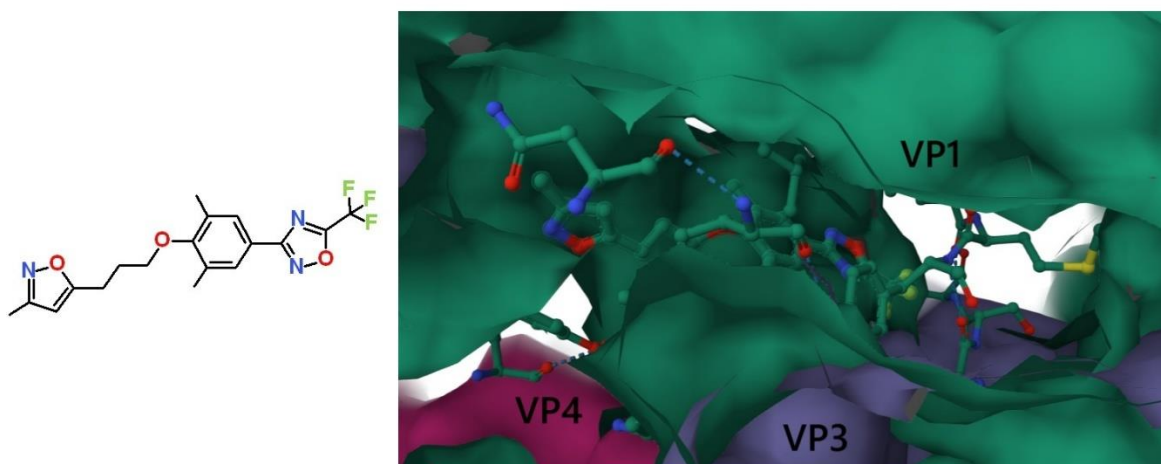


Рисунок 6 - Структурная формула плеконарила и визуализация его взаимодействия с белком VP1 (PDB ID: 7OZK [56])

Таким механизмом действия обладают и другие капсид-связывающие агенты: пиридазиновые аналоги - пиродавир (R77975) и СА603, его производное - вапендавир (ВТА-798), активные в отношении энтеровирусов и риновирусов. Покапавир (SCH-48973, V-073) продемонстрировал высокую активность в отношении различных вариантов полиовируса, а также неполиомиелитных энтеровирусов (Рисунок 7).

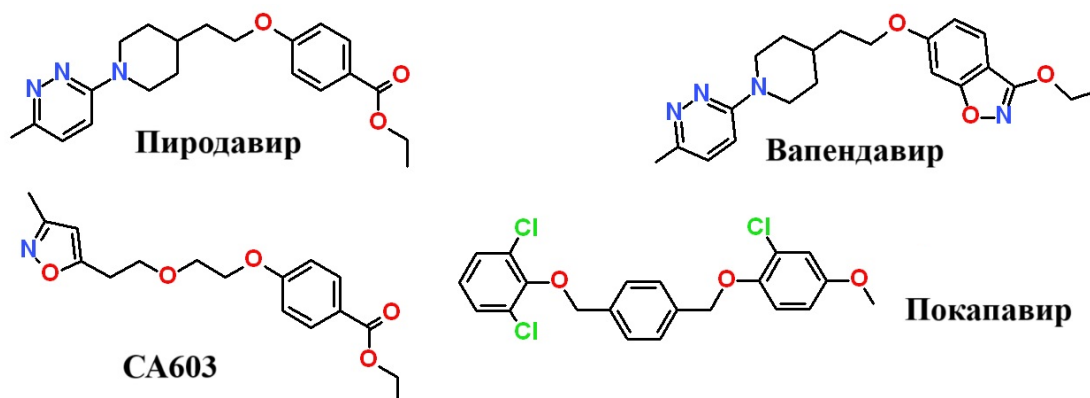


Рисунок 7 - Структурные формулы пиродавира, вапендавира, соединения СА603 и покапавира

Несмотря на многообещающие результаты доклинических исследований (активность в наномолярном и микромолярном диапазоне в отношении широкого спектра энтеровирусов и риновирусов), ни одно из соединений, которые были допущены до стадии клинических испытаний (плеконарил, вапендавир, покапавир,

пиродавир), не прошло клинические исследования из-за неблагоприятного фармакокинетического профиля, недостаточной эффективности, нежелательных эффектов, а также возникновения резистентных штаммов у пациентов. Примечательно, что мутации резистентности затрагивают аминокислотные остатки как в пределах гидрофобного кармана, так и вне его [122]. Тем не менее ввиду универсальности и значимости этой мишени продолжается разработка капсид-связывающих агентов, направленных на VP1- гидрофобный карман, с улучшенными характеристиками. Так, была получена серия активных в отношении энтеровирусов группы В *in vitro* и *in vivo* пиразоло[3,4-d]пиримидинов, среди которых соединение OBR-5-340 ингибировало плеконарил-резистентный штамм вируса Коксаки В3 и было метаболически стабильно [100]. Также было синтезировано производное имидазолидинона PRR66, активное в отношении различных геновариантов EV-A71 и CVA16 *in vitro* и *in vivo*, активность в отношении CVB отсутствовала [65] (Рисунок 8).

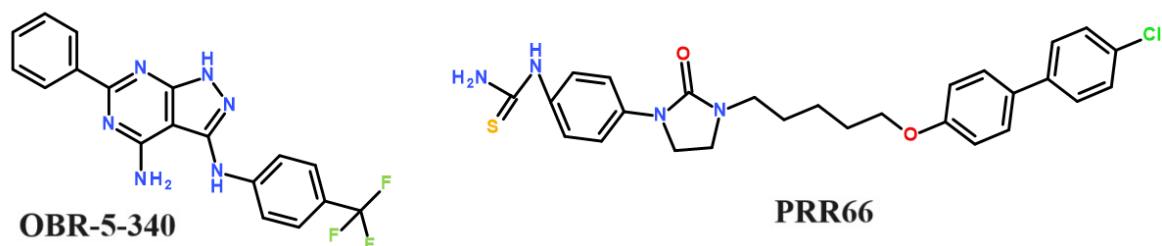


Рисунок 8 - Структурные формулы соединений OBR-5-340 и PRR66

Следующая мишень на поверхности вирусного капсида энтеровирусов А и некоторых энтеровирусов В – несущая положительный заряд вершина капсида, образованная пятью копиями белка VP1, которая отвечает за взаимодействие с рецептором. Ингибиторы этого типа предотвращают связывание и поглощение вируса, но, в отличие от других капсид-связывающих агентов, не стабилизируют вирусные частицы. К синтетическим молекулам, направленным на эту мишень, относятся азоловые красители (бриллиантовый черный, краситель E151). Высокая активность бриллиантового черного была показана *in vitro* и *in vivo* в отношении EV-A71, но клинические исследования не проводились (Рисунок 9) [103].

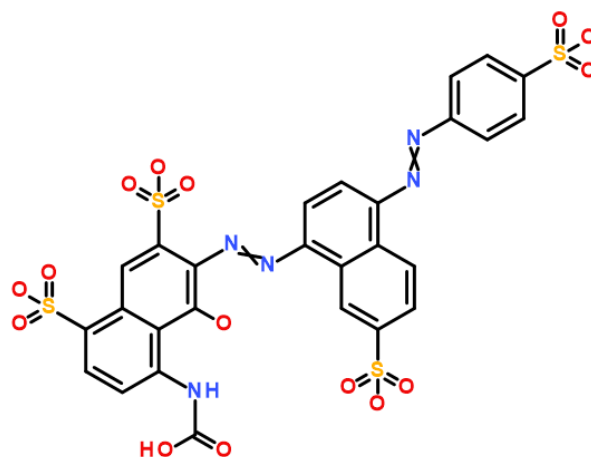


Рисунок 9 - Структурная формула бриллиантового черного

В 2017 году была выявлена новая мишень на поверхности вирусного капсида – карман на границе двух соседних протомеров капсида, образованный двумя белками VP1 и одним белком VP3 [22]. Установлено, что в формировании этого кармана задействованы следующие аминокислоты: со стороны белка VP1 – аминокислотные остатки 73, 75–78, 155–157, 159–160, 219 и 234, со стороны белка VP3 – аминокислотные остатки 233–236 (вирус Коксаки В3). В порядке появления были описаны следующие молекулы, направленные на эту мишень: 4 – (диметиламино)-бензойная кислота (4EDMAB), производное бензолсульфонамида (4-[[4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)фенил]сульфониламино]бензойная кислота, соединение 17) (Рисунок 10) [22, 98].

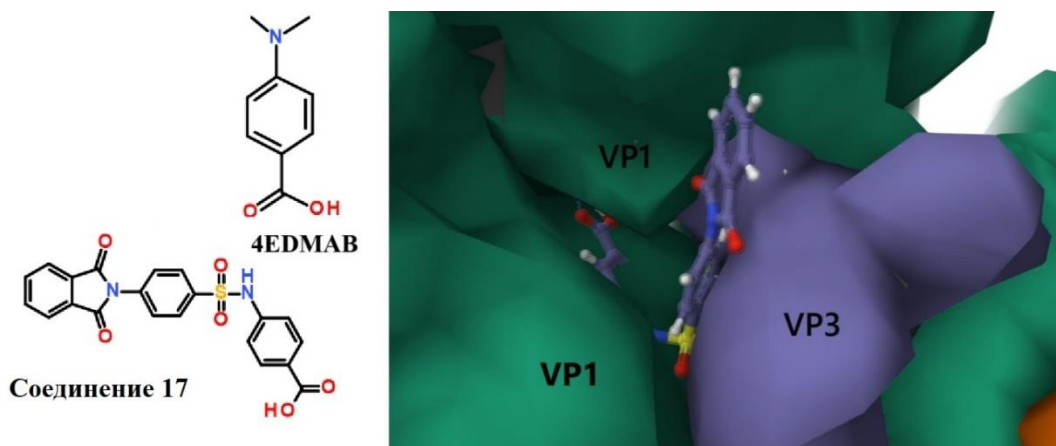


Рисунок 10 - Структурные формулы соединения 4EDMAB и соединения 17 и визуализация взаимодействия соединения 17 с межпротомерным карманом (PDB ID: 6GZV [21])

Показано, что для сохранения активности необходимо наличие неизменной карбоксильной группы. Соединения данной группы обладают цитопротективной активностью в отношении широкого спектра энтеровирусов вида В со значениями EC_{50} в микромолярном диапазоне. Активность в отношении вирусов CVA21, EV-D68, PV1, риновирусов отсутствовала.

1.4.2 Ингибиторы неструктурных белков энтеровирусов и риновирусов

Среди ингибиторов неструктурных белков энтеровирусов и риновирусов, для которых было показано прямое взаимодействие со своими мишенями, выделяют ингибиторы вирусных протеаз 2А и 3С, ингибиторы полимеразы и ингибиторы многофункционального белка 2С (Таблица 3) [36].

Таблица 3 - Некоторые ингибиторы неструктурных белков вирусов рода *Enterovirus*

Наименование	Ингибирует	EC_{50} , мкМ	Источник
Мишень: протеаза 3Cpro			
Рупинтривир	PV1-3	0,005 - 0,041	[45]
	Различные геноварианты EV A71	0,005 – 0,012	[134]
	CVA21	0,147	[116]
	CVB3	0,183	[116]
	EV11	0,014	[116]
	EV70	0,007	[116]
	EVD68	0,002- 0,004	[119]
	Вирусы вида <i>Enterovirus alpharhino</i>	0,003-0,081	[116]
	Вирусы вида <i>Enterovirus betarhino</i>	0,003-0,081	[116]
	Вирусы вида <i>Enterovirus cerhino</i>	0,093	[63]
GC376	CVA6, 7, 10, 16	0,18-0,24	[38]
SLQ-4	Различные геноварианты EV A71	0,089-0,119	[94]

Продолжение Таблицы 3

Наименование	Ингибирует	EC ₅₀ , мкМ	Источник
	CVA16	0,083	[94]
	CVB3	0,086	[94]
SLQ-5	Различные геноварианты EV A71	0,112 – 0,239	[94]
	CVA16	0,112	[94]
	CVB3	0,106	[94]
Бензеразид	CVB3	2,4	[76]
Мишень: протеаза 2A			
Телапревир	Различные штаммы EV D68	0,4 -1,9	[107]
Мишень: полимеразы 3D			
Гемцитабин	CVB3	5,0	[73]
	EV71	0,2-1	[73]
	Вирусы вида <i>Enterovirus alpharhino</i>	1,0-5,0	[73]
	Вирусы вида <i>Enterovirus betarhino</i>	1,0-5,0	[73]
Рибавирин	EV71	266,0	[87]
	CVB1-6	0,16-0,62	[127]
	PV1-3	55,0-64,0	[45]
Амилорид	CVB3	60,0	[64]
	HRV2	120,0	[64]
EIPA	CVB3	2,0	[64]
	HRV2	7,0	[64]
DTriP-22	EV71	0,15-0,98	[37]
	CVA 9, 10, 16	0,08-1,06	[37]
	CVA24	0,08	[37]
	CVB1-6	0,07-0,33	[37]
	HRV-2	1,69	[37]
GPC-N114	PV1-3	0,26-1,00	[138]

Продолжение Таблицы 3

Наименование	Ингибирует	EC ₅₀ , мкМ	Источник
	EV71	0,13	[138]
	EVD68	1,44	[138]
	HRV2,	0,55	[138]
	HRV14	1,73	[138]
	CVB3	0,15	[138]
AcTU	CVA16	0,004	[93]
	CVB1	0,006	[93]
	CVA21	0,017	[93]
	EVD68	<0,001	[93]
Мишень: белок 2C			
Энвироксим	PV1-3	0,035-0,2	[45]
	EV D68	0,19-0,45	[131]
	EV A71	0,1-0,2	[134]
Флуоксетин	EV D68	1,35	[136]
	CVB3	3,36	[136]
Дибукаин	EV71	7,59	[135]
	CVB3	1,60	[135]
	EV D68	3,03	[135]
R523062	EV D68	2,3 – 6,4	[97]
Пептид CL	EV 71	1,35	[51]
	CVA16	2,16	[51]
Гуанидин гидрохлорид	EVA71	305,0	[47]
	EVD68	98,0	[47]
	CVB1-6	2,8-6,0	[127]

Цистеиновая протеаза - белок 3Cpro является основной протеазой энтеровирусов и играет важнейшую роль на ранних этапах их жизненного цикла, расщепляя как вирусный полипептид, так и белки клетки-хозяина [81].

Пептидомиметики представляют собой наиболее многочисленный класс ингибиторов энтеровирусных протеаз, активность которых находится в наномолярном и микромолярном диапазоне. Для необратимого ковалентного ингибитора белка 3Срго пептидомиметика рупинтривир (AG-7088) была показана эффективность *in vitro* и *in vivo*, но в клинических испытаниях при применении для терапии риновирусной инфекции он не был активным [42]. Ковалентный ингибитор основной протеазы коронавирусов препарат GC376 также обладает выраженной активностью в отношении белка 3Срго вирусов Коксаки А10, А6, А7, А16 *in vitro* (IC₅₀ 0,1-0,2 мкМ) (Рисунок 11) [38].

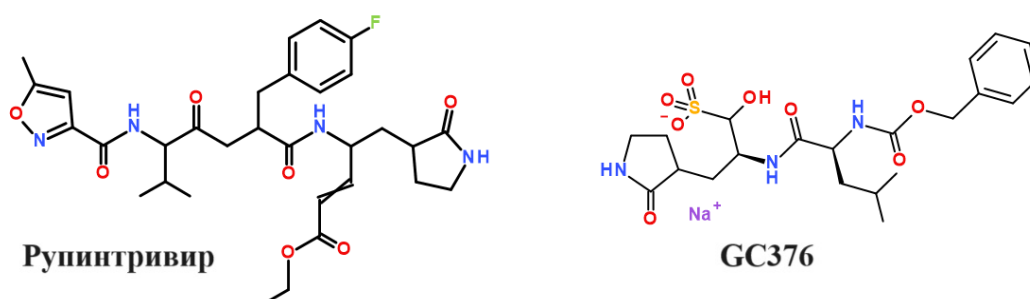


Рисунок 11 - Структурные формулы рупинтривира и GC376

Кроме необратимых ковалентных ингибиторов сериновой протеазы были синтезированы обратимые ковалентные ингибиторы производные цианоакрилата и Вос-защищенных цианоариламинов (SLQ-4 и SLQ-5), активные *in vitro* в отношении энтеровирусов вида А и В (Рисунок 12) [94].

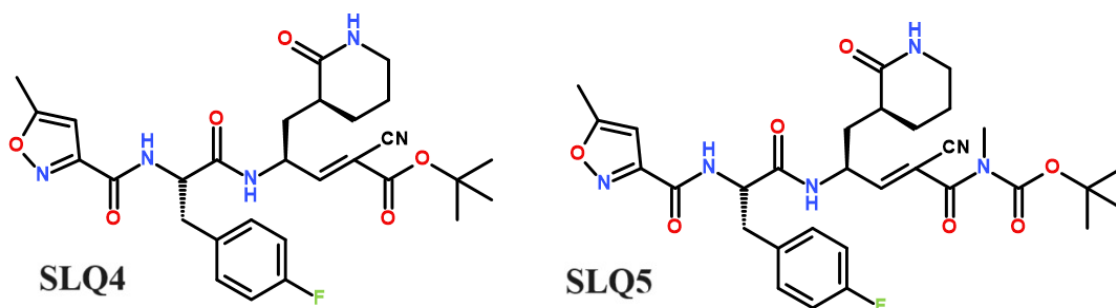


Рисунок 12 - Структурные формулы SLQ4 и SLQ5

В результате исследований по перепрофилированию лекарственных препаратов в качестве ингибитора белка 3С вируса Коксаки В3 был обнаружен бензеразид, коммерческий препарат, разработанный компанией Roche для лечения болезни Паркинсона. Бензеразид является нековалентным обратимым аллостерическим ингибитором 3С протеазы (Рисунок 13) [76]. Известные также его улучшенные производные – аналоги 2,3,4-тригидроксибензилгидразида [77].

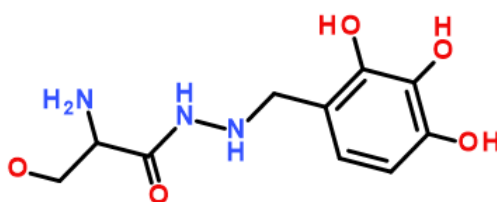


Рисунок 13 - Структурная формула бензеразида

Протеаза 2А относится к семейству химотрипсинподобных эндопептидаз и участвует в расщеплении вирусного полипептида на границе между структурными и неструктурными белками, а также ряд клеточных белков, регулирующих процессы трансляции белков [152]. В настоящее время известно очень ограниченное количество молекул-ингибиторов белка 2А вирусов рода *Enterovirus*. Показано, что пептид LVLQTM, псевдосубстрат белка 2А, обладает активностью *in vitro* и *in vivo* в отношении риновирусов человека, а также *in vitro* активностью в отношении EV-A71 [110]. Телапревир – зарегистрированный ингибитор сериновой NS3-4А протеазы вируса гепатита С обладает активностью в отношении протеазы 2А EV-D68 *in vitro* и *in vivo*: при профилактическом введении в дозе 35 мг/кг он снижал тяжесть паралича у мышей, инфицированных EV-D68 (Рисунок 14) [54].

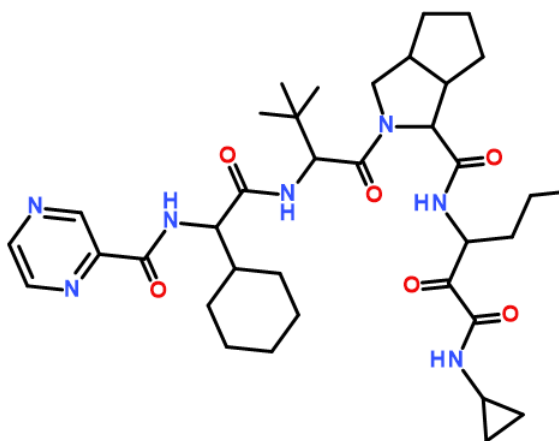


Рисунок 14 - Структурная формула телапревира

Ингибиторы 3D-полимеразы можно разделить на нуклеозидные/нуклеотидные ингибиторы и ненуклеозидные/нуклеотидные ингибиторы [3]. Ингибиторы первой группы напрямую подавляют репликацию вируса, включаясь в нуклеиновую кислоту, вызывая летальные мутации и/или изменяя клеточный пул нуклеотидов. К этим соединениям относится синтетический нуклеозид рибавирин, имитирующий инозин и гуанозин, и гемцитабин, аналог цитидина (Рисунок 15) [73].

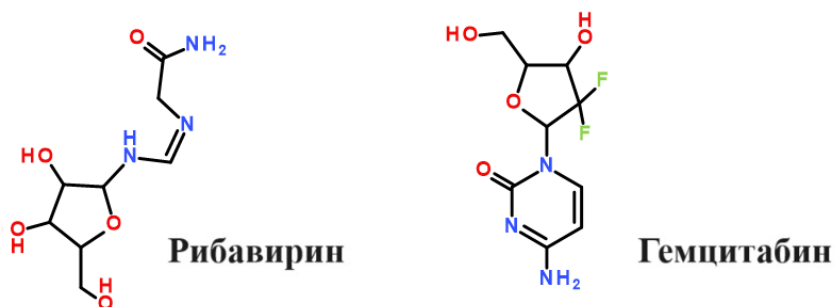


Рисунок 15 - Структурные формулы рибавирина и гемцитабина

Рибавирин – ингибитор широкого спектра РНК- и ДНК-содержащих вирусов. В частности, он применяется в терапии вирусного гепатита С в комбинации с пегилированным интерфероном. Широкий спектр активности этой молекулы объясняется его плеiotропными эффектами: иммуномодулирующее действие, снижение пула внутриклеточного гуанозинтрифосфата вследствие ингибирования фермента инозинмонофосфат-дегидрогеназы -1, ингибирование активности РНК-

зависимой РНК-полимеразы, подавление экспонирования РНК и летальный мутагенез вирусной РНК из-за ошибочного встраивания рибавирина в геном вируса [32]. Показана протективная активность рибавирина при введении в дозе 100 мг/кг мышам, инфицированным EV-A71 [87]. Существенным недостатком рибавирина является наличие побочных эффектов, которые ограничивают его применение. Гемцитабин – препарат для терапии онкологических заболеваний, может включаться в вирусную РНК, вызывая ее мутации, и может непосредственно взаимодействовать с 3D-полимеразой, нарушая встраивание нуклеотидов, необходимых для процесса полимеризации РНК. Также гемцитабин стимулирует врожденный иммунный ответ посредством угнетения биосинтеза пиримидинов. Гемцитабин ингибирует репродукцию риновирусов, а также вируса Коксаки В3 и EV-A71 *in vitro*. Было показано наличие синергического эффекта при применении комбинации рибавирина и гемцитабина *in vitro* в отношении EV-A71 и CVB3 [73].

К ненуклеозидным/нуклеотидным ингибиторам белка 3D относятся соединения DTrIP-22, амилорид (диуретик) и GPC-N114 и их производные. DTrIP-22 ((4{4-[(2-бромфенил)-(3-метилтиофен-2-ил)-метил]пиперазин-1-ил}-1-фенил-1Н-пиразоло[3,4-d] пиримидин)) принадлежит к группе пиразоло[3,4-d] пиримидинов и ингибирует поли(U) элонгирующую активность 3D полимеразы EV-A71, а также широкого спектра других неполиомиелитных энтеровирусов *in vitro* [37]. Амилорид и его производное EIPA подавляют инициацию репликации РНК через ингибирование уридилирования белка VPg PV1 и CVB3 [59; 64; 114]. GPC-N114 подавляет элонгацию РНК (его мишенью является РНК-связывающий канал 3D полимеразы) и обладает широким спектром активности *in vitro* в отношении полиовирусов, неполиомиелитных энтеровирусов и риновирусов [126]. Недавно был получен новый ингибитор 3D полимеразы – AcTU с широким спектром активности против энтеровирусов вида А, В, С и D *in vitro*, а также активностью *in vivo* на модели инфекции, вызванной EV-A71 (Рисунок 16) [93].

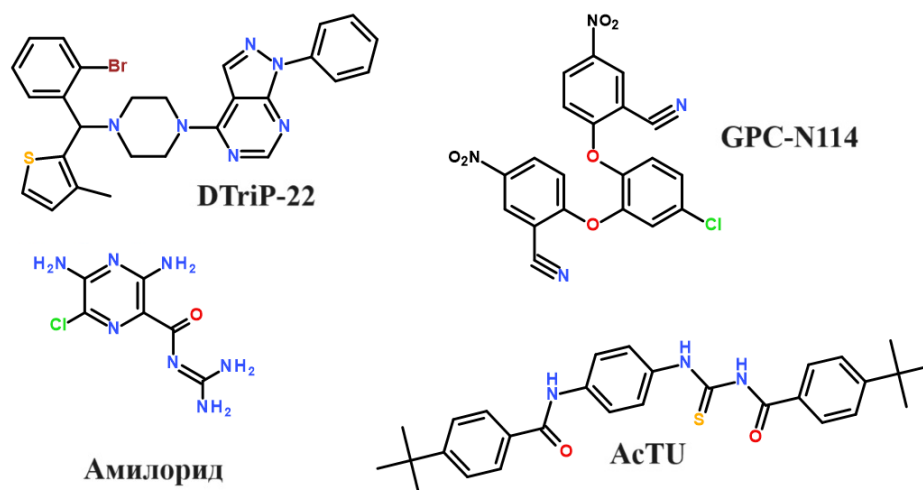


Рисунок 16 - Структурные формулы DTriP-22, амилорида, GPC-N114 и AcTU

Белок 2С представляет собой исключительно перспективную мишень для разработки противовирусных препаратов прямого действия ввиду его многофункциональности в жизненном цикле вируса [84]. 2С обладает плейотропными функциями: участвует в репликации вирусной РНК, ее инкапсидации и морфогенезе вирионов, обладает АТФазной и геликазной активностью. Показано его участие в ремоделировании мембран клетки для образования репликативных органелл. На сегодняшний день описано порядка 20 молекул-ингибиторов энтеровирусов, резистентность энтеровирусов к которым сопровождалась мутациями в гене белка 2С [47]. Это гуанидин гидрохлорид, флуоксетин (селективный ингибитор обратного захвата серотонина), дибукаин (местный анестетик), пирлиндол (обратимый ингибитор моноаминоксидазы типа А), и их производные, зуклопентиксол (антипсихотическое средство, производное тиоксантена), НВВ, MRL-1237, TBZE-029, метрифудил, N6-бензиладенозин, формотелор, производные пиразолопиридина, производные N-бензиламида (R523062) и пептид 2CL (Рисунок 17). Примечательно, что часть из них была выявлена в результате скринингового исследования из библиотеки зарегистрированных FDA препаратов [135]. Однако не для всех из них были подробно изучены механизм ингибирования 2С и протективная активность *in vivo*.

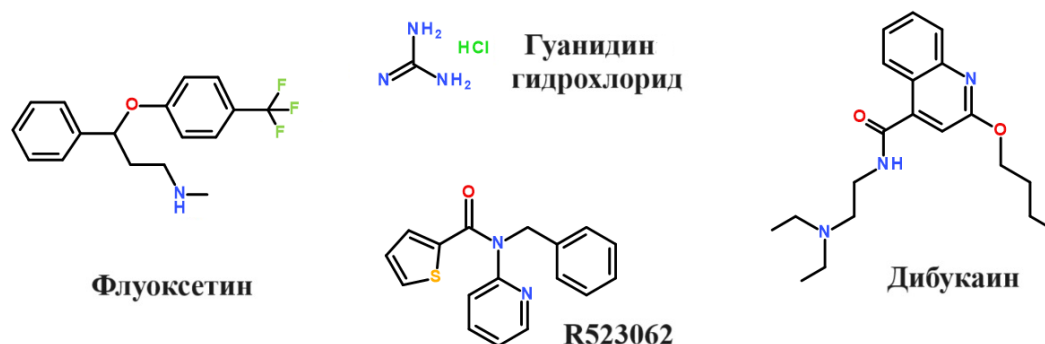


Рисунок 17 - Структурные формулы некоторых ингибиторов белка 2C

Прямое связывание с 2C *in vitro* было показано для дибукаина, флуоксетина и R523062 [31; 97; 133]. Для пептида 2CL (последовательность YGRKKRRQRRRGSGREYNNRSAIGNTIEALFQ) показано ингибирование геликазной активности 2C *in vitro*. Гуанидин гидрохлорид активен *in vivo* на модели инфекции EV-D68, предположительно, его ингибирующее действие направлено на АТФазную и геликазную активность 2C. Флуоксетин (ингибитор АТФ-азной функции 2C) активен *in vitro* в отношении энтеровирусов вида А и D и некоторых риновирусов, однако при его клиническом применении у пациентов с острым вялым миелитом, вызванным инфекцией EV-D68, не было отмечено улучшений состояния [30]. Производные дибукаина и пептид 2CL проявили протективную активность на животной модели инфекции EV-A71 [51; 133].

1.5 Заключение по разделу

Энтеровирусы и риновирусы являются возбудителями заболеваний человека. Обзор актуальной научной литературы позволил установить, что несмотря на многолетнюю и плодотворную историю изучения вирусов рода *Enterovirus* с целью поиска и разработки этиотропных лекарственных препаратов для терапии энтеровирусных и риновирусных инфекций человека, на сегодняшний день не был зарегистрирован ни один из препаратов из-за низкой эффективности или нежелательных побочных эффектов.

Наиболее разработанным классом ингибиторов жизненного цикла вирусов является группа капсид-связывающих агентов, к которой относятся аналоги плеконарила и производные бензолсульфамидов. Перспективны также исследования в направлении выявления новых ингибиторов неструктурных белков вирусов рода *Enterovirus*, в частности, белка 2C с учетом его плеiotропных функций в жизненном цикле энтеровирусов.

Анализ современного уровня знаний о строении и функциях белков энтеровирусов и риновирусов, а также их жизненном цикле послужил основой для формирования перечня методов исследований и интерпретации полученных результатов. Целесообразно проводить поиск ингибиторов жизненного цикла энтеровирусов и риновирусов с улучшенными свойствами как среди новых соединений группы бензолсульфамидов и аналогов плеконарила, для которых было показано наличие противовирусной активности, так и среди соединений, противовирусный потенциал которых ранее не был исследован (лейковердазилов и вердазилов).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Материалы исследований

2.1.1 Клетки и вирусы

В исследовании использовали следующие вирусы из коллекции вирусных штаммов Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека:

- вирус Коксаки В3, штамм Nancy (передан из Государственной коллекции вирусов);
- вирус Коксаки В4 (GenBank: PV567714);
- вирус Коксаки В5 (GenBank: OQ939946);
- вирус Коксаки А16 (Genbank: PV567713);
- вирус Коксаки А21 (GenBank: KR185976);
- вирус ЕСНОЗ;
- вирус ЕСНО30 (GenBank: KU841456.1);
- риновирус 14 типа (передан из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России).

Изоляты вирусов Коксаки В4, Коксаки В5, Коксаки А16, ЕСНОЗ, ЕСНО30, Коксаки А21 были получены в рамках реализации программы надзора за полиомиелитом и ОВП. Идентификация вирусов была проведена путем частичного секвенирования геномной области VP1 с использованием EV-специфических праймеров [111]. Вирусы Коксаки В3, В4, В5 накапливали в перmissive культуре клеток Vero (ATCC CCL-81) в течение 6 последовательных пассажей. Вирус ЕСНОЗ, ЕСНО30, вирусы Коксаки А16 и Коксаки А21 накапливали в культуре клеток RD (ATCC CCL-136) в течение 6 последовательных пассажей. Риновирус накапливали в культуре клеток MRC5 (ATCC CCL-171) в течение 6 последовательных пассажей. Клетки культивировали при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂. Для проведения экспериментов клетки высевали на 96-

луночные планшеты (1×10^4 клеток на 1 лунку в 0,1 мл среды), 24-луночные планшеты (5×10^4 клеток на 1 лунку в 0,5 мл среды), 6-луночные планшеты (2×10^5 клеток на 1 лунку в 3 мл среды).

2.1.2 Лабораторные животные

Эксперименты *in vivo* проводили на самцах и самках мышей линии BALB/c (возраст 4-5 недель, возраст 6-8 недель), полученных из Федерального государственного унитарного предприятия «Питомник лабораторных животных «Рапполово» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Содержание животных и манипуляции с ними выполняли в соответствии с Руководством [61].

2.1.3 Исследуемые соединения

Библиотека химических соединений производных бензолсульфамидов была синтезирована в Центре фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова Ярославского государственного педагогического университета имени К. Д. Ушинского. Библиотека химических соединений вердазилов и лейковердазилов была синтезирована в Институте органического синтеза Уральского Отделения Российской Академии Наук им. И.Я. Постовского. Библиотека химических соединений аналогов плеконарила была синтезирована в Федеральном государственном учреждении «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». Соединения были получены в виде порошков, навески которых растворяли в диметилсульфоксиде для получения стока с концентрацией 20 мг/мл.

2.1.4 Питательные среды

Для культивирования клеток использовали ростовую питательную среду альфа-MEM и RPMI-1640 (Биолот, Россия), содержащую 4 mM L-глутамина, 5 %

фетальной бычьей сыворотки FBS (Gibco, США) и антибиотик пенициллин/стрептомицин (Gibco, США). В экспериментах с вирусами проводили замену ростовой питательной среды на поддерживающую бессывороточную среду с добавлением антибиотика пенициллина/стрептомицина (Gibco, США).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Определение инфекционного титра вирусов

Инфекционный титр вируса определяли методом титрования по конечной точке (метод предельных серийных разведений). Из вирусосодержащего материала готовили серию десятикратных разведений на поддерживающей среде. Полученными разведениями заражали клетки перmissive линии, рассеянные в 96-луночные планшеты. Планшеты инкубировали в атмосфере 5 % CO₂ при 36°C в течение 72 ч. По окончании инкубации визуально оценивали наличие цитопатического действия (ЦПД) в лунках. Инфекционный титр вируса рассчитывали по методу Спирмена-Кэрбера и выражали в логарифмах числа 50 %-ных цитопатических доз (lgTCID₅₀) [75].

2.2.2 Оценка цитотоксичности исследуемых соединений

Цитотоксичность исследуемых соединений изучали при помощи классической методики метилтетразолиевого теста (МТТ) [105]. Клеточные линии выращивали на 96-луночных планшетах в течение 24 ч до формирования 90 % монослоя. После этого клетки инкубировали с серийными разведениями исследуемых соединений в течение 24 ч или 72 ч, затем однократно промывали монослой клеток поддерживающей средой и добавляли в каждую лунку по 100 мкл рабочего раствора 3-(4,5-диметилтиазолил-2) 2,5-дифенилтетразолия бромид в среде для клеток (0,5 мг/мл) и инкубировали 2 ч в условиях 37 °C и увлажненной атмосферы с 5 % CO₂. Затем среду отбирали, в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора диметилсульфоксида (ДМСО) и растворяли образовавшийся осадок

формаза на в течение 30 минут. Оптическую плотность полученного раствора формаза на в ДМСО измеряли на планшетном спектрофотометре (Thermo Scientific, США) при длине волны 535 нм. Измерение оптической плотности в растворе формаза на позволяет оценить количество жизнеспособных клеток и гибель клеток, индуцированную тем или иным соединением. За 100 % жизнеспособность принимали оптическую плотность в лунках контроля клеток, инкубированных в поддерживающей среде с добавлением 1% ДМСО (без добавления исследуемых соединений). Определение цитотоксической концентрации, вызывающей потерю жизнеспособности 50 % клеток (CC_{50}) в точке 24 часа или 72 часа, осуществляли при помощи программы GraphPad Prism 8.0 путем анализа нелинейной регрессии (4-параметрической логистической кривой) в системе координат «log дозы–эффект».

2.2.3 Оценка цитопротективной активности исследуемых соединений

Пермиссивную клеточную культуру выращивали на 96-луночных планшетах в течение 24 ч до формирования 90 % монослоя [80]. В лунки планшетов с монослоем клеток вносили по 100 мкл серийных разведений исследуемых соединений или поддерживающую среду с добавлением 1% ДМСО (лунки контроль вируса, контроля клеток). Планшеты с клетками инкубировали в атмосфере 5 % CO_2 при 36 °C в течение 30 мин. После этого во все лунки планшета кроме лунок контроля клеток вносили по 100 мкл вируса (m.o.i. 0,01) в поддерживающей среде. Планшеты инкубировали в атмосфере 5 % CO_2 при 36 °C в течение 72 ч. По окончании инкубации определяли жизнеспособность клеток при помощи МТТ [105]. Определение эффективной концентрации, подавляющей цитопатическое действие вируса на 50 % (EC_{50}), осуществляли в программе GraphPad Prism 8.0 путем анализа нелинейной регрессии (4-параметрической логистической кривой) в системе координат «log дозы – эффект». Для каждого вещества рассчитывали индекс селективности (SI) – отношение CC_{50} в точке 72 часа к EC_{50} . Эксперимент выполняли в трех повторностях. Активными считали соединения со значениями индекса селективности 10 и выше [129].

2.2.4 Изучение вирус-ингибирующего действия соединений-лидеров

Для исследования вирус-ингибирующего действия соединений-лидеров выполняли тест на снижение продукции вирусного потомства [22]. Клетки соответствующей перmissive линии сеяли на 24-луночные планшеты и инкубировали в течение 24 ч до формирования монослоя. За 1 час до инфицирования вирусом в лунки планшета вносили серийные разведения исследуемых соединений или поддерживающую среду с добавлением 1% ДМСО (лунки контроль вируса). После добавления вируса в лунки (m.o.i. 0,01) инкубировали планшеты в течение 1 часа в атмосфере 5% CO₂ при 36°C, затем убирали вирусосодержащую жидкость из лунок, клетки промывали поддерживающей средой и повторно вносили в соответствующие лунки планшета серийные разведения исследуемых соединений или поддерживающую среду с добавлением 1% ДМСО (контроль вируса). Планшеты инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 36°C в течение 24 часов. После этого определяли инфекционный титр вирусного потомства в каждой лунке планшета методом предельных серийных разведений. Эксперимент выполняли в трех повторностях. Расчет концентрации, вызывающей 50 % ингибирование вирусной репродукции (IC₅₀), осуществляли в программе GraphPad Prism 8.0 путем анализа нелинейной регрессии (4-параметрической логистической кривой) в системе координат «log дозы – эффект». Для каждого вещества рассчитывали индекс селективности (SI) – отношение CC₅₀ в точке 24 часа к IC₅₀. Активными считали соединения, для которых значение индекса селективности составляло 10 и выше [129].

2.2.5 Исследование вирулицидной активности соединений

Инактивацию вируса проводили в бесклеточной системе [17]. В ходе эксперимента исследуемые соединения в выбранных концентрациях инкубировали в течение 1 ч с вирусом Коксаки В5 (доза 10⁵ ТЦД₅₀) в отдельных микроцентрифужных пробирках, после чего оценивали инфекционный титр вируса

методом титрования по конечной точке (метод предельных серийных разведений). В качестве контроля вирулицидного действия вирус инкубировали с 96% этанолом в тех же условиях. В образце контроля вируса вирус инкубировали с поддерживающей средой с добавлением 1% ДМСО (контроль вируса) в тех же условиях. В качестве нейтрализатора использовали инактивированную FBS (Gibco, США). Эксперимент выполняли в трех повторностях.

2.2.6 Тест на термостабильность вирусного капсида

Для установления принадлежности исследуемых соединений к группе капсид-связывающих агентов выполняли исследование термостабильности вирусного капсида [22; 80]. На первом этапе выполняли подбор диапазона температур для выполнения теста. Для этого суспензию вируса Коксаки В5 (10^5 ТЦД₅₀) в поддерживающей среде с добавлением 1% ДМСО вносили по 50 мкл в индивидуальные стерильные тонкостенные ПЦР-пробирки, которые нагревали в течение 2 минут в градиенте температур от 44,5 до 53,8 °С с последующим быстрым охлаждением до 4 °С в ПЦР-аппарате BioRad CFX (BioRad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США). После этого определяли инфекционный титр вируса при каждой температуре нагревания методом титрования по конечной точке. Эксперимент выполняли в трех повторностях.

После определения рабочего диапазона температур инактивации вирус Коксаки В5 (10^5 ТЦД₅₀) предварительно инкубировали с исследуемыми соединениями в указанных концентрациях или с поддерживающей средой с добавлением 1% ДМСО (контроль вируса) в течение 30 минут при +37 °С. Вносили по 50 мкл полученной суспензии вируса в индивидуальные стерильные тонкостенные ПЦР-пробирки. Пробирки нагревали в течение 2 минут в градиенте температур от 44,5 до 53,8 °С с последующим быстрым охлаждением до 4 °С в ПЦР-аппарате BioRad CFX (BioRad Laboratories, Inc., Геркулес, Калифорния, США). Таким образом, вирусная суспензия в каждой ПЦР-пробирке подвергалась действию одной температуры в течение 2 минут. Затем определяли инфекционный

титр вируса при каждой температуре нагревания методом титрования по конечной точке. Эксперимент выполняли в трех повторностях.

2.2.7 Исследование противовирусной активности соединений в зависимости от способа их применения

Клетки линии Vero сеяли на 24-луночные планшеты и инкубировали в течение 24 ч до формирования монослоя. Исследуемые соединения применяли разными способами. В первом варианте (профилактическое применение) серийные разведения исследуемых соединений или поддерживающую среду с добавлением 1% ДМСО (контроль вируса) вносили в лунки планшета, инкубировали планшет в течение 1 часа при +37°C, затем отмывали лунки от исследуемых соединений и добавляли вирус Коксаки B5 (m.o.i. 0,01). Инкубировали планшет в течение 1 часа при +4°C, затем убирали вирусосодержащую жидкость из лунок, лунки планшета заполняли поддерживающей средой. Во втором варианте (применение на этапе сорбции вируса) серийные разведения исследуемых соединений или поддерживающую среду с добавлением 1% ДМСО (контроль вируса) вносили в лунки планшета одновременно с добавлением вируса Коксаки B5 (m.o.i. 0,01), инкубировали планшет в течение 1 часа при +4°C, затем убирали вирусосодержащую жидкость из лунок, лунки планшета заполняли поддерживающей средой. В третьем варианте (лечебная схема) в лунки планшета вносили вирус Коксаки B5 (m.o.i. 0,01), инкубировали планшет в течение 1 часа при +4°C, затем убирали вирусосодержащую жидкость из лунок, в лунки планшета вносили серийные разведения исследуемых соединений или поддерживающую среду с добавлением 1% ДМСО (контроль вируса). Все планшеты инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при 36°C в течение 24 часов. После этого определяли инфекционный титр вирусного потомства в каждой лунке планшета методом предельных серийных разведений. В качестве положительного контроля активности исследуемых соединений их применяли по лечебно-профилактической схеме, согласно которой серийные разведения соединений присутствовали в

лунках планшета в течение всего времени выполнения эксперимента: за 1 час до внесения вируса, на этапе сорбции вируса на мембране клетки в течение 1 часа при +4°C и в течение 24 часов после окончания сорбции вируса. Эксперимент выполняли в трех повторностях.

2.2.8 Тест на время добавления соединений-лидеров

Для определения продолжительности цикла репродукции вируса Коксаки В5 *in vitro* подготовленную монослойную культуру Vero в девяти 24-луночных планшетах инфицировали вирусом Коксаки В5 (m.o.i 0,1). Планшеты с клетками выдерживали в течение 1 ч при температуре + 4 °С для обеспечения сорбции вируса на мембране клеток. После сорбции не связавшиеся вирусные частицы удаляли путем двукратной промывки монослоя клеток поддерживающей средой. Лунки планшета заполняли поддерживающей средой в объеме 500 мкл (точка 0 часов) и инкубировали планшеты в атмосфере 5 % CO₂ при +36 °С в течение следующих 9 часов. В точках 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 часов из лунок соответствующего планшета отбирали супернатант клеточной культуры. Определяли инфекционный титр вирусного потомства в каждой временной точке методом титрования по конечной точке в клетках Vero. Эксперимент выполняли в трех повторностях.

Для определения стадии цикла репродукции вируса Коксаки В5 – мишени действия соединений-лидеров выполняли тест на время добавления соединений согласно рекомендациям [43]. Клетки Vero рассевали в 24-луночные планшеты и инкубировали в атмосфере 5 % CO₂ при +36 °С в течение 24 ч до формирования конфлюэнтного монослоя. Клетки отмывали от ростовой среды, после чего вносили исследуемые соединения в отдельные лунки планшета в следующие временные точки: -2 – препарат внесен за час до добавления вируса, -1 – одновременно с вирусом, 0 – в момент окончания сорбции вируса на поверхности клетки, а также через 1, 2, 3, 4, 5 и 6 часов после окончания сорбции вируса. В точке (-1) во все лунки вносили вирус Коксаки В5 (m.o.i 0,1). Планшеты с клетками выдерживали в течение 1 ч при температуре + 4 °С для обеспечения сорбции вируса на мембране клеток. В точке 0 вирус удаляли, промывали планшеты чистой

поддерживающей средой и помещали планшет в CO₂-инкубатор при +36 °C. В точке 8 часов после завершения сорбции вируса эксперимент останавливали и определяли инфекционный титр вирусного потомства в каждой лунке методом титрования по конечной точке в клетках Vero. Временные интервалы присутствия исследуемых соединений (часы) в среде, таким образом, составили: (-2)-8, (-1)-8, 0-8, (1)-8, (2)-8, (3)-8, (4)-8, (5)-8, (6)-8. В качестве положительного контроля использовали временной интервал (-2) – 8, в котором исследуемые соединения присутствовали в среде в течение всего времени выполнения эксперимента. Эксперимент выполняли в трех повторностях.

2.2.9 Селекция устойчивых штаммов вируса Коксаки В3

Для изучения развития устойчивости к соединениям-лидерам вирус Коксаки В3 (штамм Nancy) серийно пассировали в клетках Vero в пробирках со скошенным дном в присутствии увеличивающихся концентраций каждого из исследуемых соединений-лидеров. В качестве контроля использовали вирус, который серийно пассировали такое же количество раз в клетках Vero без исследуемого вещества. Клетки инфицировали вирусом и инкубировали в течение 3 сут. при + 36 °C при 5 % CO₂ до появления цитопатического эффекта. Вирусосодержащий супернатант из каждой пробирки разбавляли в 100 раз поддерживающей средой и переносили его на новый монослой Vero с добавлением повышенной концентрации исследуемого соединения или без него. После пассирования было получено три вируса: исходный, контрольный и резистентный. Для оценки выработки резистентности оценивали чувствительность к соединению каждого из трех штаммов вируса (исходный, контрольный и резистентный).

2.2.10 Оценка бляшкообразования

Пермиссивную клеточную культуру Vero выращивали на 6-луночных планшетах в течение 24 ч до формирования 90 % монослоя [26]. В день

эксперимента готовили серийные 10-кратные разведения вируса в поддерживающей среде. Лунки с клеточным монослоем однократно отмывали от культуральной среды поддерживающей средой и равномерно распределяли по 500 мкл каждого разведения вируса (резистентный или контрольный штамм) поверх монослоя клеток. После инкубации планшетов в атмосфере 5 % CO₂ при 36 °С в течение 1 часа убрали несвязавшийся вирус и поверхность монослоя клеток заливали по 3 мл 0,3% раствора агарозы в поддерживающей среде. Планшеты инкубировали в атмосфере 5 % CO₂ при 36 °С в течение 72 ч. После фиксации клеток в лунках планшета 10% раствором формалина нейтрального забуференного в течение 1 часа при комнатной температуре отмывали формалин дистиллированной водой и проводили окраску монослоя клеток в лунках планшета 0,1% раствором кристаллического фиолетового. Оценку эффективности бляшкообразования каждого варианта вируса проводили после высушивания планшетов. Определяли площадь бляшек с использованием цифрового имиджера Cytation 5 и программного обеспечения Gen5. Эксперимент выполняли в трех повторностях.

2.2.11 Картирование мутаций резистентности

Из штаммов вируса экстрагировали вирусную РНК с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (АмплиСенс, Россия) и после обратной транскрипции, выполненной при помощи набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия), кДНК амплифицировали в виде 9 фрагментов, перекрывающих весь геном вируса, с использованием набора Tersus Plus PCR kit (Евроген, Россия) и пар праймеров: C1_S_2 и R1110_1130, F_1045_1064 и C1-A, C2-S и C2-A, C3-S и R_2897_2919, C4-S и C4-A, F_3543_3565 и C4-A, C6-S и R_5385_5366, F_5293_5314 и R_5974_5953, F_6867_6887 и C7-A из Таблицы 2 (адаптированы и дополнены из [84]). Условия амплификации были следующими: денатурация (3 мин при + 95 °С), 40 циклов (+ 95 °С, 30 сек, 60 °С, 30 сек, + 72 °С 1,5 мин), окончательная элонгация при 72 °С в течение 3 мин.

Таблица 4 - Праймеры, используемые для амплификации и секвенирования генома вируса Коксаки В3 (Nancy)

Условное наименование	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
Фрагмент 1	
C1_S_2	GTT GAT CCC ACC CAC AGG
FevI	AGATCAGGYCGATGAGYCACYG
R_1110_1130	ATGTGGCAACGTCTGGTTGG
R_494_513	ACACTGCCCTCTGGCTTGA
Фрагмент 2	
F_1045_1064	GTGGGCTATGGAGTATGGC
C1-A	GTAGGTTGATCCATTGGTGG
Фрагмент 3	
C2-S	TGGTGTATAATGCAGGCATGG
C2-A	CCCTATAGCGGCTGTTATCG
R_1937_1959	GATCTCACAGGTATCTGGTATG
F_1961_1982	ATGAAGGATCTGGAACGCAAG
Фрагмент 4	
C3-S	CACTCCTTTCACTTCGCAGG
C3-A	CCCTGTAGTTCCCCACATAC
C4-S	TGTCAACGCTGGAAGCACG
R_2897_2919	GAATCAACTTTATCTGGTACAG
Фрагмент 5	
C4-S	TGTCAACGCTGGAAGCACG
C4-A	CCTCACCACAATTACTAAGGC
F_3543_3565	GTAGAGGTCCAAGAGAGTGAATAC
C3-S	CACTCCTTTCACTTCGCAGG
Фрагмент 6	
F_3543_3565	GTAGAGGTCCAAGAGAGTGAATAC

Продолжение Таблицы 4

Условное наименование	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
C5-S	GGGTCAAGACTCCATCTTAG
C5-A	GTATCCGTCGAAGTGATCTG
C4-A	CCTCACCACAATТАCTAAGGC
Фрагмент 7	
C6-S	CAGACCCAGATCACTTCGAC
R_5385_5366	ACGGCGAACTCAAAGGCAG
Фрагмент 8	
F_5293_5314	CAAGGTGCTTATACAGGAGTG
C6-A	CACCATTGGTAGGTTTCAGGC
F_5824_5844	GGCAAGGTACTGGGTATCC
R_5974_5953	ACTTGGTGTGTTGATGACTGG
Фрагмент 9	
C7-S	TTGCACTGGGTATCAAGAAGAG
C7-A	AATAATCCGCACCGAATGCG
F_6867_6887	GGACCAATTCAGGATGATCG
R_6888_6868	GCGATCATCCTGAATTGGTC

Полученные образцы очищали с помощью набора для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Cleanup Standard (Евроген, Россия) и секвенировали по методу Сэнгера с использованием секвенирующих праймеров (Таблица 2), анализатора ABI-3500 XL Genetic Analyser (Thermo Fisher Scientific®, UK) и полимера BigDye® Terminator v3.1 Chemistry and POP-7™ (Thermo Fisher Scientific®, UK). Сборку секвенированных фрагментов выполняли с помощью программы Unipro UGENE (версия 45.1, Российская Федерация) [107]. Файлы хроматограмм выравнивали относительно референсной последовательности генома вируса Коксаки В3, штамм Nancy (GenBank: M16572.1). Трансляцию нуклеотидных последовательностей проводили с помощью онлайн ресурса ExPASy

[49; 50]. Сравнение аминокислотных последовательностей выполняли с использованием онлайн ресурса Clustal Omega [39; 40].

Также проводили секвенирование отдельных клонов вирусных штаммов: контрольного и резистентного. Для получения клонов перmissive клеточную культуру Vero выращивали на 6-луночных планшетах в течение 24 ч до формирования 90 % монослоя. В день эксперимента готовили серийные 10-кратные разведения вирусов в поддерживающей среде. Лунки с клеточным монослоем однократно отмывали от культуральной среды поддерживающей средой и равномерно распределяли по 500 мкл каждого разведения вируса (резистентный или контрольный штамм) поверх монослоя клеток. После инкубации планшетов в атмосфере 5 % CO₂ при 36 °C в течение 1 часа убирали несвязавшийся вирус и поверх монослоя клеток заливали по 3 мл 0,3% раствора агарозы в поддерживающей среде. Планшеты инкубировали в атмосфере 5 % CO₂ при 36 °C в течение 72 ч. Проводили отбор индивидуальных клонов из зон бляшек каждого штамма с помощью автоматического дозатора с использованием одноразовых наконечников. Затем получали ПЦР фрагменты, охватывающие интересные участки вирусного генома, в которых ранее были картированы мутации резистентности, и определяли их нуклеотидные последовательности методом секвенирования по Сэнгеру как описано выше.

Для получения консенсусных последовательностей энтеровирусов и риновируса использовали онлайн ресурс EMBOSS Cons [48]. Сравнение последовательностей консенсусов выполняли с использованием онлайн ресурса Clustal Omega [41].

2.2.12 Оценка динамики роста вирусных штаммов

Перmissive клеточную культуру Vero выращивали на 6-луночных планшетах в течение 24 ч до формирования 90 % монослоя. В день эксперимента клеточный монослой однократно отмывали от культуральной среды поддерживающей средой. В лунки планшета вносили исследуемые соединения или

поддерживающую питательную среду с добавлением 1% ДМСО. Через 1 час в отдельные лунки планшета вносили одинаковые дозы исследуемых штаммов вирусов (резистентный или контрольный штамм, m.o.i 0,01). Планшеты инкубировали при +4 °C в течение 1 часа. После этого убирали не связавшийся вирус, промывали монослой клеток двукратно поддерживающей средой и поверх монослоя клеток заливали по 3 мл раствора исследуемых соединений или поддерживающей питательной среды с добавлением 1% ДМСО (временная точка 0 часов). Отбирали по 100 мкл супернатанта из каждой лунки в индивидуальные стерильные пробирки во временные точки 0, 8, 10, 24 часа. Образцы супернатанта замораживали при температуре -20 °C. Определяли инфекционный титр вирусного потомства в каждой временной точке методом титрования по конечной точке. Эксперимент выполняли в трех повторностях. Идентичность штаммов вируса после культивирования в течение 24 часов проверяли посредством секвенирования методом Сэнгера.

2.2.13 Оценка противовирусной активности соединений *in vivo*

Вирус Коксаки В5 для инфицирования животных подготавливали следующим образом. 3 самцам мышей BALB/c (6-8 недель) внутрибрюшинно вводили вирус Коксаки В5, адаптированный к культуре Vero (10^6 ТЦД₅₀ в объеме 0,2 мл). Спустя 3 дня животных умерщвляли методом цервикальной дислокации и изымали поджелудочные железы. Из органов готовили гомогенаты в среде альфа-MEM с добавлением антибиотиков пенициллин/стрептомицин (Gibco, США). Гомогенаты культивировали на культуре Vero до появления выраженного вирус-специфического ЦПД. Культуру Vero подвергали двукратным циклам замораживания-оттаивания, затем определяли титр вируса в материале инфицированной клеточной культуры. Полученным вирусом инфицировали животных в опытах *in vivo*.

В экспериментах по оптимизации модели энтеровирусного панкреатита у мышей линии BALB/c участвовали самки (возраст животных 6-8 недель, по 10

животных в группе) и самцы (возраст животных 6-8 недель и 4-5 недель, по 10 животных в группе). Животным вводили вирус Коксаки В5 (6×10^6 ТЦД₅₀/200 мкл) внутрибрюшинно в течение 3 суток, после чего животных умерщвляли путем цервикальной дислокации, изымали поджелудочную железу, определяли инфекционный титр вируса в гомогенатах поджелудочной железы у каждого животного. Для исследования динамики репродукции вируса Коксаки В5 в поджелудочной железе самцов мышей BALB/c (возраст 4-5 недель, 20 животных) заражали внутрибрюшинно вирусом (6×10^6 ТЦД₅₀/200 мкл). На 3, 4, 5, 6, 7 сутки после инфицирования у животных (по 4 животных на временную точку) извлекали поджелудочную железу для оценки инфекционного титра вируса.

Подбор доз соединений-лидеров для проведения исследования их противовирусной активности *in vivo* осуществляли следующим образом: самцам мышей BALB/c (возраст 4-5 недель, по 9 животных в группе) внутрибрюшинно вводили исследуемые соединения в дозах 50 и 100 мкг/кг, 2 р/сут в течение 5 суток. По истечении 5 суток трех животных подвергали эвтаназии, выполняли макроскопическое обследование внутренних органов. За оставшимися 6 животными наблюдали до 14 дня после начала введения соединений. Учитывали гибель животных в всех группах.

В исследованиях протективной активности соединений *in vivo* использовали самцов мышей BALB/c (4-5 недель), полученных из Федерального государственного унитарного предприятия «Питомник лабораторных животных «Рапполово» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Вирус Коксаки В5 вводили животным внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл/мышь в дозе 6×10^6 ТЦД₅₀. Животным опытных групп вводили соединения внутрибрюшинно в объеме 100 мкл на инъекцию по лечебно-профилактической схеме: 2 р/сут, начиная с точки за 12 часов до инфицирования животных и в течение 5 суток после инфицирования. В качестве плацебо использовали физиологический раствор, который вводили животным по лечебно-профилактической схеме, описанной выше.

На 5 сутки после инфицирования животных из каждой группы умерщвляли при помощи цервикальной дислокации. Поджелудочные железы изымали и делили на две части: для определения инфекционной активности вируса в ткани при помощи титрования методом предельных серийных разведений на клетках Vero и для оценки морфологической структуры лёгких путем гистологического исследования. Противовирусную активность исследуемых соединений оценивали по снижению вирусной нагрузки в поджелудочной железе у животных в группах введения соединений по сравнению с группой животных, получавших плацебо.

Тела животных утилизировали установленным в Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека порядком. План проведения экспериментальных работ с участием лабораторных животных был согласован и одобрен локальной комиссией по биоэтике Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Протокол заседания от 29.10.2020 г. № 68).

2.2.14 Гистологическая оценка степени проявления панкреатита

Для гистологического исследования поджелудочные железы изолировали и фиксировали 10% раствором формалина нейтрального забуференного. После фиксации органы отмывали от формалина в течение ночи в проточной воде, обезвоживали в спиртах нарастающей концентрации и заливали в парафин. Из полученных блоков готовили срезы толщиной 4 мкм, регидратировали в ксилоле и спиртах убывающей концентрации, окрашивали гематоксилин-эозином и заключали в бальзам. Изображения микропрепаратов ткани поджелудочной железы получали с использованием микроскопа Leica при увеличении $\times 40$. Гистологическую оценку степени проявления панкреатита выполняли по

полуколичественной шкале от 1 до 4 баллов: 1 балл: поражено <10 % ткани; 2 балла: поражено 10–25 % ткани; 3 балла: поражено 25–50 % ткани и 4 балла: поражено >50 % ткани [124].

2.2.15 Электронная микроскопия

Клетки Vero сеяли в 6-луночные планшеты. После образования клетками монослоя в лунках планшета заменяли среду на поддерживающую с добавлением 1% ДМСО (контроль вируса) или с добавлением исследуемого соединения. Планшеты инкубировали в атмосфере 5 % CO₂ при 36 °C в течение 1 часа, затем клетки инфицировали вирусом Коксаки В3 (штамм Nancy) (m.o.i. 1). После инкубации (1 ч при + 4 °C) не связавшийся вирус удаляли, в соответствующие лунки планшета вносили поддерживающую среду с добавлением 1% ДМСО (контроль вируса) или с добавлением исследуемого соединения. Планшет инкубировали в атмосфере 5 % CO₂ при 36 °C в течение 6 часов, после этого со дна каждой лунки соскабливали клетки, клеточную суспензию переносили в индивидуальные пробирки объемом 5 мл и центрифугировали (10 минут, 1500 об/мин). После удаления супернатанта фиксировали клеточный материал 1% раствором глутарового альдегида (1 мл). Клетки обезвоживали ацетоном в возрастающей концентрации и заливали в смесь эпон/аралдит. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме Ultracut (Reichert, Austria), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали на электронном микроскопе JEM-100S (JEOL, Japan) при инструментальном увеличении 5000 - 8000.

2.2.16 Методы статистической обработки результатов

Расчет значений CC₅₀ и IC₅₀ проводили при помощи пакета программ GraphPad Prism 8.0. За рабочую модель для анализа принимали 4-параметрическое уравнение логистической кривой (пункты меню «Нелинейная регрессия» –

«логарифм ингибитора – ответ»). Данные EC_{50} , CC_{50} и IC_{50} представляли как среднее $\pm$ стандартное отклонение из трех независимых экспериментов. На основании полученных данных для каждого соединения рассчитывали индекс селективности (SI) – отношение CC_{50} к EC_{50} или IC_{50} . Для оценки различий между двумя независимыми выборками использовали непараметрический U-тест Манна-Уитни. При проверке гипотез номинальный уровень статистической значимости составлял $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Оценка противовирусной активности исследованных соединений в отношении вирусов рода *Enterovirus in vitro*

3.1.1 Исследование противовирусной активности *in vitro* новых аналогов плеконарила

Эксперименты проводили по скрининговой схеме на клеточной линии Vero с использованием вируса Коксаки В3 (штамм Nancy). Данный штамм был выбран для первичной селекции активных соединений в связи с его резистентностью к плеконарилу [123]. Вирус культивировали в течение 72 ч в присутствии исследуемых соединений, после чего оценивали цитотоксичность и цитопротективные свойства исследуемых веществ при помощи МТТ-теста. Всего было исследовано 34 новых аналога плеконарила, которые отличались от исходной молекулы химическими модификациями изоксазольной, центральной фенильной группы, линкера между ними, а также оксадиазольной группы (Рисунок 18).

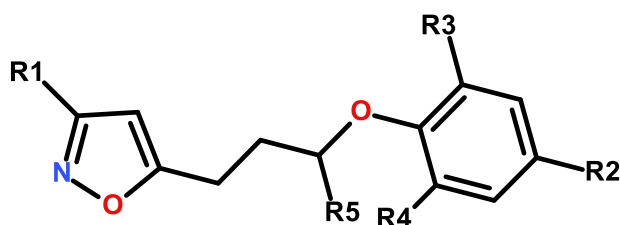
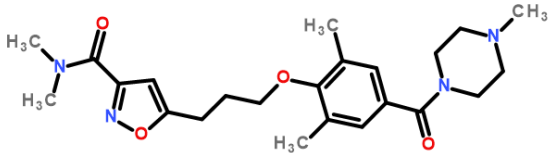
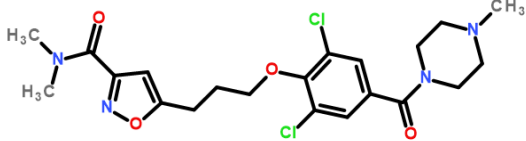
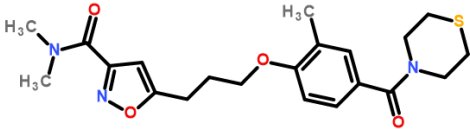
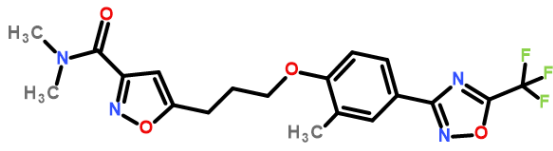
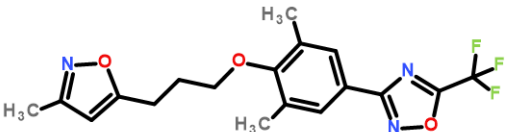


Рисунок 18 – Общая структурная формула исследованных новых аналогов плеконарила

Структурные формулы и результаты анализа цитопротекции всех исследованных соединений данной группы приведены в Приложении А (Таблица А1). Большинство исследованных соединений не обладали цитопротективной активностью при заражении клеток Vero вирусом Коксаки В3 (штамм Nancy). Замена оксадиазольной группы (R2) на другие функциональные группы (пиперидиновую, пиперазиновую, фенильную, морфолиновую, тиоморфолиновую), как и модификации линкера (R5) не обеспечивали

цитопротективную активность соединений независимо от природы бокового заместителя (этилацетатная или диметилацетамидная группа) в изоксазольном кольце (R1). Ниже представлены результаты анализа цитопroteкции аналогов плеконарила, для которых была показана активность *in vitro* (Таблица 5).

Таблица 5 - Показатели цитопротективной и цитотоксической активности некоторых исследованных аналогов плеконарила в условиях инфицирования вирусом Коксаки В3 (Nancy) культуры клеток Vero

Соединение	Структурная формула	CC ₅₀ , мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI
11		>204,1	67,3±2,1	>3
12		>213,2	70,3±4,3	>3
18		>719,4	86,3±7,2	>8
32		59,1±4,7	0,7±0,2	85
Плеконарил		60,4±7,9	>28,9	н/а

Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов, н/а – не активно

В качестве соединения-лидера было выбрано соединение 32 (3-(3-метил-4-(3-(3-N,N-диметилкарбамоилизоксазол-5-ил)пропокси)фенил)-5-трифторметил-1,2,4-оксадиазол), имеющее диметилацетамидную группу в изоксазольном кольце и модифицированную центральную фенильную группу при сохранении немодифицированного линкера и оксадиазольной группы.

Затем для оценки вирус-ингибирующей активности соединения-лидера выполняли тест на снижение продукции потомства вируса Коксаки В3 (штамм Nancy). В качестве препарата сравнения использовали плеконарил. Результаты представлены в Таблице 6.

Таблица 6 - Сравнительная вирус-ингибирующая активность соединения 32 и плеконарила в отношении вируса Коксаки В3 (штамм Nancy)

Соединение	CC ₅₀ , мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
32	>235,61	0,02±0,01	>10000
Плеконарил	>262,19	>78,65	>3

Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов

Из приведенных данных видно, что вирус-ингибирующая активность соединения 32 значительно превышает активность плеконарила: значение IC₅₀ для 32 более чем в 3000 раз ниже, чем IC₅₀ плеконарила.

Исследование спектра вирус-ингибирующей активности соединения 32 проводили с использованием теста на снижение продукции вирусного потомства на пермиссивных культурах клеток Vero, RD и MRC5 и изолятах энтеровирусов, полученных в рамках реализации программы надзора за полиомиелитом и ОВП (CVA16, CVB5, CVB4, ECHO3, ECHO30 и CVA21), и штамме риновируса 14 типа. Указанные вирусы были выбраны, поскольку они являются представителями разных видов в пределах рода *Enterovirus*. Таким образом, можно оценить активность соединения в отношении различных представителей рода *Enterovirus*. В качестве препарата сравнения использовали плеконарил. Сводные данные,

отражающие спектр противовирусной активности соединения 32 представлены в Таблице 7.

Таблица 7 - Спектр противовирусной активности соединения 32 в отношении ряда вирусов рода *Enterovirus*

Соединение	CC ₅₀ , мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
вирус Коксаки A16 (клеточная линия RD)			
32	>235,61	0,02±0,01	>10243
Плеконарил	>262,19	0,25±0,02	>1052
вирус Коксаки B4 (клеточная линия Vero)			
32	>235,61	0,12±0,05	>1963
Плеконарил	>262,19	0,02±0,01	>13100
вирус Коксаки B5 (клеточная линия Vero)			
32	>235,61	0,007±0,002	>33658
Плеконарил	>262,19	0,002±0,001	>262190
Вирус ECHO30 (клеточная линия RD)			
32	>235,61	0,002±0,001	>117805
Плеконарил	>262,19	0,006±0,002	>43698
вирус ECHO3 (клеточная линия RD)			
32	>235,61	0,02±0,002	>11780
Плеконарил	>262,19	0,20±0,02	>1310
Вирус Коксаки A21 (клеточная линия RD)			
32	>235,61	0,03±0,01	>7853
Плеконарил	>262,19	0,02±0,01	>13110
Риновирус 14 типа (клеточная линия MRC5)			
32	>235,61	0,51±0,02	>460
Плеконарил	>262,19	0,71±0,21	>369

Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов

По спектру активности в отношении плеконарил-чувствительных изолятов соединение 32 не отличалось от плеконарила: оно оказывало выраженный ингибирующий эффект на вирусы Коксаки, ЕСНО и риновирус 14 типа. Показатель IC_{50} при этом варьировал. По значению IC_{50} соединение 32 превосходило плеконарил в экспериментах с использованием вируса Коксаки A16, ЕСНО3, при этом его активность в отношении остальных вирусов была сравнима с активностью плеконарила или была ниже. В совокупности результаты выполненных тестов позволяют сделать вывод о перспективности соединения 32 как ингибитора широкого спектра вирусов рода *Enterovirus*.

3.1.2 Исследование противовирусной активности *in vitro* новых соединений группы бензолсульфамидов

Всего было исследовано 17 новых соединений группы бензолсульфамидов производных 4-(4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)фенилсульфониламино)бензойной кислоты (соединение-прототип), которые отличались от исходной молекулы химическими модификациями фталимидного фрагмента (R1) и группы бензойной кислоты (R2) (Рисунок 19).

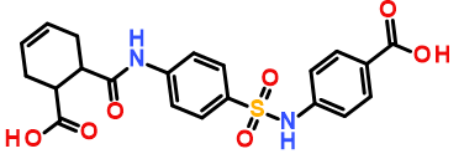
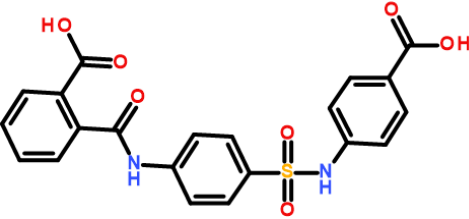
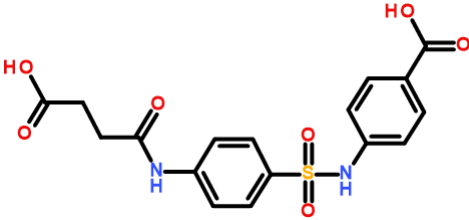
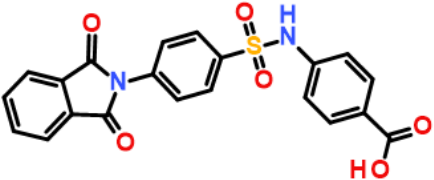


Рисунок 19 - Общая структурная формула исследованных новых производных 4-(4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)фенилсульфониламино)бензойной кислоты

Структурные формулы всех исследованных соединений этой группы и рассчитанные показатели цитопротективной активности в условиях инфицирования вирусом Коксаки В3 представлены в Таблице А2 в Приложении А. Согласно полученным результатам, примененные модификации фталимидной группы даже при сохранении немодифицированной группы бензойной кислоты оказывали негативное влияние на цитопротективную активность исследованных

соединений [125]. Ниже представлены результаты анализа цитопротекции соединений, для которых была показана активность *in vitro* (Таблица 8).

Таблица 8 - Показатели цитопротективной и цитотоксической активности некоторых исследованных аналогов плеконарила в условиях инфицирования вирусом Коксаки В3 (Nancy) культуры клеток Vero

Соединение	Структурная формула	CC ₅₀ , мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI
38		652,5 ± 53,9	116,9 ± 26,9	6
41		>227,3	2,1 ± 0,3	>111
42		>255,1	2,2 ± 0,2	>117
(4-[[4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)фенил]сульфониламино]бензойная кислота)		> 236,9	2,1 ± 0,3	>116

Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов

Два соединения проявляли активность, сравнимую с соединением-прототипом. У этих соединений (соединение 41, 2-((4-N-(4-карбоксифенил)сульфамойл) фенил)карбамоил)бензойная кислота, соединение 42, 4-((4-(3-карбоксипропаноиламино) фенил)сульфонамидо)бензойная кислота) присутствовали две симметричные карбоксильные группы, что могло обеспечить выраженную активность ввиду важности карбоксильной группы для связывания с мишенью на поверхности капсида энтеровирусов. Они были выбраны в качестве соединений-лидеров данной группы.

В тесте на снижение продукции вирусного потомства была исследована вирус-ингибирующая активность *in vitro* соединений 41 и 42 в отношении вирусов CVA16, CVB4, CVB5, ECHO3, ECHO30 и CVA21 (изоляты энтеровирусов, полученные в рамках реализации программы надзора за полиомиелитом и ОВП), вируса CVB3 (штамм Nancy) и риновируса 14 типа. Результаты представлены в Таблице 9.

Таблица 9 - Спектр противовирусной активности соединений лидеров из группы бензолсульфамидов в отношении ряда вирусов рода *Enterovirus*

Соединение	CC ₅₀ , мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
Вирус Коксаки A16 (клеточная линия RD)			
41	>568,2	213,6 ± 19,2	>2
42	>637,5	79,1 ± 10,2	>8
Соединение-прототип	>592,4	>236,9	>2
Вирус Коксаки B3 (клеточная линия Vero)			
41	>568,2	4,3 ± 1,8	>132
42	>637,5	3,8 ± 1,5	>167
Соединение-прототип	>592,4	5,5 ± 0,9	>107
Вирус Коксаки B4 (клеточная линия Vero)			
41	>568,2	20,7 ± 5,8	>27
42	>637,5	77,3 ± 8,3	>8
Соединение-прототип	>592,4	66,6 ± 9,2	>9

Продолжение Таблицы 9

Соединение	CC ₅₀ , мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
Вирус Коксаки В5 (клеточная линия Vero)			
41	>568,2	15,9 ± 2,3	>35
42	>637,5	12,8 ± 1,2	>50
Соединение-прототип	>592,4	18,9 ± 4,2	>31
Вирус ЕСНО30 (клеточная линия RD)			
41	>568,2	> 227,3	>2
42	>637,5	153,8 ± 12,5	>4
Соединение-прототип	>592,4	49,8 ± 10,2	>12
Вирус ЕСНО3 (клеточная линия RD)			
41	>568,2	79,5 ± 14,1	>7
42	>637,5	76,5 ± 15,5	>8
Соединение-прототип	>592,4	>236,9	>2
Вирус Коксаки А21 (клеточная линия RD)			
41	>568,2	>227,3	>2
42	>637,5	>255,1	>2
Соединение-прототип	>592,4	>236,9	>2
Риновирius 14 типа (клеточная линия MRC5)			
41	>568,2	>227,3	>2
42	>637,5	>255,1	>2
Соединение-прототип	>592,4	>236,9	>2

Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов, соединение-прототип 4-(4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)фенилсульфониламино)бензойная кислота

Спектр активности соединений 42 и 41 соответствовал результатам, полученным для вещества сравнения 4-(4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)фенилсульфониламино)бензойной кислоты. Наиболее выраженное вирус-ингибирующее действие соединений 41 и 42 было отмечено в отношении вирусов Коксаки В3, В4 и В5.

3.1.3 Исследование противовирусной активности *in vitro* вердазилов и лейковердазилов

Всего было исследовано 13 вердазилов и 34 лейковердазила. Вся совокупность из исследованных соединений была разделена на 14 групп (6 групп вердазилов и 8 групп лейковердазилов) в зависимости от природы заместителя в тетразиновом и бензольных кольцах (Рисунок 20, 21).

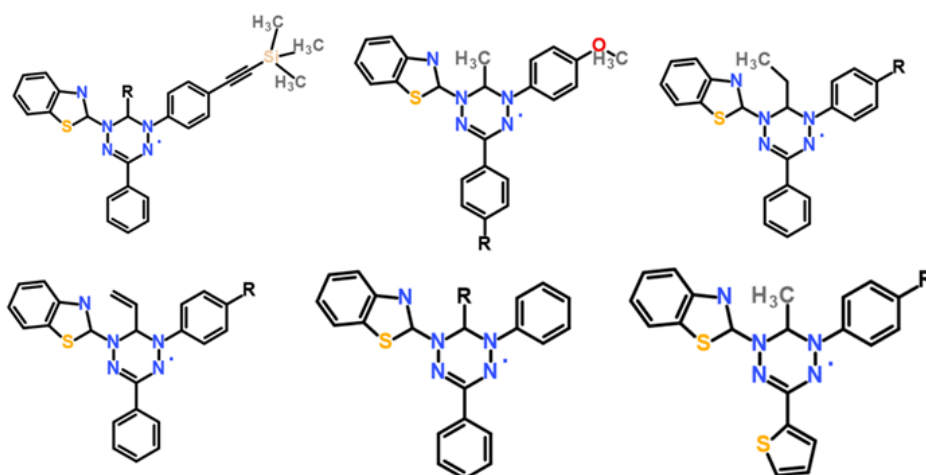


Рисунок 20 - Классификация исследованных вердазилов

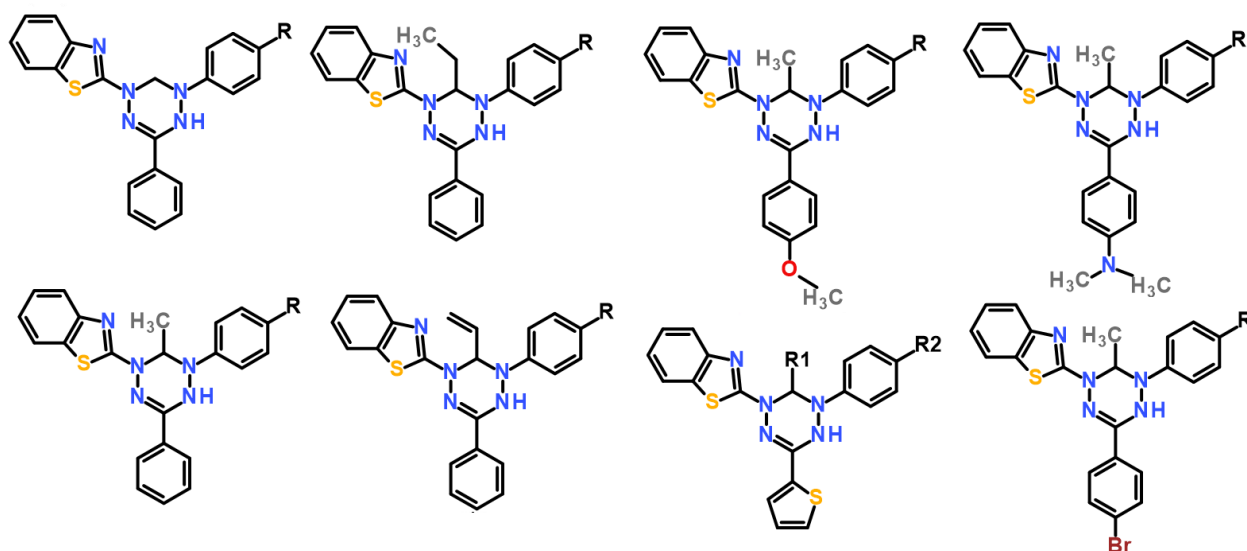
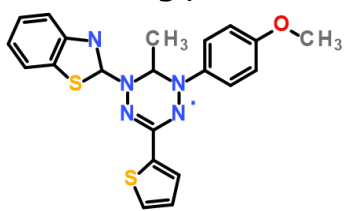
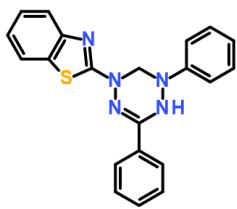
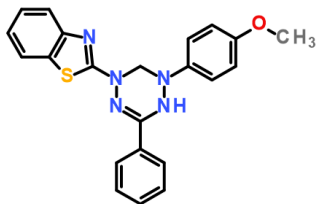


Рисунок 21 - Классификация исследованных лейковердазилов

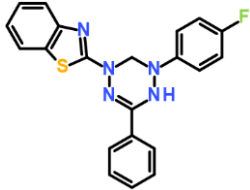
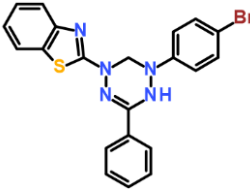
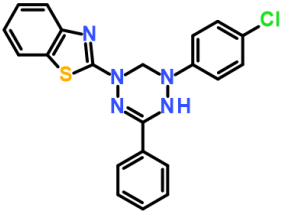
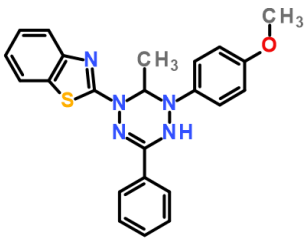
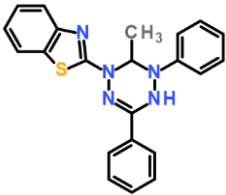
Результаты расчетов значений CC_{50} , EC_{50} , индекса селективности (SI) всех исследованных соединений представлены в Таблице А3 и Таблицы А4 в

Приложении А. Для подтверждения результатов теста на цитопротекцию дополнительно проводили исследование вирус-ингибирующей активности всех соединений в отношении вируса Коксаки В3 (штамм Nancy) (Таблица А3 и Таблица А4, Приложение А). В качестве препарата сравнения использовали гуанидин гидрохлорид, для которого описаны вирус-ингибирующие свойства в отношении энтеровирусов. Данный препарат ингибирует этап репликации вирусной РНК [47]. Ниже представлены результаты соединений этой группы, для которых была показана активность *in vitro* (Таблица 10).

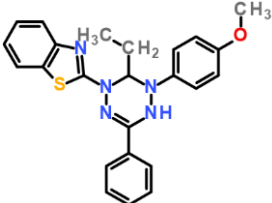
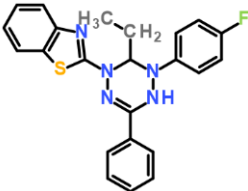
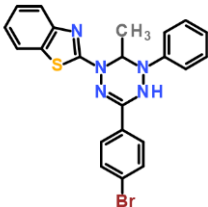
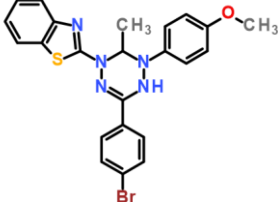
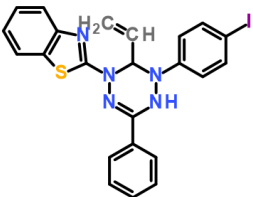
Таблица 10 - Показатели цитопротективной, цитотоксической и вирус-ингибирующей активности некоторых вердазилов и лейковердазилов в условиях инфицирования вирусом Коксаки В3 (Nancy) культуры клеток Vero

Номер и структурная формула соединения	Тест на цитопротекцию			Тест на снижение продукции вирусного потомства		
	CC ₅₀ , 72 часа, мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI	CC ₅₀ , 24 часа, мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
54 	246,3 ± 24,6	>81,2	n/a	> 615	123,2 ± 11,1	>5
65 	94,3 ± 8,1	8,8 ± 1,1	11	619,9 ± 52,7	1,8 ± 0,3	>230
66 	150,7 ± 20,1	< 9	>16	>1347	5,4 ± 0,8	>205

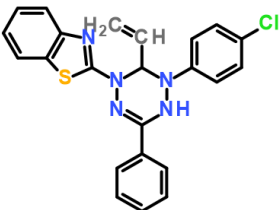
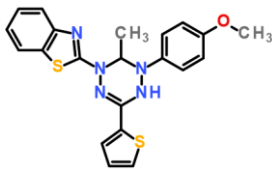
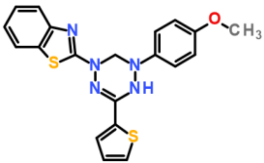
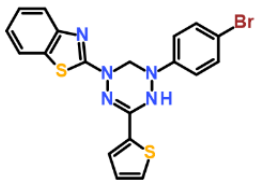
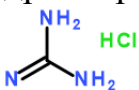
Продолжение Таблицы 10

Номер и структурная формула соединения	Тест на цитопротекцию			Тест на снижение продукции вирусного потомства		
	CC ₅₀ , 72 часа, мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI	CC ₅₀ , 24 часа, мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
67 	12,8 ± 2,1	10,1 ± 1,7	н/а	27,4 ± 6,2	3,1 ± 0,2	13
68 	8,7 ± 2,1	>6,7	н/а	886,4 ± 90,4	6,2 ± 1,9	142
69 	8,2 ± 2,1	>7,4	н/а	320,9 ± 28,2	7,4 ± 2,2	43
72 	12,9 ± 2,5	>9,61	н/а	2048,2 ± 198,5	24,1 ± 3,2	85
76 	10,3 ± 2,5	>9,6	н/а	>324,7	6,5 ± 0,8	>50

Продолжение Таблицы 10

Номер и структурная формула соединения	Тест на цитопротекцию			Тест на снижение продукции вирусного потомства		
	CC ₅₀ , 72 часа, мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI	CC ₅₀ , 24 часа, мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
80 	>751,8	>250,6	н/а	2331,1 ± 25,3	60,1 ± 7,2	>38
83 	>719,4	>239,8	н/а	359,7 ± 41,7	71,9 ± 6,4	5
84 	17,2 ± 4,3	>7,9	н/а	>539,9	17,5 ± 5,8	>31
85 	>608,5	>202,8	н/а	>507,0	26,7 ± 5,8	>19
86 	22,9 ± 5,7	>11	н/а	1529,5 ± 17,2	51,6 ± 6,4	29

Продолжение Таблицы 10

Номер и структурная формула соединения	Тест на цитопротекцию			Тест на снижение продукции вирусного потомства		
	CC ₅₀ , 72 часа, мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI	CC ₅₀ , 24 часа, мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
89 	>696,1	>232,0	н/а	>290,7	27,9 ± 3,3	>10
90 	>580,2	>193,4	н/а	>241,7	29,6 ± 5,4	>8
93 	>245,7	24,57	>10	>614,3	12,28	>50
95 	48,4 ± 3,7	>24,22	н/а	>550,6	15,41 ± 2,5	>35
Гуанидин гидрохлорид 	>10471,2 0	7732,9 ± 104,7	>14	> 5235,6	495,3 ± 39,8	>10

Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов, н/а – соединение неактивно

Соединения 65, 66 и 93 из группы лейковердазилов обладали цитопротективной активностью, намного превосходящей активность препарата сравнения, среди вердазилов ни одно из исследованных соединений не оказывало такого действия. Согласно результатам теста на снижение продукции вирусного потомства, наибольшим вирус-ингибирующим потенциалом в отношении вируса Коксаки В3 также обладали соединения группы лейковердазилов: для 14 из 34 исследованных соединений (41%) значение индекса селективности превышало 10. В группе же вердазилов не было активных соединений. Следует отметить, что в группе лейковердазилов наиболее активными были соединения, не содержащие заместителей в положении 6 тетразинового кольца (соединения 65, 66, 68, 69), внесение боковых заместителей в положение 6 тетразинового кольца в большинстве случаев приводило к снижению противовирусной активности [4; 20; 142].

По совокупности результатов скринингового теста, теста на снижение продукции потомства вируса Коксаки В3 и с учетом параметров цитотоксичности было выбрано соединение-лидер, относящийся к группе лейковердазилов: 2-(3,5-дифенил-5,6-дигидро-4Н-[1,2,4,5]тетразин-1-ил)-бензотиазол (соединение 65). Исследование спектра активности соединения-лидера 65 проводили с помощью теста на снижение продукции вирусного потомства. Использовали изоляты энтеровирусов, полученные в рамках реализации программы надзора за ОВП и неполиомиелитными ЭВ (CVA16, CVB4, CVB5, ECHO3, ECHO30 и CVA21), и штамм риновируса 14 типа [142]. Гуанидин гидрохлорид использовали в качестве препарата сравнения (Таблица 11).

Таблица 11 - Спектр вирус-ингибирующей активности соединения 65 в отношении ряда вирусов рода *Enterovirus*

Соединение	CC ₅₀ , мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
вирус Коксаки А16 (клеточная линия RD)			
65	673,3±60,1	0,8±0,2	841
Гуанидин гидрохлорид	> 10471,2	336,8 ± 28,3	>31

Продолжение Таблицы 11

Соединение	CC ₅₀ , мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
вирус Коксаки В4 (клеточная линия Vero)			
65	619,9±52,7	1,6±0,5	386
Гуанидин гидрохлорид	> 5235,6	875,4± 1,5	>4
вирус Коксаки В5 (клеточная линия Vero)			
65	619,9±52,7	1,5±0,3	413
Гуанидин гидрохлорид	> 5235,6	473,7 ± 33,4	>10
Вирус ECHO30 (клеточная линия RD)			
65	673,3±60,1	1,6±0,4	420
Гуанидин гидрохлорид	> 10471,2	125,6 ± 18,2	>83
вирус ECHO3 (клеточная линия RD)			
65	673,3±60,1	0,9±0,3	747
Гуанидин гидрохлорид	> 10471,2	162,6± 64,4	>19
вирус Коксаки A21 (клеточная линия RD)			
65	673,3±60,1	67±12,2	10
Гуанидин гидрохлорид	> 10471,2	260,2±31,5	>40
Риновиринус 14 типа (клеточная линия MRC5)			
65	>673,1	>80,7	>8
Гуанидин гидрохлорид	> 5235,6	> 3141,4	>1

Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов

Как следует из представленных данных, соединение 65 обладало наиболее выраженным вирус-ингибирующим эффектом в отношении выбранных энтеровирусов видов *Enterovirus alphacoxsackie* (вирус Коксаки A16), *Enterovirus betacoxsackie* (вирус Коксаки В4, В5, ECHO3, ECHO30), при этом его активность превосходила активность гуанидина гидрохлорида. Соединение 65 обладало умеренной активностью также в отношении вируса Коксаки A21 (вид *Enterovirus coxsackiepol*). Как и гуанидин гидрохлорид, соединение 65 не ингибировало

репродукцию риновируса 14 типа. Таким образом, лейковердазилы являются перспективными ингибиторами энтеровирусов.

Для иллюстрации вирус-ингибирующей активности соединения 65 методом просвечивающей электронной микроскопии было проведено сравнительное исследование ультраструктуры интактных клеток Vero, клеток Vero, инфицированных вирусом Коксаки В3 в присутствии соединения 65 (100 мкМ) и без него (контроль вируса) (Рисунок 22, 23, 24). Клетки фиксировали через 6 часов после инфицирования. Данная временная точка была выбрана, поскольку по данным литературы к этому времени в инфицированной клетке обнаруживаются вирус-специфические репликативные органеллы, свидетельствующих об активном процессе репродукции вируса в клетке [79; 86].

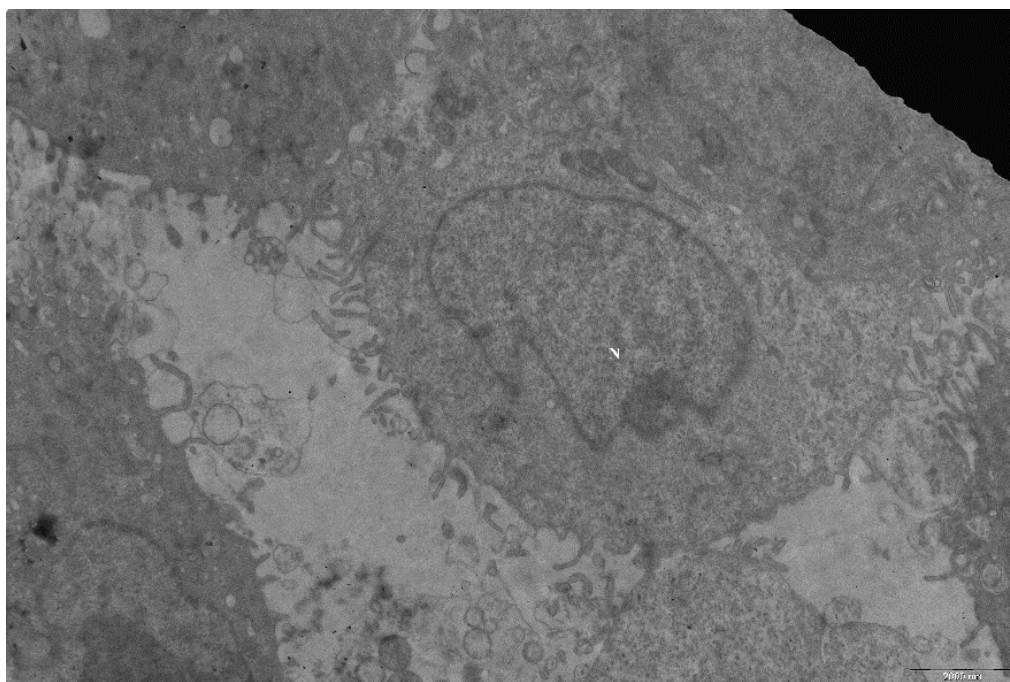


Рисунок 22 – Ультраструктура интактных клеток Vero. N – ядро. Масштаб шкалы 2000 нм.

Интактные клетки Vero имели овальную форму и содержали крупное центрально расположенное ядро. В цитоплазме находились многочисленные митохондрии. Ядерный хроматин в нуклеоплазме в виде конденсатов располагался по всему объему ядра, в центре которого обнаруживались крупные ядрышки.

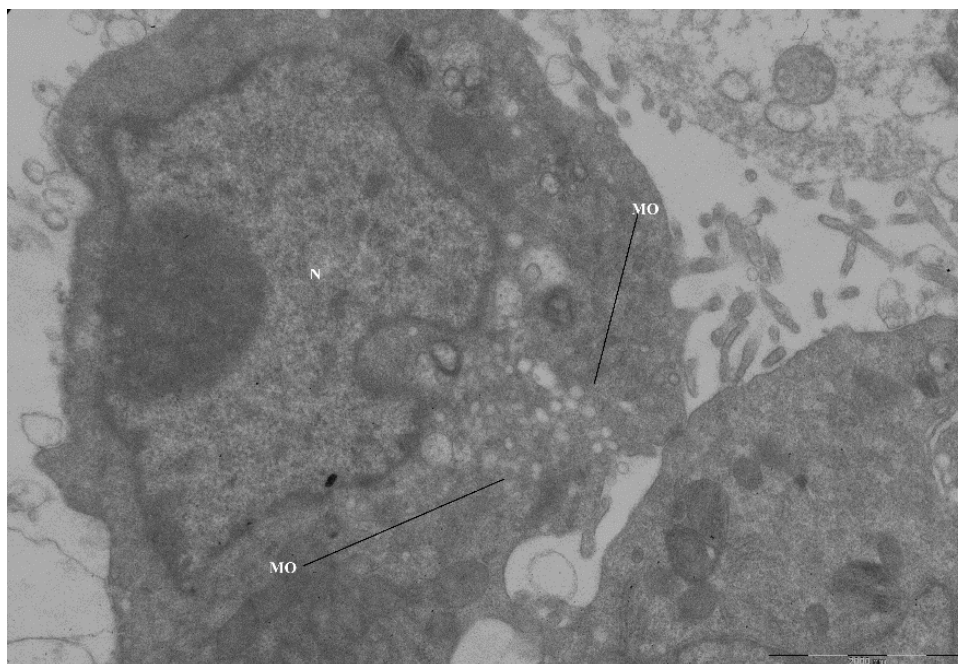


Рисунок 23 – Ультраструктура клеток Vero, инфицированных вирусом Коксаки В3. N – ядро, МО – мембранные органеллы. Масштаб шкалы 2000 нм.

В перинуклеарной цитоплазме клеток, инфицированных вирусом Коксаки В3, отмечались кластеры электрон-прозрачных мембранных органелл, что соответствует описанным в литературе морфологическим изменениям ультраструктуры клеток при инфицировании энтеровирусами [79; 86].

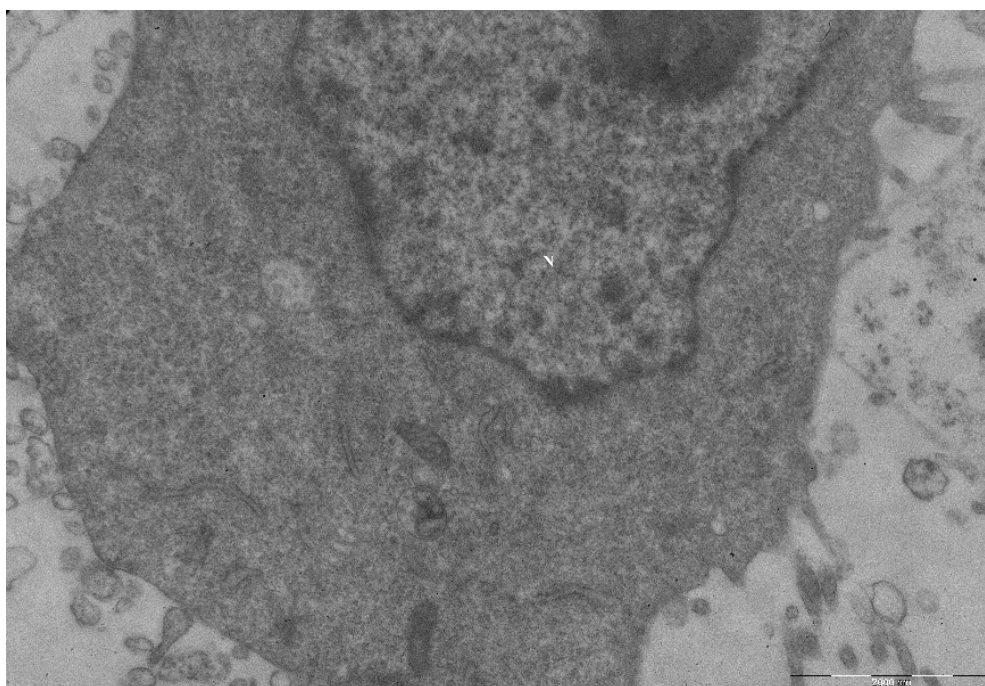


Рисунок 24 - Ультраструктура клеток Vero, инфицированных вирусом Коксаки В3 в присутствии соединения 65. Обозначения: N – ядро. Масштаб шкалы 2000 нм.

В клетках Vero, инфицированных вирусом Коксаки В3 в присутствии в среде соединения 65, отсутствовали морфологические признаки репродукции вируса в виде мембранных органелл.

3.2 Изучение механизмов действия соединений-лидеров

3.2.1 Предварительные эксперименты

Перед проведением тестов по изучению механизма действия соединений-лидеров (теста на термостабильность вирусного капсида и теста на время добавления исследуемых соединений) выполняли ряд предварительных экспериментов по подбору температур и временных точек. Определяли диапазон температур, при котором происходит инактивации вируса Коксаки В5 (Рисунок 25).

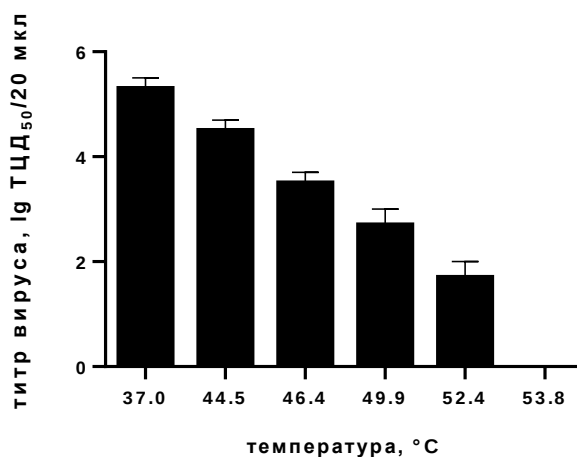


Рисунок 25 - Инактивация вируса Коксаки В5 при нагревании. Значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха для трех независимых экспериментов.

При нагревании вируса Коксаки В5 в диапазоне температур 37-53,8 °C происходит постепенное снижение инфекционной активности вируса. Полная инактивация вируса в этом эксперименте происходила при температуре 53,8°C.

Определяли продолжительность жизненного цикла вируса Коксаки В5 в культуре клеток Vero (Рисунок 26).

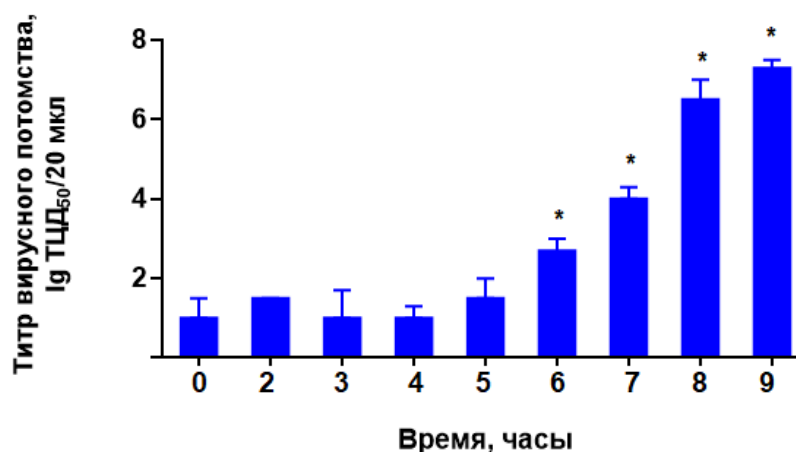


Рисунок 26 - Динамика репродукции вируса Коксаки В5 в культуре Vero. Значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха для трех независимых экспериментов. Звездочкой отмечены статистически значимые различия в титрах вирусного потомства в разных временных точках по сравнению с точкой 0 часов, $p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни

Из полученных данных следует, что детектируемый с помощью инвертируемого микроскопа выход потомства вируса Коксаки В5 в супернатант культуры Vero начинается не ранее 6 часов после окончания сорбции вируса на мембране клеток (точка 0 часов). В интервале 7-9 часов после окончания сорбции титр вирусного потомства постепенно увеличивается по мере высвобождения новых вирионов в супернатант культуры. С учетом полученных результатов для выполнения теста на время добавления исследуемых соединений была выбрана точка 8 часов в качестве точки окончания эксперимента.

3.2.2 Изучение механизма действия нового аналога плеконарила

Принадлежность соединения 32 к группе капсид-связывающих агентов проверяли с помощью теста на термостабильность капсида вируса Коксаки В5. Вирус Коксаки В5 был выбран в качестве модельного объекта для проведения указанных тестов, поскольку в качестве препарата сравнения использовали плеконарил, который активен в отношении этого типа вируса. Как было описано выше (п.1.4), капсид-связывающие агенты (плеконарил, производные бензолсульфамидов и др.) напрямую взаимодействуют с капсидом энтеровирусов

и стабилизируют его структуру, тем самым предотвращая диссоциацию капсида и проникновение РНК вируса в клетку-хозяина. Такое взаимодействие повышает устойчивость вирусного капсида к кратковременному повышению температуры, а нагретый вирус сохраняет способность к инфицированию перmissive клеточной линии [22]. Результаты исследования термической инактивации вируса Коксаки В5 в присутствии соединения 32 представлены на Рисунке 27.

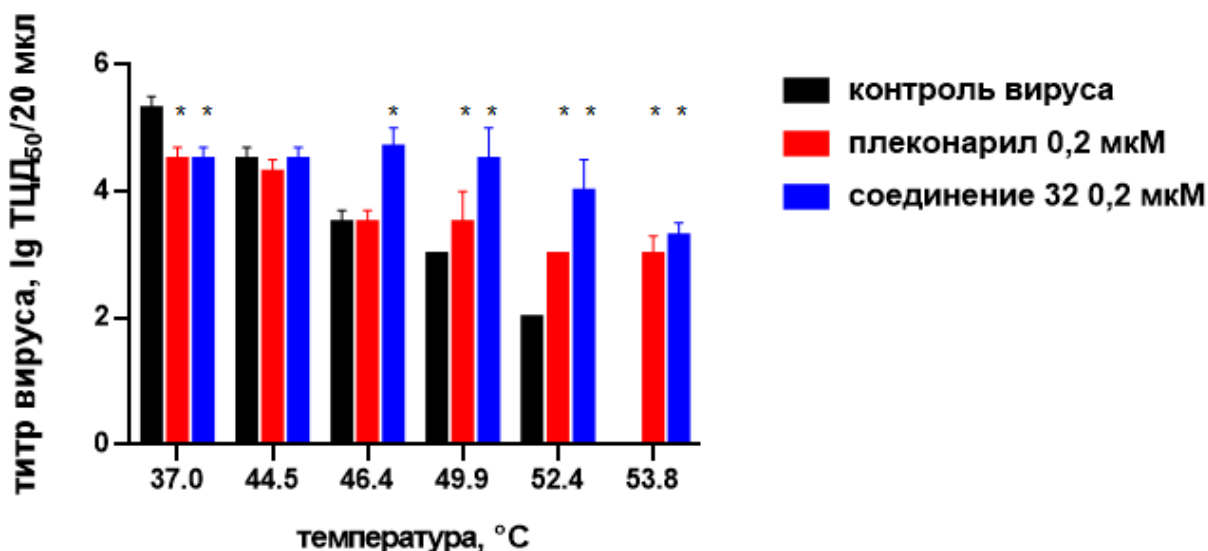


Рисунок 27 - Исследования термической инактивации вируса Коксаки В5 в присутствии соединения 32. Значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха для трех независимых экспериментов. Звездочкой отмечены статистически значимые различия в титрах вируса для каждого экспериментального варианта (плеконарил, соединение 32) по сравнению с контролем вируса, $p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни

В группе контроля вируса отсутствовали инфекционные вирусные частицы при нагревании до 53,8°C. Как и ожидалось, при добавлении соединения 32 (0,2 мкМ), как и при добавлении плеконарила (0,2 мкМ) вирус Коксаки В5 сохранял свою инфекционность при повышении температуры образцов до 53,8°C. Таким образом, был сделан вывод, что соединение 32 принадлежит к группе капсид-связывающих ингибиторов энтеровирусов.

Затем была поставлена задача очертить круг потенциальных мишеней действия соединения 32 посредством определения стадий жизненного цикла вируса, на которых для вещества отмечается наиболее выраженная вирус-

ингибирующая активность. Как описано выше, жизненный цикл вируса Коксаки состоит из нескольких последовательных этапов, при реализации каждого из которых ключевую роль играют определенные вирусные компоненты. Препараты, направленные на определенную вирусную мишень, могут проявлять свою активность на конкретном этапе жизненного цикла вируса, ингибируя при этом весь цикл репродукции. Соответственно, определение стадий жизненного цикла вируса Коксаки, подверженного воздействию исследуемых соединений, позволяет предположить, на какую мишень действует препарат.

Для реализации этой задачи был выполнен тест на время добавления соединения 32. Вирус Коксаки В5 культивировали в клетках линии Vero с добавлением соединения 32 или плеконарила (препарат сравнения) в определенные временные точки относительно точки 0 часов, которая обозначает время окончания сорбции вируса на поверхности клеток. Спустя 8 часов инфекционный титр вирусного потомства определяли методом титрования по конечной точке. Титр вирусного потомства в зависимости от времени внесения исследуемых соединений в среду инфицированных клеток представлен на Рисунке 28.

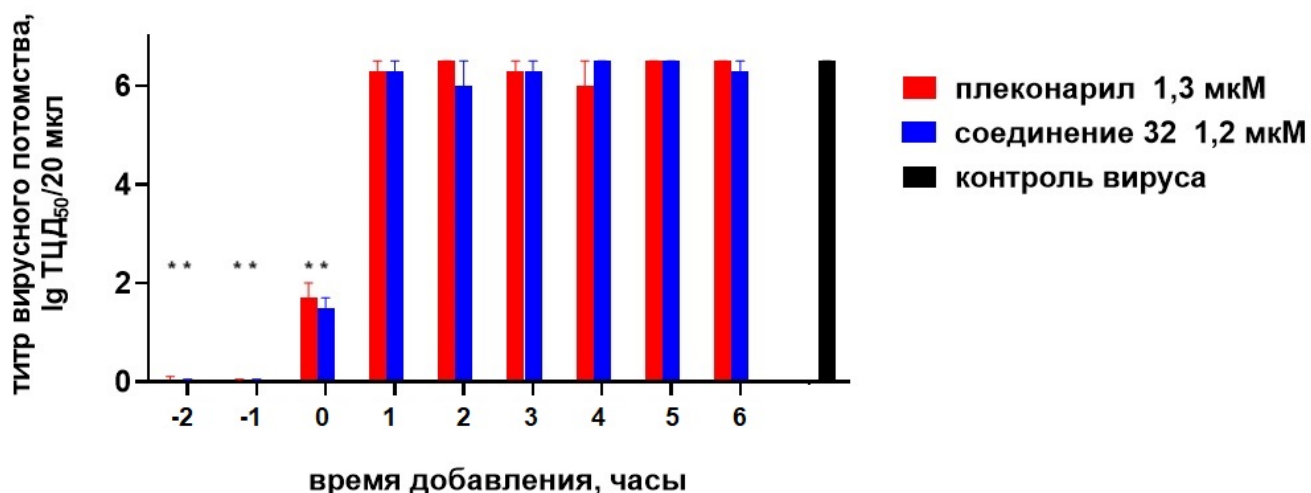


Рисунок 28 - Влияние соединения 32 на репродукцию вируса Коксаки В5 в зависимости от времени добавления соединения в культуру клеток Vero. Значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха для трех независимых экспериментов. Звездочкой отмечены статистически значимые различия в титрах вируса по сравнению с контролем вируса, $p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни

Выраженный ингибирующий эффект соединения 32 отмечали при внесении его за час до инфицирования, одновременно с инфицированием и момент окончания сорбции вируса на мембране клетки (точка 0 часов). При более позднем добавлении соединения 32 ингибирования репродукции вируса не наблюдалось. Плеконарил, использованный в качестве препарата сравнения, ожидаемо продемонстрировал ингибирующую активность при добавлении его в среду за час до инфицирования вирусом, одновременно с инфицированием и в момент окончания сорбции вируса на мембране клетки.

В совокупности полученные результаты теста на термостабильность вирусного капсида и теста на время добавления соединения 32 позволяют сделать вывод о том, что соединение 32 относится к группе капсид-связывающих агентов и ингибирует ранние стадии жизненного цикла вируса Коксаки В5, как и плеконарил.

3.2.3 Изучение механизма действия соединений-лидеров из группы бензолсульфамидов

На первом этапе определяли принадлежность соединения 42 и соединения 41 к группе капсид-связывающих агентов с помощью теста на термостабильность капсида вируса Коксаки В5. В качестве препарата сравнения использовали 4-(4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)фенилсульфониламино)бензойную кислоту (соединение-прототип), которая относится к группе капсид-связывающих агентов, и для которой ранее было показано наличие термостабилизирующих свойств в отношении энтеровирусов [22]. Результаты теста представлены на Рисунке 29.

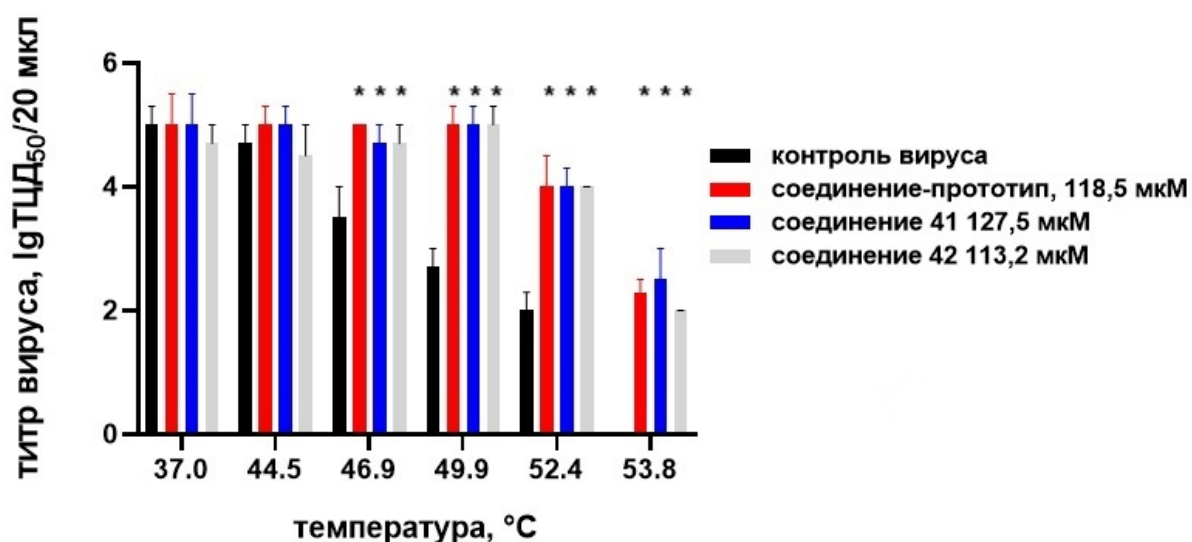


Рисунок 29 - Исследования термической инактивации вируса Коксаки В5 в присутствии соединения 41 и соединения 42. Значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха. Звездочкой отмечены статистически значимые различия в титрах вируса для каждого экспериментального варианта по сравнению с контролем вируса, $p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни

Полная инактивация вируса в контроле происходила при температуре 53,8°C. При предварительной инкубации с соединением 42 (127,5 мкМ) или соединением 41 (113,2 мкМ), как и при добавлении соединения-прототипа (118,5 мкМ), вирус Коксаки В5 сохранял свою инфекционность при повышении температуры до 53,8°C.

Для того, чтобы определить стадию жизненного цикла вируса - возможную мишень действия соединений 42 и 41, был выполнен тест на время добавления исследуемых соединений в разные временные точки относительно внесения вируса в среду с клетками. Вирус Коксаки В5 культивировали в клетках линии Vero с добавлением соединений 42 и 41 или соединения-прототипа с описанным механизмом действия в отдельные лунки планшета в определенные временные точки до или после точки 0 часов, которая обозначает время окончания сорбции вируса на поверхности клеток. Через 8 часов инфекционный титр вирусного потомства определяли методом титрования по конечной точке. Титр вирусного потомства в зависимости от времени внесения исследуемых соединений в среду инфицированных клеток представлен на Рисунке 30.

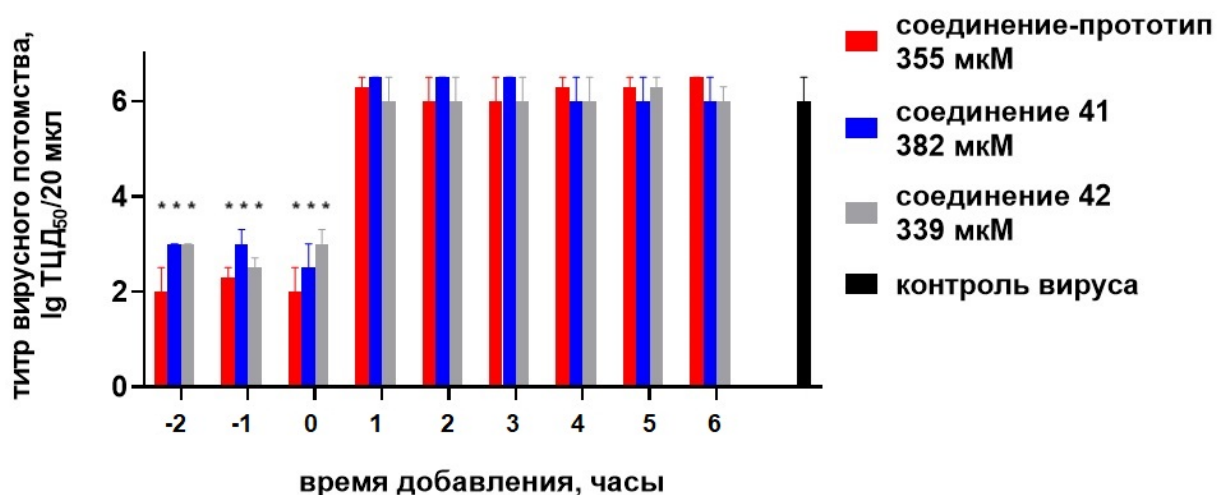


Рисунок 30 - Влияние соединения 41 и соединения 42 на репродукцию вируса Коксаки В5 в зависимости от времени их добавления в культуру клеток Vero. Значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха. Звездочкой отмечены статистически значимые различия в титрах вируса по сравнению с контролем вируса, $p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни

Выраженный ингибирующий эффект соединения 42, соединения 41 и соединения-прототипа наблюдался при их внесении в среду не позже временной точки 0 часов, которая соответствует окончанию сорбции вируса на мембране клетки. При более позднем добавлении исследуемых соединений и контрольного соединения, относящегося к группе капсид-связывающих агентов, ингибирования репродукции вируса не наблюдалось.

Таким образом, было подтверждено, что оба новых производных -(4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)фенилсульфониламино)бензойной кислоты принадлежат к группе капсид-связывающих ингибиторов энтеровирусов и ингибируют ранние стадии жизненного цикла вируса Коксаки В5.

3.2.4 Изучение механизма действия соединения-лидера из группы лейковердазолов

На первом этапе для оценки возможных вирулицидных свойств соединения 65 проводили тест на его способность к инаktivации вируса в бесклеточной среде. (Рисунок 31).

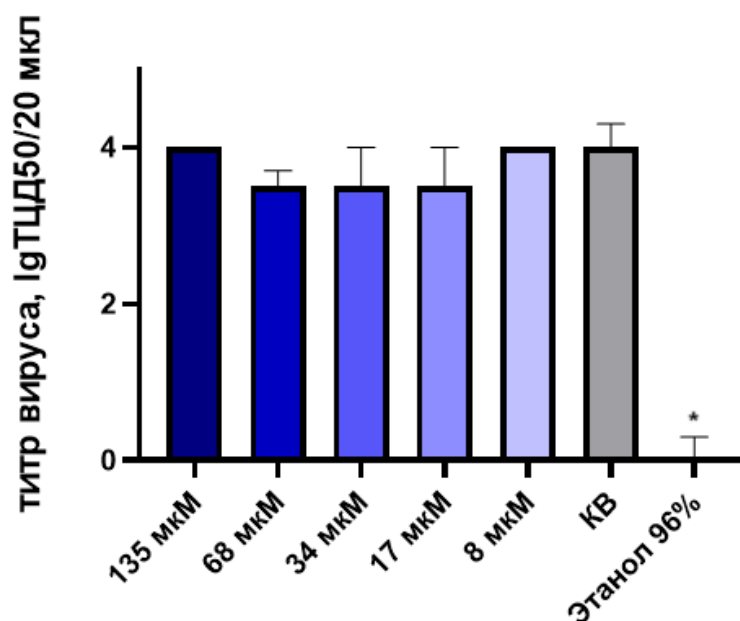


Рисунок 31 - Значения инфекционной активности вируса Коксаки В5 после предварительной инкубации вируса с соединением 65 в бесклеточной системе. Значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха. Звездочкой отмечены статистически значимые различия в титрах вируса по сравнению с контролем вируса, $p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни

Как видно из результатов, представленных на Рисунке 3, действие соединения 65 на вирус в бесклеточной системе не приводило к статистически значимому снижению инфекционной активности вируса Коксаки В5. Таким образом, экспериментальные данные свидетельствуют об отсутствии у соединения-лидера вирулицидного действия.

Для того, чтобы подтвердить или исключить принадлежность исследуемого соединения к группе капсид-связывающих агентов, выполняли тест на термостабильность капсида вируса Коксаки В5 в присутствии соединения 65. Результаты представлены на Рисунке 32.

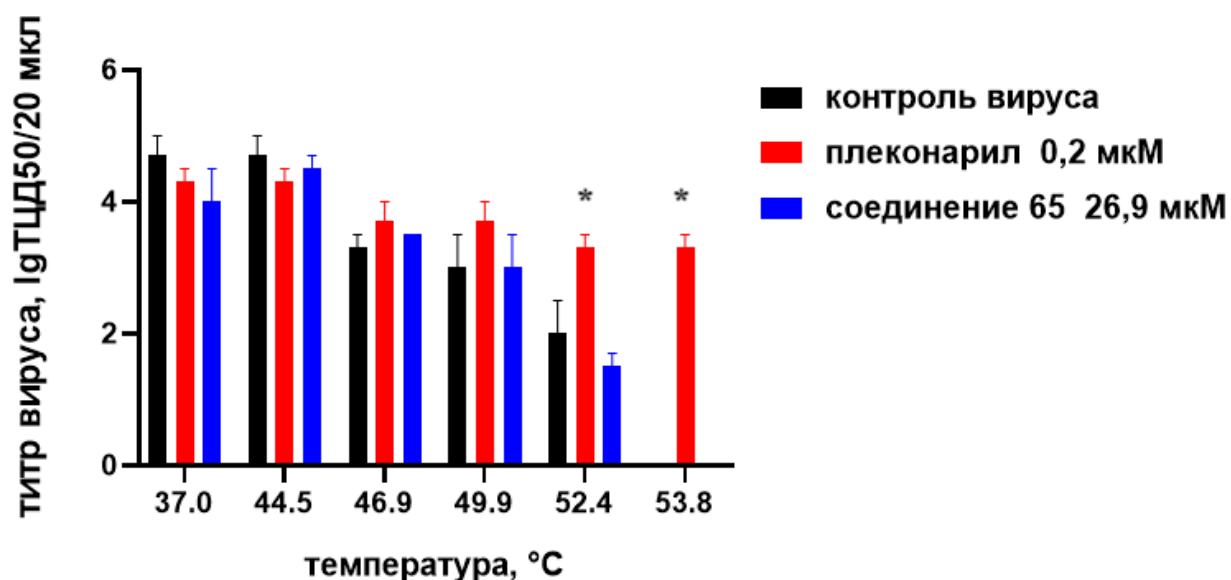


Рисунок 32 - Исследования термической инактивации вируса Коксаки В5 в присутствии соединения 65. Значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха. Звездочкой отмечены статистически значимые различия в титрах вируса в каждой экспериментальной группе по сравнению с контролем вируса, $p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни

При нагревании выше 52,4°C в образце контроля вируса, а также при добавлении к вирусу соединения 65 инфекционных частиц обнаружено не было. Капсид-связывающий агент плеконарил оказал термостабилизирующее действие на вирус Коксаки В5, обеспечив сохранение инфекционности вируса при нагревании до 53,8°C. Таким образом, был сделан вывод о том, что соединение 65 не относится к группе капсид-связывающих ингибиторов энтеровирусов.

Далее исследовали способность соединения 65 ингибировать репродукцию вируса Коксаки В5 в зависимости от способа его применения: до инфицирования, на этапе сорбции или после окончания сорбции вируса на мембране клеток (Рисунок 33).

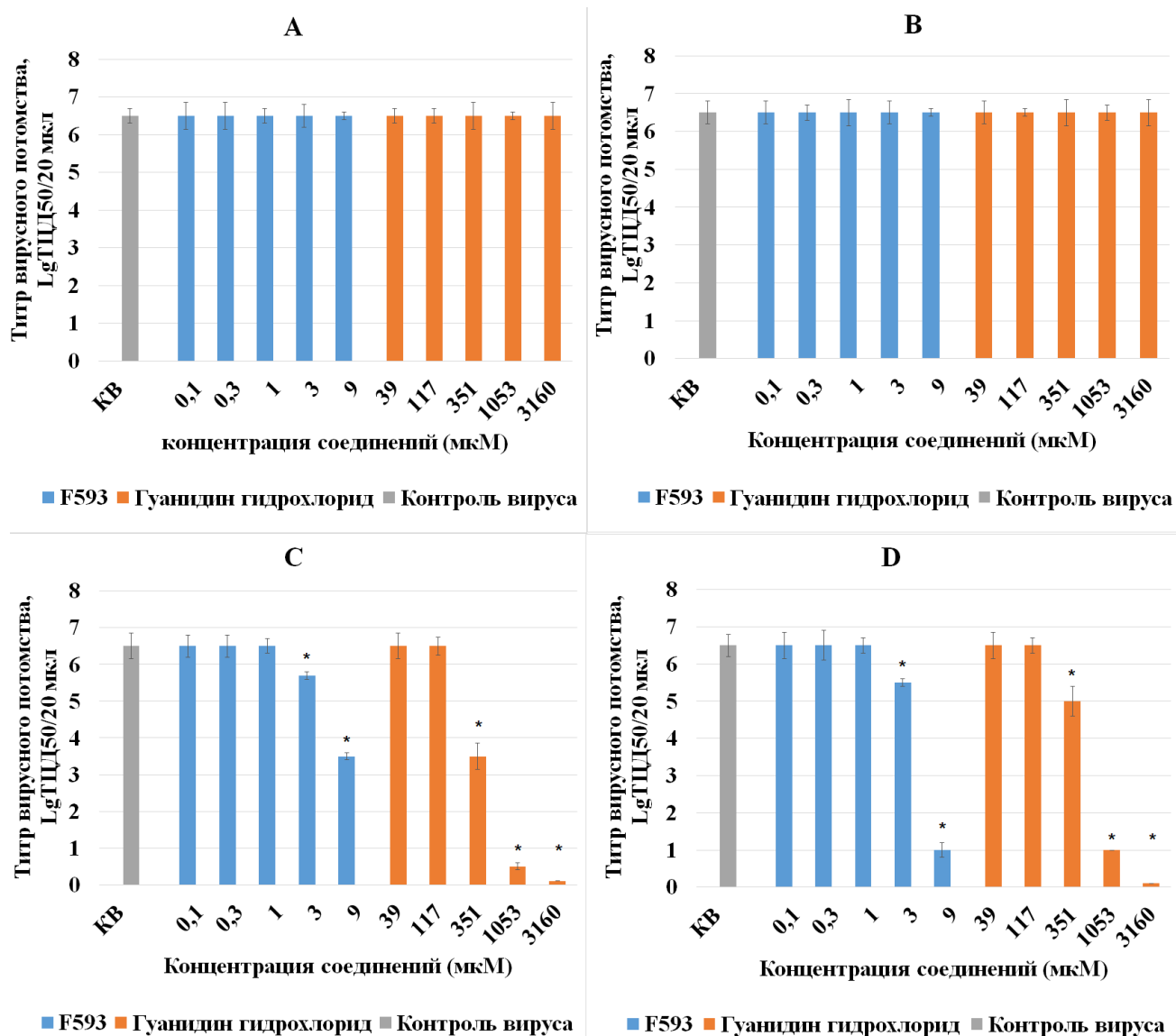


Рисунок 33 – Вирус-ингибирующая активность соединения 65 в зависимости от способа его применения: профилактически (А), на этапе сорбции вируса (В), по лечебной (С) или по лечебно-профилактической схеме (Д) Значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха. Звездочкой отмечены статистически значимые различия в титрах вируса по сравнению с контролем вируса, $p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни

Согласно полученным результатам, вирус-ингибирующая активность соединения 65 менялась в зависимости от способа его применения *in vitro*. Предварительная обработка культуры Vero соединением 65 в течение 1 часа с последующим удалением соединения из поддерживающей среды не приводила к ингибированию репродукции вируса (Рисунок 33А). Добавление соединения 65 на этапе сорбции вируса на мембране клеток не нарушало этот процесс (Рисунок 33В). Выраженное ингибирующее действие соединения 65 и препарата сравнения

гуанидина гидрохлорида было отмечено при их применении по лечебной схеме (когда соединение вносили после окончания сорбции вируса) (Рисунок 33С) или лечебно-профилактической схеме (когда соединение 65 находилось в поддерживающей среде все время выполнения эксперимента) (Рисунок 33D).

Для того, чтобы определить стадию жизненного цикла вируса - возможную мишень действия соединения 65, был выполнен тест на время добавления исследуемого соединения в разные временные точки относительно внесения вируса в среду с клетками в пределах одного цикла репродукции вируса. Вирус Коксаки В5 культивировали в клетках линии Vero с добавлением соединения 65 и контрольных препаратов с описанным механизмом действия (плеконарил, гуанидин гидрохлорид) в отдельные лунки планшета в определенные временные точки до или после точки 0 часов, которая обозначает время окончания сорбции вируса на поверхности клеток. Через 8 часов инфекционный титр вирусного потомства определяли методом титрования по конечной точке. Титр вирусного потомства в зависимости от времени внесения соединений в поддерживающую среду представлен на Рисунке 34.

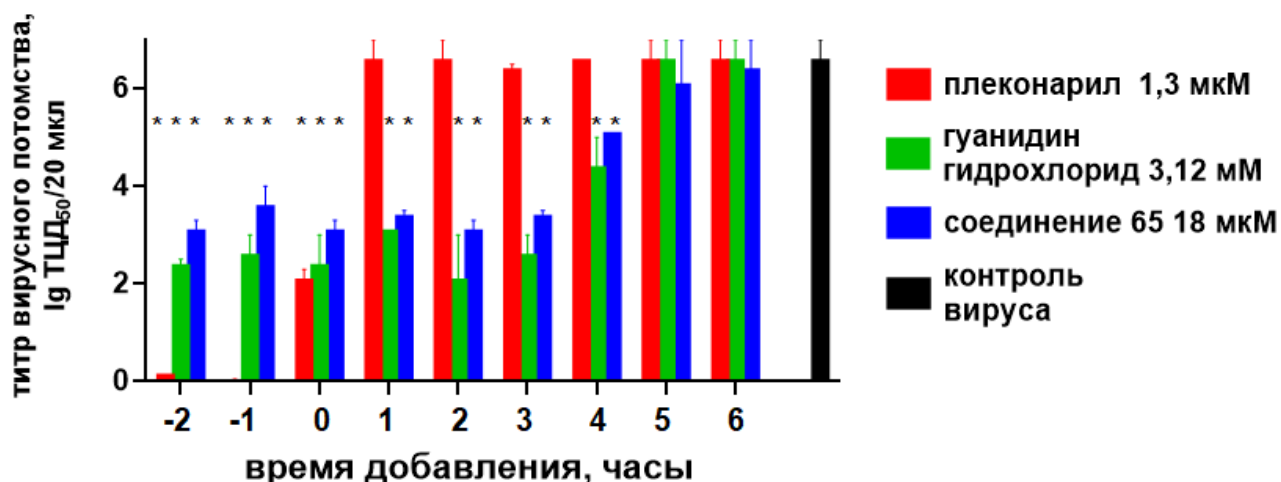


Рисунок 34 - Влияние соединения 65 на репродукцию вируса Коксаки В5 в зависимости от времени добавления в культуру клеток Vero. Значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха. Звездочкой отмечены статистически значимые различия в титрах вируса по сравнению с контролем вируса, $p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни

Плеконарил (контрольный ингибитор этапа проникновения вируса в клетку) продемонстрировал самую высокую активность в период от -2 до 0 часов, как и ожидалось для ингибиторов ранней стадии взаимодействия вируса с клеткой. Гуанидин гидрохлорид (контрольный ингибитор этапа репликации вирусной РНК в клетке) проявлял вирус-ингибирующее действие при наличии в среде в интервале (-2)-4 часов. Для соединения 65 был отмечен вирус-ингибирующий эффект, если вещество вносили в культуральную среду до точки 4 часа (включительно) после заражения. Ингибирования воспроизводства вируса не наблюдалось, если его добавляли спустя 5 часов и позже после окончания сорбции вируса на поверхности клеток.

Жизненный цикл вируса Коксаки описан выше (п.1.1.5). Согласно опубликованным ранее результатам, репликация вирусной РНК начинается не ранее точки 3 ч после заражения: дцРНК-интермедиат и вновь синтезированная (+)РНК детектируются внутри инфицированной клетки, начиная с точки 3 часа [121]. Экспоненциальная фаза репликации вирусной РНК в клетке происходит в интервале 4-5 часов после инфицирования [79]. Белки капсида вирусного потомства в клетке обнаруживаются, начиная с точки 4 ч после заражения [121]. Временной интервал (-2)-4 ч, во время которого отмечается выраженное ингибирующее действие соединения 65 охватывает следующие стадии жизненного цикла вируса: прикрепление к поверхности клеток, проникновение вируса в клетку и его раздевание, трансляцию геномной РНК и ее репликацию.

Полученные результаты *in vitro*: теста на термостабильность вирусного капсида, теста на время добавления в совокупности с отсутствием у соединения 65 вирулицидной и профилактической активности позволяют заключить, что исследуемое соединение действует на мишени, связанные с внутриклеточным этапом репродукции вируса Коксаки В5.

3.3 Оценка противовирусной активности соединений *in vivo*

3.3.1 Адаптация модели энтеровирусного панкреатита у белых мышей

Из ранее опубликованных результатов исследований известно, что вирусы Коксаки В способны вызывать панкреатит у мышей при внутрибрюшинном введении [23; 58; 140; 148]. Для исследования противовирусной активности соединений-лидеров *in vivo* в отдельной серии экспериментов была оптимизирована модель энтеровирусного панкреатита, вызванного вирусом Коксаки В5 у белых мышей линии BALB/c.

На первом этапе работы оценили чувствительность к инфицированию вирусом Коксаки В5 животных разного пола. Самцов и самок белых мышей BALB/c (возраст 6-8 недель, по 10 животных в группе) внутрибрюшинно инфицировали вирусом Коксаки В5 (6×10^6 ТЦД₅₀/200 мкл). На 3 сутки после инфицирования определяли количество инфицированных животных в каждой группе и инфекционный титр вируса в гомогенатах поджелудочной железы у каждого животного (Таблица 12).

Таблица 12 - Значения инфекционной активности вируса Коксаки В5 в ткани поджелудочной железы самцов и самок мышей BALB/c

Группа опыта	Доля инфицированных животных в группе, %	Титр вируса, lgТЦД ₅₀ /20 мкл гомогената ткани поджелудочной железы
Самки	50	2,0 (0,0-5,0)
Самцы	60	3,8 (0,0-5,0)

Значения титра вируса представлены в виде медианы и межквартильного размаха

В группе самцов мышей BALB/c инфицированных животных (6 из 10) было больше, чем в группе самок (5 из 10 животных), однако эти различия не были статистически значимыми ($p > 0,5$). С учетом данных о большей чувствительности к развитию энтеровирусного панкреатита самцов мышей, для дальнейшей оптимизации животной модели были выбраны самцы мышей BALB/c [62].

На следующем этапе работы оценили восприимчивость к инфицированию вирусом Коксаки В5 (6×10^6 ТЦД₅₀/200 мкл, внутрибрюшинно) самцов мышей BALB/c разного возраста: 4-5 недель и 6-8 недель (по 10 животных в группе). На 3 сутки после инфицирования определяли количество инфицированных животных в каждой группе и инфекционный титр вируса в гомогенатах ткани поджелудочной железы у каждого животного (Таблица 13).

Таблица 13 - Значения инфекционной активности вируса Коксаки В5 в ткани поджелудочной железы самцов мышей BALB/c разного возраста

Группа опыта	Доля инфицированных животных в группе, %	Титр вируса, lgТЦД ₅₀ /20 мкл гомогената ткани поджелудочной железы
Самцы (4-5 недель)	90	3,8 (0,0-4,6)
Самцы (6-8 недель)	70	4,3 (3,5-4,6)

Значения титра вируса представлены в виде медианы и межквартильного размаха

Согласно полученным результатам в группе самцов мышей BALB/c в возрасте 4-5 недели инфицированных животных (9 из 10) было больше, чем в группе самцов в возрасте 6-8 недель (7 из 10), однако эти различия не были статистически значимыми ($p > 0,5$). Для дальнейшей работы были выбраны самцы мышей в возрасте 4-5 недель.

На следующем этапе работы исследовали динамику репродукции вируса Коксаки В5 в поджелудочной железе самцов мышей BALB/c (возраст 4-5 недель, 20 животных) при внутрибрюшинном инфицировании (Рисунок 35).

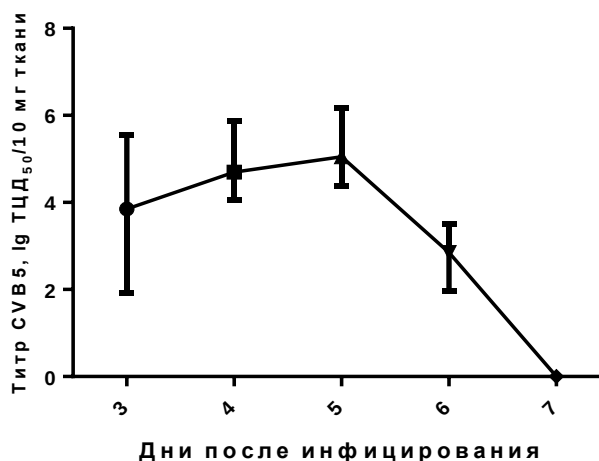


Рисунок 35 - Динамика репродукции вируса Коксаки В5 в ткани поджелудочной железы у самцов мышей BALB/c (возраст 4-5 недель) при внутрибрюшинном введении. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха

Из представленных данных видно, что в период с 3 по 6 сутки после инфицирования вирусом Коксаки В5 в поджелудочной железе мышей BALB/c наблюдается активная репродукции вируса. В дальнейшем к временной точке 7 суток после инфицирования животных инфекционная активность вируса снижается.

Таким образом, на основании полученных результатов для дальнейших исследований протективной активности соединений-лидеров *in vivo* были выбраны самцы мышей BALB/c (возраст 4-5 недель). Срок 5 суток после инфицирования был выбран как точка забора материала для анализа инфекционной активности вируса в ткани органа-мишени (поджелудочной железе).

3.3.2 Активность аналога плеконарила на модели инфекции мышей BALB/c, вызванной вирусом Коксаки В5

На основании проведенных исследований противовирусной активности аналогов плеконарила *in vitro* для экспериментов на животной модели энтеровирусной инфекции было выбрано соединение 32. Активность соединения изучали на модели панкреатита, вызванного инфекцией вируса Коксаки В5 у самцов мышей BALB/c (возраст 4-5 недель) [82]. Доза соединения 32 и

плеконарила (100 мг/кг) для проведения исследования была определена на основании результатов предварительных экспериментов по оценке токсичности соединений *in vivo*, в которых было продемонстрировано отсутствие гибели животных и отсутствие макроскопических изменений при вскрытии в группе животных, получавших соединение 32 или плеконарил в дозе 100 мг/кг/сут внутрибрюшинно (Таблица 14).

Таблица 14 - Оценка токсических свойств соединения 32 и плеконарила по результатам анализа гибели животных

Доза введения	50 мг/кг		100 мг/кг	
Соединение	Количество выживших	Количество умерших	Количество выживших	Количество умерших
Плеконарил	6	0	6	0
Соединение 32	6	0	6	0

Животных инфицировали внутрибрюшинно вирусом Коксаки В5 (6×10^6 ТЦД₅₀/200 мкл). Исследуемое соединение 32 и препарат сравнения плеконарил вводили внутрибрюшинно 2 р/сут, 100 мг/кг/сут, начиная за 12 часов до инфицирования вирусом, в день заражения (день 0) и в течение 5 суток после дня заражения. В качестве плацебо инфицированным животным внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. В каждой группе введения препарата, в группе плацебо, в интактной группе было по 6 животных. На 5 сутки после инфицирования животных умерщвляли путем цервикальной дислокации, изымали поджелудочную железу, делили ее на две части (для вирусологического и гистологического исследования). Определяли инфекционный титр вируса в поджелудочной железе. Результаты определения вирусной нагрузки в поджелудочной железе в каждой группе животных представлены на Рисунке 36.

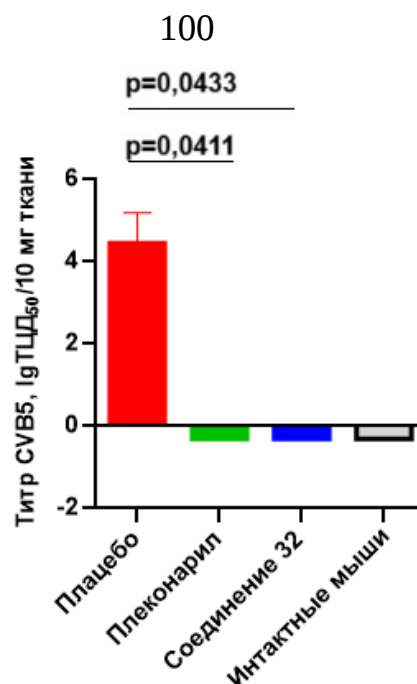


Рисунок 36 - Вирусная нагрузка в поджелудочной железе животных в группе плацебо, группе введения плеконарила или соединения 32 (100 мг/кг/сут) и интактной группе животных (N=6). Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха титра вируса для каждой группы. Статистическую значимость различий титра вируса в каждой группе введения препаратов по сравнению с группой плацебо оценивали с помощью критерия Манна-Уитни

Из приведенных данных видно, что в использованный вирус эффективно размножался в поджелудочной железе животных. В группе плацебо инфекционный титр вируса (медиана) составил 4,4 lgTCID₅₀/10 мг ткани. Введение соединения 32, как и введение плеконарила, приводило к статистически значимому снижению вирусной нагрузки в органе-мишени на 4,8 lgTCID₅₀/10 мг ткани по сравнению с группой плацебо (p=0,0433, p=0,0411).

С целью иллюстрации влияния соединения 32 на характер патоморфологических изменений органа-мишени выполняли гистологическое исследование микропрепаратов поджелудочных желез мышей через 5 суток после заражения вирусом Коксаки B5 при помощи световой микроскопии (Рисунок 37).

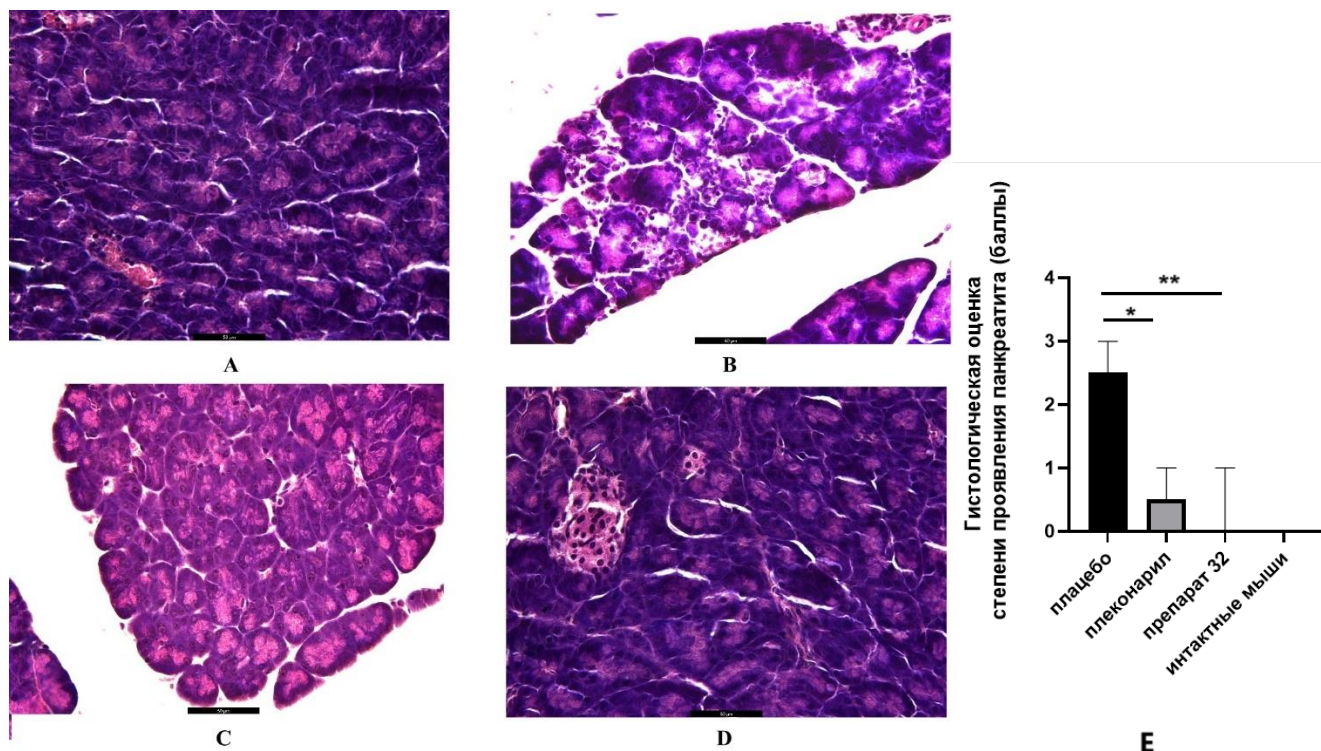


Рисунок 37 – Репрезентативные микрофотографии структуры поджелудочных желез мышей через 5 сут после заражения вирусом Коксаки В5 в интактной группе мышей (А), группе плацебо (В), группе введения плеконарила (С) или соединения 32 (D). Окраска гематоксилин и эозин, масштабная линейка 50 мкм. Гистологическая оценка (в баллах) выраженности панкреатита для каждой группы (данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха) (Е). Статистическую значимость различий результатов гистологической оценки в каждой группе введения препаратов по сравнению с группой плацебо оценивали с помощью критерия Манна-Уитни, звездочкой отмечено $p < 0,05$.

Заражение животных вирусом Коксаки В5 приводило к появлению морфологических признаков острого панкреатита. В группе плацебо отмечались признаки воспалительного процесса в ткани поджелудочной железы в виде цитолиза, очагов некроза и инфильтратов воспалительных клеток, что соответствует ранее опубликованным данным о патогенезе коксакивирусной инфекции этого органа [102]. При этом степень проявления указанных морфологических изменений ткани поджелудочной железы в группах введения плеконарила и соединения 32 была статистически значимо ниже, чем в группе введения плацебо ($p < 0,05$). На основании полученных результатов можно сделать вывод о перспективе дальнейших доклинических исследований соединения 32 в качестве ингибитора энтеровирусной инфекции *in vivo*.

3.3.3 Активность новых производных из группы бензолсульфамидов на модели инфекции мышей BALB/c, вызванной вирусом Коксаки В5

На основании проведенных исследований противовирусной активности *in vitro* были выбраны соединение 42 и соединение 41, эффекты которых изучали в пилотных экспериментах *in vivo* на модели панкреатита, вызванного инфекцией вируса Коксаки В5 у самцов мышей BALB/c (возраст 4-5 недель). Дозу соединений (100 мг/кг/сут) для проведения исследования определяли на основании результатов предварительных экспериментов по оценке токсичности соединений *in vivo*, в которых было продемонстрировано отсутствие гибели животных и отсутствие макроскопических изменений при вскрытии в группах животных, получавших соединение 42, соединение 41 или препарат сравнения (4-(4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)фенилсульфониламино)бензойная кислота) в дозе 100 мг/кг/сут (Таблица 15).

Таблица 15 - Оценка токсических свойств соединений группы бензолсульфамидов по результатам анализа гибели животных

Доза введения	50 мг/кг		100 мг/кг	
Соединение	Количество выживших	Количество умерших	Количество выживших	Количество умерших
Соединение 41	6	0	6	0
Соединение 42	6	0	6	0
Препарат сравнения	6	0	6	0

Животных инфицировали внутрибрюшинно вирусом Коксаки В5 (6×10^6 ТЦД₅₀/200 мкл). Исследуемые соединения и препарат сравнения (4-(4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)фенилсульфониламино)бензойная кислота) вводили внутрибрюшинно 2 р/сут, 100 мг/кг/сут, начиная за 12 часов до заражения вирусом, в день заражения (день 0) и в течение 5 суток после дня заражения. В качестве плацебо инфицированным животным внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. В группе введения каждого соединения, в группе плацебо и в интактной группе было по 10 животных. На 5 сутки животных умерщвляли путем

цервикальной дислокации, изымали поджелудочную железу для вирусологического исследования. Определяли инфекционный титр вируса в поджелудочной железе. Результаты определения вирусной нагрузки в поджелудочной железе в каждой группе животных представлены на Рисунке 38.

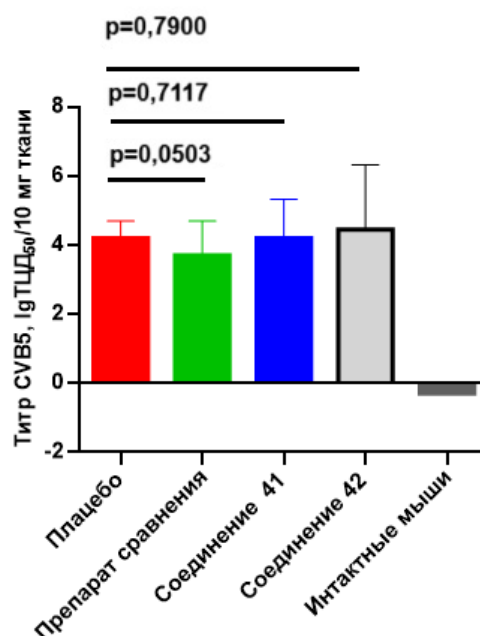


Рисунок 38 - Вирусная нагрузка в поджелудочной железе животных в группе плацебо, группе введения соединения 42, соединения 41 или препарата сравнения (100 мг/кг/сутки) и интактной группе животных (N=10). Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха титра вируса для каждой группы. Статистическую значимость различий титра вируса в каждой группе введения препаратов по сравнению с группой плацебо оценивали с помощью критерия Манна-Уитни

В группе плацебо была отмечена эффективная репликация вируса в поджелудочной железе животных. В группе плацебо инфекционный титр вируса (медиана) составил 4,2 lgTCID₅₀/10 мг ткани. В группах введения соединения 41, соединения 42 и препарата сравнения инфекционный титр вируса (медиана) составил 4,2, 4,4 и lgTCID₅₀/10 мг ткани, соответственно. Введение соединения 42 и соединения 41 не приводило к статистически значимому снижению вирусной нагрузки в органе-мишени. Таким образом, был сделан вывод об отсутствии у исследуемых соединений противовирусной активности в отношении вируса Коксаки B5 *in vivo*.

3.3.4 Активность соединения 65 из группы лейковердазилов на модели инфекции мышей BALB/c, вызванной вирусом Коксаки B5

На основании проведенных исследований противовирусной активности лейковердазилов *in vitro* было выбрано соединение 65, эффекты которого изучали в пилотных экспериментах *in vivo* на модели панкреатита, вызванного инфекцией вируса Коксаки B5 у самцов мышей BALB/c (возраст 4-5 недель). Дозу соединения (50 мг/кг) определяли на основании результатов предварительных экспериментов по оценке токсичности соединения *in vivo*, в которых было продемонстрировано отсутствие гибели животных и отсутствие макроскопических изменений при вскрытии в группе животных, получавших 65 в дозе 50 мг/кг/сут (Таблица 16). В группе животных, получавших 65 в дозе 100 мг/кг/сут в брюшной полости животных отмечалось накопление вязкого экссудата. В отдельных случаях на поверхности почек и печени отмечались очаги некроза в виде белых пятен.

Таблица 16 - Оценка токсических свойств соединения 65 по результатам анализа гибели животных

Доза введения	50 мг/кг		100 мг/кг	
	Количество выживших	Количество умерших	Количество выживших	Количество умерших
Соединение 65	6	0	6	0

Животных инфицировали внутрибрюшинно вирусом Коксаки B5 (6×10^6 ТЦД₅₀/200 мкл). Исследуемый препарат 65 вводили внутрибрюшинно 2 р/сут, 50 мг/кг/сут, начиная за 12 часов до заражения вирусом, в день заражения (день 0) и в течение 5 суток после дня заражения. Препарат сравнения плеконарил вводили внутрибрюшинно 2 р/сут, 100 мг/кг/сут. В качестве плацебо инфицированным животным внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. В группе введения каждого препарата, в группе плацебо и в интактной группе было по 6 животных. На 5 сутки животных умерщвляли и изымали поджелудочную железу для вирусологического исследования. В поджелудочной железе определяли

инфекционный титр вируса. Результаты определения вирусной нагрузки в поджелудочной железе в каждой группе животных представлены на Рисунке 39.

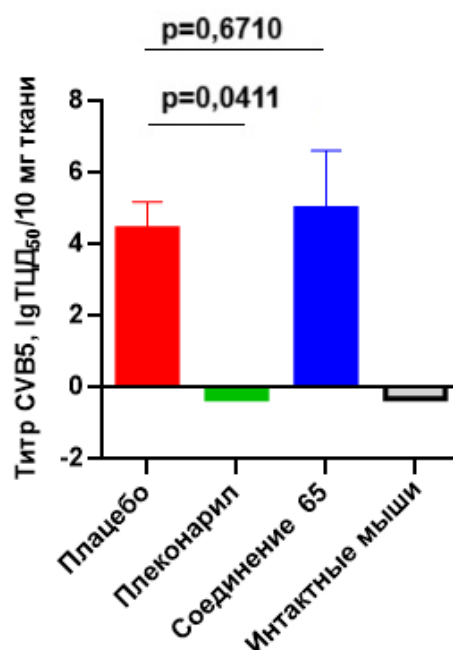


Рисунок 39 - Вирусная нагрузка в поджелудочной железе животных в группе плацебо, группе введения соединения 65 (50 мг/кг/сутки), группе введения плеконарила (100 мкг/кг/сутки) и интактной группе животных (N=6). Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха титра вируса для каждой группы. Статистическую значимость различий титра вируса в каждой группе введения препаратов по сравнению с группой плацебо оценивали с помощью критерия Манна-Уитни

В группе плацебо была отмечена эффективная репликация вируса в поджелудочной железе животных. В группе плацебо инфекционный титр вируса (медиана) составил 4,4 lgTCID₅₀/10 мг ткани. Введение плеконарила приводило к статистически значимому снижению вирусной нагрузки в органе-мишени на 4,8 lgTCID₅₀/10 мг ткани по сравнению с группой плацебо (p=0,0411). В группе введения соединения 65 инфекционный титр вируса (медиана) составил 4,5 lgTCID₅₀/10 мг ткани. Введение соединения 65 не приводило к статистически значимому снижению вирусной нагрузки в органе-мишени (p=0,6710). Таким образом, был сделан вывод об отсутствии у исследуемого соединения противовирусной активности в отношении вируса Коксаки B5 *in vivo*.

3.4 Характеристика штаммов вируса Коксаки, устойчивых к соединениям-лидерам

3.4.1 Штамм вируса Коксаки В3, устойчивый к соединению 32

Для селекции устойчивого штамма был выбран вирус Коксаки В3 (штамм Nancy). Его серийно пассировали (7 пассажей) в присутствии возрастающих концентраций соединения 32 (от 0,2 до 14,2 мкМ) с целью получения устойчивого штамма вируса. Контрольный вирус последовательно пассировали семь раз без добавления исследуемого соединения. Затем в тесте на цитопротекцию оценивали чувствительность всех трех штаммов вирусов: исходного, контрольного и устойчивого к соединению 32, рассчитывали значения EC_{50} (Таблица 17).

Таблица 17 - Чувствительность штаммов вируса Коксаки В3 к соединению 32

Вирус	Титр вируса, $lgTCID_{50}/0,1$ мл	EC_{50} (мкМ)
Исходный вирус	$6,0 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,2$
Контрольный вирус	$6,0 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,3$
Резистентный к соединению 32 штамм вируса	$5,5 \pm 0,4$	$30,3 \pm 2,8$

Значения представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение трех независимых экспериментов

Согласно полученным результатам, семь пассажей в клетках Vero не изменили чувствительность контрольного вируса к соединению 32, поскольку исследуемый препарат оказывал цитопротективное действие при инфицировании культуры Vero вирусом Коксаки В3 при прежних значениях EC_{50} . Однако культивирование вируса в присутствии соединения 32 в течение 7 пассажей вызывало многократное повышение устойчивости к соединению 32 по сравнению с контрольным штаммом.

Методом секвенирования по Сэнгеру были получены нуклеотидные последовательности геномов штамма, резистентного к соединению 32, исходного штамма и контрольного штамма вируса Коксаки В3. Анализ хроматограмм и

сборку контигов выполняли в программе Ugene. Нуклеотидная последовательность резистентного штамма представлена в Приложении Б. В нуклеотидной последовательности резистентного штамма, в отличие от контрольного и исходного штаммов, были обнаружены полиморфизмы в следующих положениях: 2269 T/G, 3124 G/A, 3211 A/G, 3241 A/G. Эти полиморфизмы соответствовали позиции 178 в белке VP3 и позициям 225, 254 и 264 в белке VP1, соответственно. Наличие полиморфизмов позволило предположить генетическое разнообразие отдельных клонов в пределах пула резистентного штамма. Поэтому на следующем этапе работы были изучены нуклеотидные последовательности участка генома, кодирующего белки VP3 и VP1, у отдельных клонов резистентного и контрольного штаммов (по 6 клонов для каждого штамма).

В двух клонах резистентного штамма была обнаружена мутация T2269G, которая соответствовала аминокислотной замене Y178F (тирозин на фенилаланин) в положении 178 белка VP3. В геноме других четырех клонов резистентного штамма были обнаружены две мутации: T3070C, которая соответствовала аминокислотной замене I207T (изолейцин на треонин) в положении 207 белка VP1, и A3241G, которая соответствовала аминокислотной замене Q264R (глутамин на аргинин) в положении 264 белка VP1. Примечательно, что мутация T3070C не была обнаружена среди остальных полиморфизмов на первом этапе секвенирования при анализе генома пула резистентного штамма, и наоборот, полиморфизмы 3124 G/A, 3211 A/G, обнаруженные при анализе пулов, отсутствовали в геномах выбранных для анализа клонов резистентного штамма. Это свидетельствует о необходимости обязательного выполнения анализа генома отдельных клонов при исследованиях резистентности, поскольку очевидно в пуле резистентного штамма находятся клоны с разными аминокислотными заменами, и доля этих геномов в общем пуле варьирует.

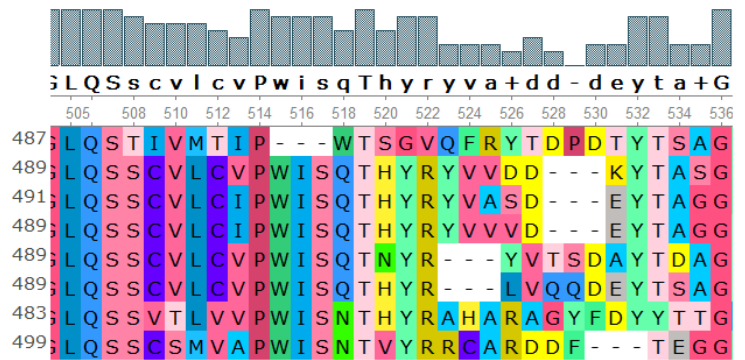
С использованием базы данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот RCSB PDB (PDB ID: 7VXH) был выполнен анализ пространственного расположения аминокислотных остатков, которые подверглись замене в результате выработки резистентности к соединению 32 (Приложение В) [144]. Аминокислоты

тирозин в положении 178 белка VP3 и изолейцин в положении 207 белка VP1 находятся в непосредственной близости от кармана VP1, который является мишенью связывания препарата плеконарил, аналогом которого является соединение 32 (Приложение В, Рисунок В1, Рисунок В2). Аминокислоты серин в положении 225, глутамин в положении 254 и глутамин в положении 264 белка VP удалены от указанного выше кармана VP1 и расположены на наружной поверхности капсида (Приложение В, Рисунок В3, Рисунок В4, Рисунок В5).

Затем был выполнен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей вирусного полипептида всех вирусов рода *Enterovirus*, использованных в данной работе в исследованиях спектра активности соединений-лидеров. Аминокислотные последовательности соответствующих вирусов были получены из базы данных GenBank (Приложение Г, Таблица Г1). Затем для каждого вида была получена консенсусная последовательность полипептида, после чего консенсусы всех использованных в данной работе вирусов были выровнены между собой. Ниже представлен фрагмент этого выравнивания, который включает позиции аминокислот, в которых были выявлены замены у штамма вируса Коксаки В3, резистентного соединению 32 (Рисунок 40).

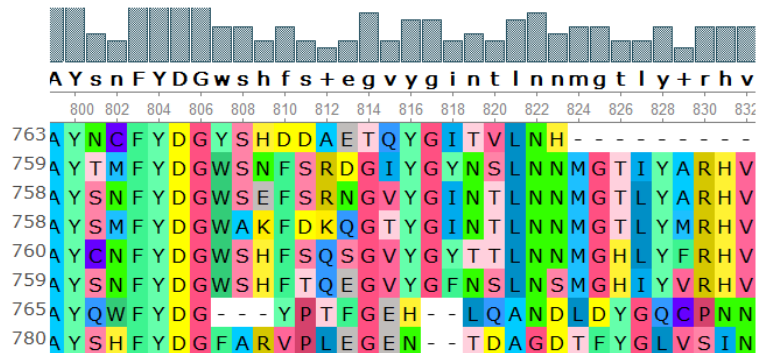
Консенсусная последовательность:

HRV14
CVB4
CVB3
CVB5
ECHO30
ECHO3
CVA16
CVA21



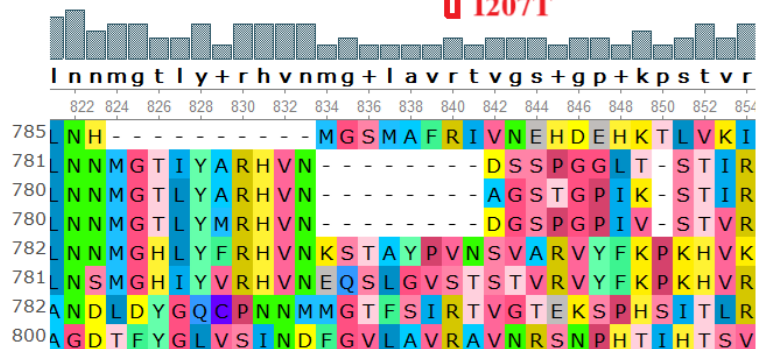
Консенсусная последовательность:

HRV14
CVB4
CVB3
CVB5
ECHO30
ECHO3
CVA16
CVA21



Консенсусная последовательность:

HRV14
CVB4
CVB3
CVB5
ECHO30
ECHO3
CVA16
CVA21



Консенсусная последовательность:

HRV14
CVB4
CVB3
CVB5
ECHO30
ECHO3
CVA16
CVA21

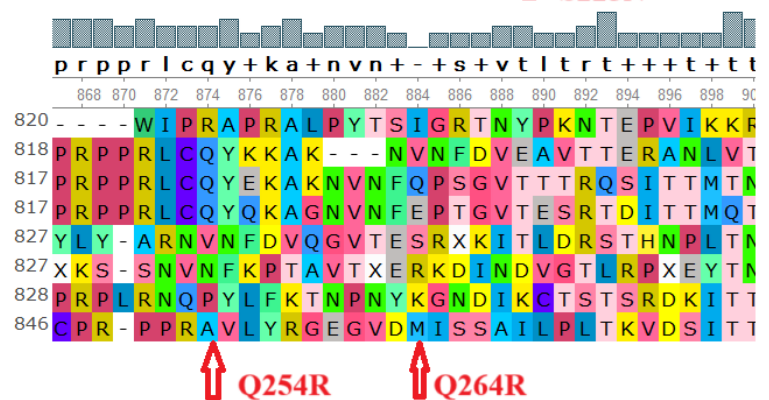


Рисунок 40 - Фрагмент выравнивания консенсусных последовательностей белков VP3 и VP1 вирусов, использованных в данном исследовании. Красными стрелками показаны положения аминокислот, в которых обнаружены полиморфизмы

Проведенный анализ не позволяет сделать однозначного прогноза о чувствительности или устойчивости вируса к соединению 32 на основании анализа аминокислот, расположенных в положениях, подвергшихся замене у вируса Коксаки В3 вследствие высокой гетерогенности поверхностных белков среди проанализированных вирусов.

Для характеристики свойств резистентного штамма была проведена сравнительная оценка фенотипа бляшек (негативных колоний), образованных резистентным штаммом (R) и контрольным штаммом (С) (Рисунок 41).

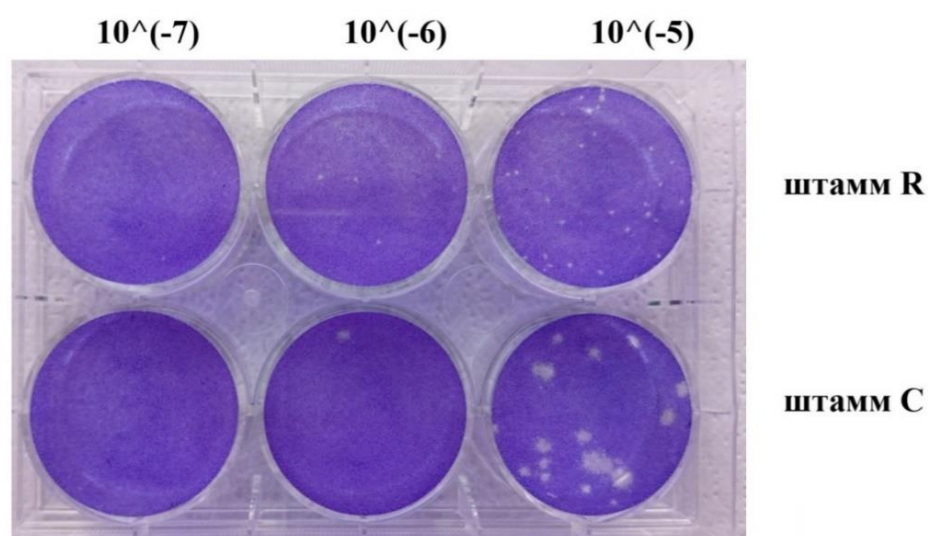


Рисунок 41 - Внешний вид бляшек, образованных штаммами вируса Коксаки В3, полученными в результате экспериментов по выработке резистентности к соединению 32 *in vitro*

Площадь бляшек, образованных резистентным вирусом (медиана $0,4 \cdot 10^6$ мкм^2), была статистически значимо ($p < 0,0001$, U-критерий Манна-Уитни) меньше, чем площадь бляшек, образованных контрольным штаммом (медиана $2,1 \cdot 10^6$ мкм^2).

Исследовали временную динамику роста резистентного штамма и контрольного штамма в присутствии 32 и без него (Рисунок 42).

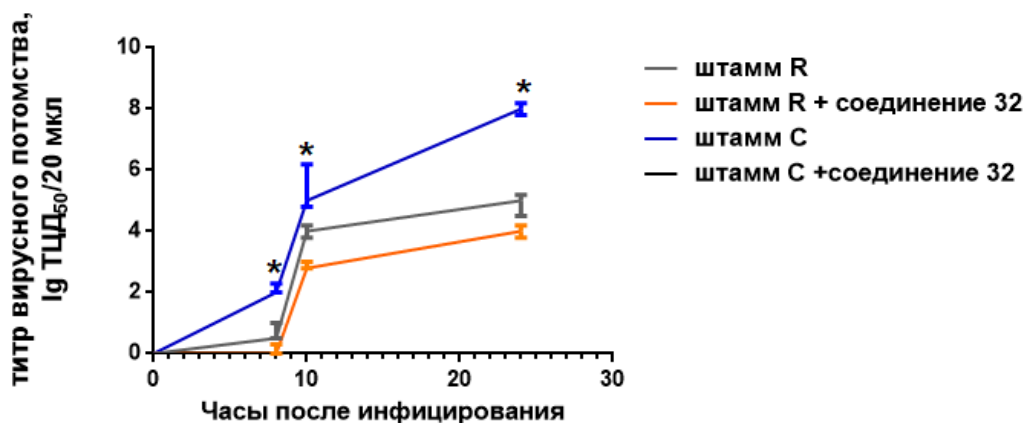


Рисунок 42 - Динамика размножения штаммов С и R в клетках Vero в присутствии соединения 32 (20 мкМ) и без него (m.o.i 0,01). Титр вирусного потомства отображается в зависимости от времени инкубации. Представлены многоступенчатые кривые роста. Звездочка указывает на значимость разницы в титре вируса между CVB3_R и CVB3_C, $p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни

В присутствии соединения 32 устойчивый штамм был способен размножаться в отличие от контрольного штамма, однако продукция вирусного потомства штамма, резистентного к соединению 32, была снижена по сравнению с контрольным штаммом в течение всего времени наблюдения (24 часа). Для подтверждения сохранения мутации резистентности у потомства методом Сэнгера было выполнено секвенирование участка генома, кодирующего белки VP3 и VP1, в точке 24 часа. В геноме резистентного штамма, культивированного в течение 24 часов как в присутствии соединения 32, так и без него, были отмечены полиморфизмы 2269 T/G, 3124 G/A, 3241 A/G. Полиморфизм в положении 3211 A/G в пулах резистентного штамма не был выявлен после культивирования в течение 24 часов, что может говорить о разной доле геномов отдельных клонов в общем пуле.

3.4.2 Штамм вируса Коксаки В3, устойчивый к соединению 65

Вирус Коксаки В3 (штамм Nancy), серийно пассировали (9 пассажей) в присутствии возрастающих концентраций соединения 65 (1,2 до 18,8 мкМ) с целью получения вируса, устойчивого к соединению 65 [142]. Контрольный вирус последовательно пассировали 9 раз без добавления исследуемых соединений.

Затем оценивали чувствительность к исследуемому соединению всех трех штаммов вирусов: исходного (initial), контрольного (C) и устойчивого (R) в тесте на снижение продукции вирусного потомства (значения IC_{50} представлены в Таблице 18).

Таблица 18 - Чувствительность штаммов вируса Коксаки В3 к соединению 65

Вирус	Титр вируса, $lgTCID_{50}/0,1$ мл	IC_{50} (мкМ)
Исходный вирус (initial)	$6,0 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,7$
Контрольный штамм (C)	$6,5 \pm 0,4$	$0,8 \pm 0,2$
Резистентный к соединению 65 штамм вируса (R)	$6,5 \pm 0,1$	$12,9 \pm 2,5$

Значения представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение двух независимых экспериментов

Согласно полученным результатам, 9 пассажей в клетках Vero не изменили чувствительность исходного вируса к соединению 65, исследуемый препарат был способен подавлять репликативную активность вируса. Однако культивирование вируса Коксаки В3 в присутствии соединения 65 вызывало многократное повышение устойчивости к препарату по сравнению с исходным штаммом или вирусом, пассированным без него.

Методом секвенирования по Сэнгеру были получены нуклеотидные последовательности штамма, резистентного к соединению 65, исходного штамма и контрольного штамма. Анализ хроматограмм и сборку контигов выполняли в программе Ugene. Нуклеотидная последовательность резистентного штамма представлена в Приложении Д. В нуклеотидной последовательности резистентного штамма, в отличие от контрольного и исходного штаммов, были обнаружены полиморфизмы в положении генома 4365 G/T и положении 4993 A/G, этим положениям соответствуют аминокислоты серин и гистидин в позиции 109 и позиции 318, соответственно, белка 2С.

Затем были изучены нуклеотидные последовательности участка генома, кодирующего белок 2С отдельных клонов резистентного и контрольного штаммов

(по 6 клонов для каждого штамма). Во всех шести клонов резистентного штамма была обнаружена мутация G4365T, которая соответствовала аминокислотной замене S109I (серин на изолейцин) в белке 2C. Во всех шести клонов отсутствовал второй полиморфизм, A4993G, который был выявлен при анализе хроматограмм при секвенировании пула резистентного штамма, что свидетельствует о разной доле отдельных клонов в общем пуле резистентного штамма.

Белок 2C – многофункциональный белок энтеровирусов, который, помимо других процессов, участвует в репликации вирусного генома. Роль белка 2C в жизненном цикле энтеровирусов подробно описана в разделе обсуждения ниже. Схема доменов белка 2C изображена на Рисунке 43.



Рисунок 43 – Организация белка 2C у энтеровирусов. (адаптировано по El Kazzi, P. и др., 2023 [47])

Аминокислота серин в положении 109 расположена в N-терминальном участке белка 2C. N-терминальный домен участвует в связывании с РНК и содержит амфипатическую спираль для взаимодействия с внутриклеточными мембранами при образовании репликативных органелл. Аминокислота гистидин в положении 318 расположена на С-конце белка 2C в области связывания с РНК.

Для оценки роли аминокислот в положении 109 и 318 белка 2C в обеспечении чувствительности исследованных вирусов к соединению 65 был проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей штаммов, использованных в данной работе (Приложение Г, Таблица Г1). Ниже представлен фрагмент этого выравнивания, который включает позиции 109 и 318 белка 2C (Рисунок 44).

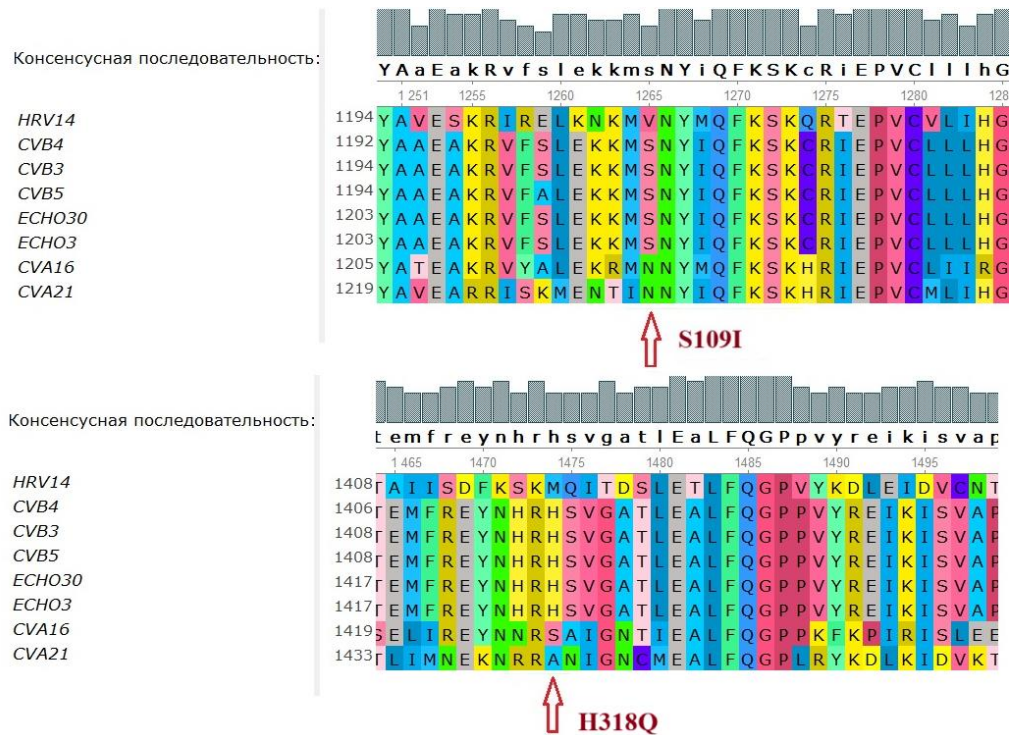


Рисунок 44 - Фрагмент выравнивания консенсусных последовательностей белка 2С вирусов, использованных в данном исследовании. Красными стрелками показаны положения аминокислот, в которых обнаружены полиморфизмы.

В целом была показана гетерогенность аминокислотного состава белка 2С у использованных в работе вирусов, относящихся к разным видам рода *Enterovirus*. Тем не менее, наличие серина в положении 109 и гистидина в положении 318 белка 2С определяло чувствительность к соединению 65 у проанализированных вирусов рода *Enterovirus betacoxsackie* (Таблица 11). У вирусов Коксаки А16 и Коксаки А21 в положении 109 располагался аспарагин, а в положении 318 серин и аланин, соответственно. Полученные данные позволяют предполагать, что положения 109 и 318 являются важными позициями, детерминирующими чувствительность или устойчивость к соединению 65, однако у вирусов разных видов в пределах рода *Enterovirus* это свойство может также определяться другими локусами.

Для характеристики свойств резистентного штамма была проведена сравнительная оценка фенотипа бляшек, образованных резистентным штаммом (R) и контрольным штаммом (С) (Рисунок 45).

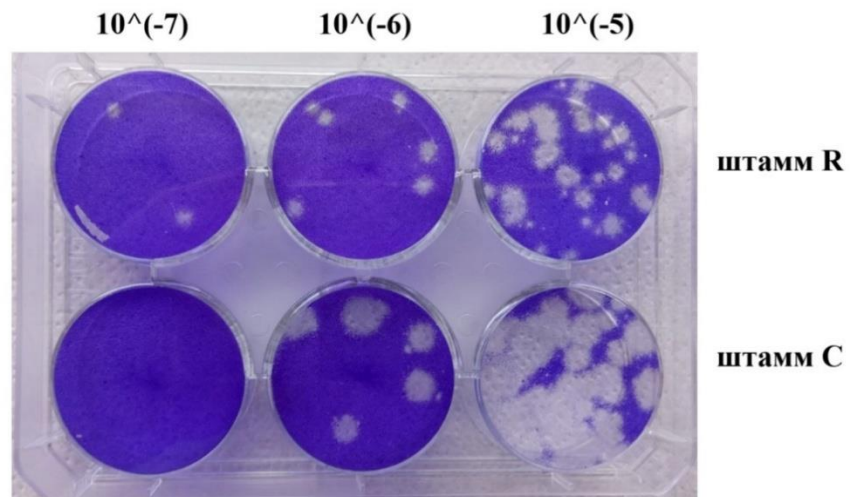


Рисунок 45 –Внешний вид бляшек, образованных штаммами вируса Коксаки В3, полученными в результате экспериментов по выработке резистентности к соединению 65 *in vitro*

Площадь бляшек, образованных резистентным вирусом (медиана $6,7 \cdot 10^6$ мкм²), была статистически значимо ($p=0,035$, U-критерий Манна-Уитни) меньше, чем площадь бляшек, образованных контрольным штаммом вируса (медиана $27,1 \cdot 10^6$ мкм²). Исследовали характеристики роста устойчивого к соединению 65 штамма вируса по сравнению с контрольным вирусом *in vitro* (Рисунок 46).

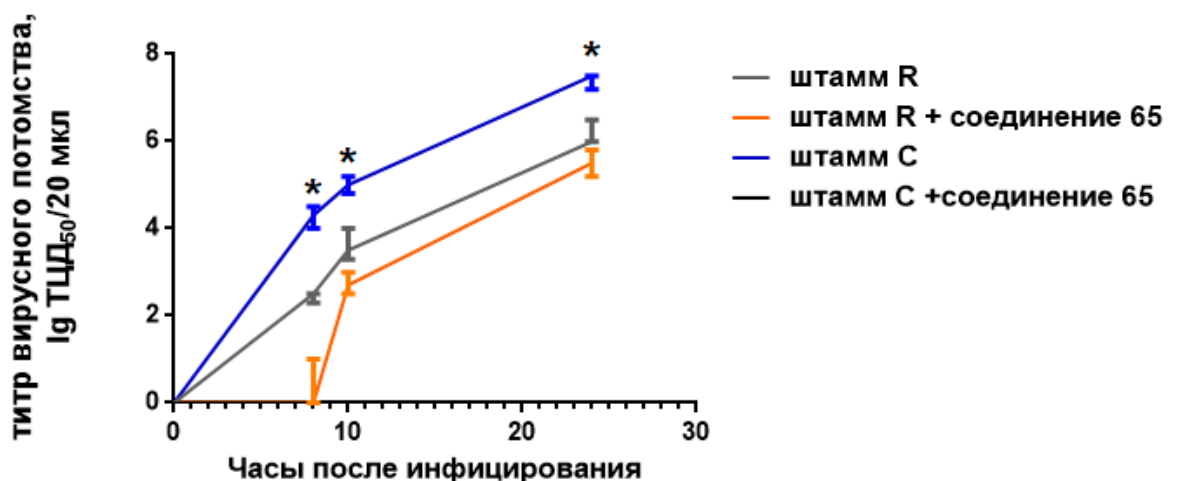


Рисунок 46 - Динамика размножения штаммов С и R в клетках Vero в присутствии 65 (18 мкМ) и без него (m.o.i 0,01). Титр вирусного потомства отображается в зависимости от времени инкубации. Представлены многоступенчатые кривые роста. Звездочка указывает на значимость разницы в титрах между резистентным и контрольным штаммами, $p<0,05$ по U-критерию Манна-Уитни

В присутствии соединения 65 (18 мкМ) устойчивый штамм был способен эффективно размножаться, в отличие от контрольного вируса. Тем не менее, даже без добавления соединения 65 скорость роста резистентного штамма была статистически значимо ниже, чем у контрольного вируса в течение первых 24 часов ($p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни). Дополнительно для подтверждения идентичности резистентного и контрольного штаммов в точке 24 часа было выполнено секвенирование последовательности участка генома, кодирующего белок 2С, в соответствующих образцах. В геноме пула резистентного штамма, культивированного в течение 24 часов как в присутствии соединения 65, так и без него, были отмечены полиморфизмы 4365 G/T и 4993 A/G. В геноме пула контрольного штамма эти полиморфизмы отсутствовали.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В выполненном исследовании дана характеристика противовирусной активности новых гетероциклических соединений аналогов плеконарила (34 соединения), производных бензолсульфамидов (17 соединения), вердазилов (13 соединений) и лейковердазилов (34 соединения) в отношении вирусов рода *Enterovirus*. Охарактеризованы механизмы действия соединений-лидеров в каждой из указанных групп.

Ранее были описаны противовирусные свойства соединений групп оксадиазолов (в частности, плеконарила) и бензолсульфамидов в отношении широкого спектра энтеро- и риновирусов [22; 117]. Известно, что соединения этих классов реализуют свою активность на ранней стадии жизненного цикла вирусов посредством связывания с капсидом вируса, его стабилизации, препятствуя тем самым его конформационным изменениям при раздевании в клетке и проникновению вирусного генома внутрь клетки. Эти соединения относят к группе капсид-связывающих агентов-ингибиторов энтеровирусов и риновирусов, самыми известными из которых являются плеконарил, пиродавир, вапендавир, покапавир (и их производные), мишенью связывания которых является VP1- гидрофобный карман капсида, и 4-(диметиламино)-бензойная кислота и ее производные, которые связываются с капсидом в кармане, образованном двумя белками VP1 и белком VP3 на границе соседних протомеров капсида.

Следует отметить, что противовирусные свойства многих соединений из перечисленных групп были описаны в литературе, но эти работы до сих пор не привели к получению зарегистрированного противовирусного препарата. Также существенным недостатком потенциального применения капсид-связывающих агентов является неизбежная выработка к ним резистентности у вирусов. Этот недостаток можно преодолеть путем использования комбинаций лекарственных препаратов, направленных на разные мишени. Белки капсида являются важнейшими мишенями для дизайна противовирусных препаратов с учетом их незаменимости в жизненном цикле вируса, поэтому дальнейшие разработки

соединений данного класса являются целесообразными. В данной работе исследовали противовирусные свойства и механизм действия аналогов плеконарила и производных 4-(диметиламино)-бензойной кислоты с целью выявить соединения-лидеры с улучшенными свойствами.

Среди аналогов плеконарила было выбрано соединение-лидер (N,N-диметил-5-[3-[2-метил-4-[5-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-3-ил]фенокси]пропил]изоксазол-3-карбоксамид, 32), которое обладало высокой активностью в отношении широкого спектра энтеровирусов, включая плеконарил-резистентный штамм вируса Коксаки В3 (Nancy), вирус ECHO30, ECHO3, Коксаки А16, Коксаки А21, Коксаки В4, Коксаки В5 и риновирус 14 типа. В тестах по исследованию его механизма действия (тест на термостабильность вирусного капсида, тест на время добавления) была подтверждена его капсид-связывающая природа, как и его предшественника – плеконарила.

В экспериментах по выведению резистентных штаммов было показано, что серийное пассирование чувствительного к соединению 32 штамма вируса Коксаки В3 в присутствии возрастающих концентраций соединения 32 приводит к отбору резистентного штамма. Примечательно, что выработка резистентности сопровождалась снижением ростовых свойств устойчивого штамма. При этом резистентному фенотипу соответствуют аминокислотные замены в белке VP1 (I207T, S225A, G254A, G264A) и белке VP3 (Y178F). При этом аминокислоты тирозин в положении 178 белка VP3 и изолейцин в положении 207 белка VP1 расположены поблизости от кармана связывания плеконарила, аналогом которого является соединение 32.

Была исследована протективная активность соединения 32 в эксперименте *in vivo* на модели энтеровирусного панкреатита, вызванного внутрибрюшинным введением вируса Коксаки В5 у самцов мышей BALB/c. Было показано, что введение исследуемого вещества в концентрации 100 мкг/кг 2 р/сут по лечебно-профилактической схеме приводит к статистически значимому снижению вирусной нагрузки в органе-мишени (поджелудочной железе). Показателю вирусологической нагрузки соответствовали результаты гистологического

исследования. Введение соединения 32 устраняло признаки воспаления в поджелудочной железе.

Известно, что неудача исходного препарата плеконарила в клинических исследованиях была связана с индукцией фермента CYP3A4 и возникающих межлекарственных взаимодействий. В данном исследовании для соединения 32 не было выполнено определение физико-химических и фармакокинетических параметров молекулы *in vitro*. Тем не менее, можно предположить наличие у соединения 32 более выгодного фармакокинетического профиля с учетом его высокой активности (сниженных значений IC₅₀) по сравнению с плеконарилом.

В совокупности, можно сделать вывод о высоком противовирусном потенциале соединения 32, которое в дальнейшем может быть изучено в рамках доклинических исследований эффективности и безопасности.

Для соединений группы бензолсульфамидов ранее сообщалось о том, что противовирусная активность обеспечивается при сохранении неизменным фрагмента бензойной кислоты, в частности, ее карбоксильной группы, важной для взаимодействия с мишенью [22]. Тем не менее в проведенном исследовании было показано, что изученные нами модификации фталимидной группы даже при сохранении немодифицированного фрагмента бензойной кислоты ухудшали противовирусную активность исследованных соединений. Были выявлены два соединения-лидера 41 и 42, у которых присутствовали две симметричные карбоксильные группы. Спектр активности и механизм-действия соединений-лидеров соответствовал спектру активности соединения-прототипа (4-[[4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)фенил]сульфониламино]бензойной кислоты).

Несмотря на проявленную активность *in vitro*, в отношении энтеровирусов вида В, в исследовании *in vivo* на модели инфекции мышей BALB/c, вызванной внутрибрюшинным введением вируса Коксаки В5, применение соединений 41 и 42 по лечебно-профилактической схеме не приводило к статистически значимому снижению титра вируса в органе-мишени по сравнению с группой плацебо. Возможно, выбранная доза (100 мг/кг/сутки) или режим введения (внутрибрюшинно) были неподходящими для достижения положительного

результата. Нельзя исключать возможный неблагоприятный фармакологический профиль выбранных соединений. Проведенное исследование следует считать пилотным. Таким образом, с учетом результатов тестов *in vitro* и *in vivo* можно предположить, что необходимы дальнейшие усилия медицинской химии для дизайна ингибиторов более широкого спектра действия и улучшенной биодоступностью на основе каркаса соединения-прототипа (4-[[4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)фенил]сульфониламино]бензойной кислоты).

Ранее сообщалось о новых стабильных свободных радикалах - гетероциклических вердазилах, содержащих бензотиазольный заместитель, и их предшественниках — лейковердазилах [52]. Показано, что лейковердазилы проявляют антиоксидантную активность в бесклеточной системе, что позволяет предположить наличие других видов активности, поэтому нами впервые в мире были исследованы их противовирусные свойства. Результаты нашего исследования свидетельствуют о наличии выраженной вирус-ингибирующей активности соединения-лидера из группы лейковердазилов в тестах *in vitro* в отношении вирусов Коксаки А16, Коксаки В3, В4, В5, ЕСНО3, ЕСНО30 и умеренной активности в отношении вируса Коксаки А21 *in vitro*. Был исследован механизм действия соединения-лидера *in vitro*. Показано, что оно не обладает вирулицидными свойствами, не относится к группе капсид-связывающих агентов и оказывает наиболее выраженное ингибирующее действие на воспроизводство вируса при добавлении в культуральную среду не позже начала репликации вирусного генома в клетке.

В ходе пассирования на клеточной культуре Vero в присутствии повышающихся концентраций 65 был получен штамм со сниженной чувствительностью к 65 и сниженными ростовыми свойствами, несущий аминокислотные замены в вирусном белке 2С (S109I, H318Q).

Белок 2С является многофункциональным и играет важную роль в жизненном цикле энтеровирусов, что делает его привлекательной мишенью для разработки противовирусных средств. [74, 145, 151]. Этот неструктурный белок участвует в

связывании и перестройке мембраны клетки-хозяина, формировании органелл репликации вируса, связывании и синтезе РНК, ее упаковке в капсид. Он обладает АТФ-зависимой РНК-хеликазной, АТФ-независимой шаперонной активностью и АТФазно-независимой нуклеазной активностью. Белки 2С энтеровирусов влияют на сигнальный путь NF- κ B, один из наиболее важных механизмов врожденного противовирусного иммунитета, путем рекрутирования протеинфосфатазы (PP1) для подавления фосфорилирования IKK β и путем прямого связывания с IKK β , а также с p65 и MDA5. Кроме того, EV71 2С индуцирует деградацию другого белка врожденного иммунитета, APOBEC3G, путем его убиквитинирования с использованием пути аутофагия-лизосома.

Нельзя также исключить возможности того, что 65 взаимодействует и с клеточной мишенью, с которой может взаимодействовать белок 2С. Считается, что резистентность к лекарственным препаратам вырабатывается только в случае направленного действия соединений на вирус специфическую мишень. Однако в литературе описан феномен выработки резистентности к веществу-ингибитору клеточного белка PI4KIII β [139]. У резистентного штамма были выявлены аминокислотные замены в вирусном белке 3А после селекции в течение 16 недель. В другом исследовании был выведен штамм полиовируса, резистентный к брефельдину, ингибитору клеточного белка GBF1, который участвует в образовании репликативных органелл. У резистентного штамма были локализованы мутации в белке 2С [141].

Важно отметить наличие у 65 антиоксидантной активности, которая была показана в бесклеточной системе [142]. Известно, что энтеровирусы могут использовать сигнальные и метаболические процессы на основе активных форм кислорода для эффективного распространения внутри клетки. Поэтому нельзя исключить, что 65 обладает двойным механизмом вирусингибирующей активности и потенциально является многоцелевым соединением. Однако в этом отношении данный вопрос следует рассмотреть в дальнейших экспериментах.

Несмотря на многообещающие результаты активности *in vitro*, в исследовании *in vivo* на модели коксакивирусной инфекции у мышей BALB/c введение 65 по лечебно-профилактической схеме не приводило к статистически значимому снижению титра вируса в органе-мишени по сравнению с группой плацебо. Можно предположить, что доза вещества 50 мг/кг/сутки оказалась недостаточной для реализации противовирусного эффекта при системном введении животным. Нельзя исключать возможность неблагоприятного фармакокинетического профиля 65, включая низкую биодоступность, нестабильность в организме. Возможно, для достижения уровня статистически значимых различий с группой плацебо требуется больший объем выборки. Выполненные исследования *in vivo* являются пилотными и, безусловно, необходимы дальнейшие исследования фармакокинетики и эффективности соединения-лидера при применении в различных дозах и схемах терапии. Новое вещество требует полноценного доклинического исследования безопасности, что выходит за рамки данной работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представители рода *Enterovirus* являются этиологическими агентами полиомиелита, энтеровирусных инфекций и риновирусной инфекции человека. Полиомиелит - острое вирусное заболевание с разными по тяжести формами, вызываемого полиовирусами 1, 2, 3 типов. Неплиомиелитные энтеровирусы являются этиологическими агентами энтеровирусных инфекций. Они распространены во всем мире, их отличает широкое разнообразие клинических форм, включая энтеровирусный везикулярный стоматит («болезнь руки-ноги-рот»), менингит, энцефалит, острый вялый паралич, герпетическая ангина, миокардит, перикардит, панкреатит, острый геморрагический конъюнктивит, плевродиния, экзантемы. Описана персистенция энтеровирусов в сердце и поджелудочной железе. При этом один и тот же тип может вызывать заболевания с разными клиническими проявлениями, а инфекция разными типами может проявляться в виде схожих клинических признаков. Риновирусы являются возбудителями респираторных заболеваний: от сезонных простуд до тяжелых инфекций дыхательных путей. Вирусы рода *Enterovirus* отличает высокая стабильность к физико-химическим факторам окружающей среды, а также способность вызывать вспышки, особенно в детских коллективах. Активная трудовая миграция способствует заносу энтеровирусов на новые территории. Все вместе свидетельствует о важности изучения энтеровирусов и риновирусов как патогенов человека.

Специфическая профилактика в виде вакцин (оральной и инактивированной) существует только для защиты от полиомиелита. Разработка вакцин против неплиомиелитных энтеровирусов представляет сложную задачу из-за их высокого серологического разнообразия. В настоящий момент для неплиомиелитных вирусов зарегистрированы три вакцины, все они разработаны в Китае и пока не получили широкого распространения в мире.

Лечение инфекций, вызванных вирусами рода *Enterovirus*, определяется тяжестью клинических симптомов и включает применение симптоматических,

патогенетических и иммуномодулирующих средств. Несмотря на многолетние усилия, предпринимаемые учеными, на сегодняшний момент в мире отсутствуют зарегистрированные этиотропные препараты, направленные на борьбу с энтеровирусами. Поэтому поиск и разработка противовирусных препаратов прямого действия является важной задачей для здравоохранения. Данная работа посвящена поиску перспективных ингибиторов жизненного цикла вирусов рода *Enterovirus* среди новых гетероциклических соединений групп вердазилов, лейковердазилов, аналогов плеконарила и производных бензолсульфамидов.

На первом этапе работы было показано наличие цитопротективной активности *in vitro* в условиях инфицирования вирусом Коксаки В3 у соединений, относящихся к группам лейковердазилов, аналогов плеконарила и производных бензолсульфамидов. Была проведена оценка вирус-ингибирующей активности соединений-лидеров в каждой группе в отношении следующих вирусов рода *Enterovirus*: вирусы Коксаки В3, В4, В5, ЕСНО3, ЕСНО30, Коксаки А16, А21, риновирус 14 типа. Наиболее широким спектром действия обладало соединение-лидер из группы аналогов плеконарила, N,N-диметил-5-[3-[2-метил-4-[5-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-3-ил]фенокси]пропил]изоксазол-3-карбоксамид, которое ингибировало репродукцию даже резистентного к плеконарилу штамма вируса Коксаки В3. Для соединения-лидера из группы лейковердазилов была показана активность в отношении всех использованных штаммов вирусов, за исключением риновируса. Соединения-лидеры из группы бензолсульфамидов были наиболее активными только в отношении вирусов Коксаки В.

В тестах по исследованию механизма действия было показано, что указанный аналог плеконарила и соединения из группы бензолсульфамидов относятся к группе капсид-связывающих агентов и действуют на вирус на ранних стадиях жизненного цикла. Соединение-лидер из группы лейковердазилов не является капсид-связывающим агентом, не обладает вирулицидным действием и ингибирует воспроизводство вируса при добавлении к инфицированным клеткам не позже точки 4 часа после заражения.

На следующем этапе работы исследовали активность соединений-лидеров *in vivo* на модели энтеровирусного панкреатита, вызванного внутрибрюшинным введением вируса Коксаки В5 у самцов мышей BALB/c. В экспериментах *in vivo* только применение аналога плеконарила, в отличие от остальных соединений-лидеров, приводило к снижению вирусной нагрузки в поджелудочной железе по сравнению с группой плацебо, что свидетельствует о перспективности проведения доклинических исследований данного соединения.

На заключительном этапе работы была исследована возможность выработки резистентности к указанному аналогу плеконарила и соединению-лидеру из группы лейковердазилов. В ходе работы была проведена селекция резистентных штаммов вируса Коксаки В3, локализованы аминокислотные замены в вирусных белках 2C, VP3, VP1, показано, что полученные резистентные штаммы имеют сниженные ростовые свойства.

ВЫВОДЫ

1. В результате скринингового исследования среди лейковердазилов, аналогов плеконарила и бензолсульфамидов идентифицированы ингибиторы, обладающие максимальной активностью в отношении вируса Коксаки В3 (штамм Nancy).

2. Соединения-лидеры из группы аналогов плеконарила (соединение 32), бензолсульфамидов (соединения 41, 42), лейковердазилов (соединение 65), проявляли выраженный ингибирующий эффект в отношении различных штаммов вирусов рода *Enterovirus in vitro*. Наиболее широкий спектр активности был отмечен для аналога плеконарила.

3. В экспериментах *in vivo* проведена оптимизация модели энтеровирусного панкреатита у мышей. На разработанной модели показано, что применение соединения-лидера из группы аналогов плеконарила (соединение 32) по лечебно-профилактической схеме приводит к статистически значимому снижению степени проявления инфекции, в отличие от соединения-лидера из группы лейковердазилов (соединение 65) и производных бензолсульфамидов (соединения 41, 42).

4. Соединения 32, 41, 42 являются капсид-связывающими агентами, ингибирующими ранний этап жизненного цикла вируса. Соединение 65 ингибирует внутриклеточный этап репродукции вируса.

5. Резистентность вируса Коксаки В3 к соединениям 32 и 65 развивается в ходе серийного пассирования вируса в культуре Vero в присутствии указанных соединений. Резистентность к соединению 32 сопровождается аминокислотными заменами в белке VP1 (I207T, S225A, G254A, G264A) и белке VP3 (Y178F), к соединению 65 – заменами в белке 2C (S109I, H318Q).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные в ходе исследования сведения о химической структуре, цитотоксичности и активности в отношении вирусов рода *Enterovirus* новых гетероциклических соединений групп лейковердазилов, аналогов плеконарила и бензолсульфамидов могут быть использованы для пополнения баз данных программных продуктов, реализующих методы исследований *in silico*.

Выявленные в ходе экспериментов по выведению резистентных штаммов энтеровирусов мишени в белках VP1, VP3, 2C представляют исходные данные для последующего сайт-специфического синтеза новых противовирусных средств.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Практический интерес представляет изучение вирус-ингибирующего действия соединений-лидеров в отношении других вирусов представителей рода *Enterovirus*, включая полиовирусы.

Перспективны исследования, направленные на получение методами медицинской химии новых производных бензолсульфамидов с улучшенными показателями активности по сравнению с соединением прототипом 4-[[4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)фенил]сульфониламино]бензойной кислотой.

Целесообразным следует также считать дальнейшее детальное изучение механизма действия лейковердазилов методами молекулярной биологии. Необходима дальнейшая оптимизация химической структуры соединений этой группы с целью повышения стабильности и биодоступности для получения кандидатов с улучшенными фармакокинетическими характеристиками с целью проведения исследований *in vitro*.

Перспективны полномасштабные доклинические исследования активности и безопасности соединения 32.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВАПП	-	вакциноассоциированный паралитический полиомиелит
ВОЗ	-	всемирная организация здравоохранения
ДМСО	-	Диметилсульфоксид
ДПВ	-	дикий полиовирус
дцРНК	-	двухцепочечная рибонуклеиновая кислота
ИПВ	-	инактивированная полиовакцина
МТТ	-	микротетразолиевый тест
НПЭВ	-	неполиомиелитные энтеровирусы
ОВП	-	острый вялый паралич
ОПВ	-	оральная полиовакцина
ОРВИ	-	острая респираторная вирусная инфекция
ПВВП	-	полиовирусы вакцинного происхождения
ПЦР	-	полимераная цепная реакция
РНК	-	рибонуклеиновая кислота
РО	-	реликативные органеллы
РФ	-	Российская Федерация
США	-	Соединенные Штаты Америки
ТЦД ₅₀	-	50%-ная тканевая цитопатогенная доза
ЦНС	-	центральная нервная система
ЦПД	-	цитопатическое действие
ЭВ	-	энтеровирусы
ЭВИ	-	энтеровирусная инфекция
ЭВМ	-	энтеровирусный менингит
ЭПР	-	эндоплазматический ретикулум
CC ₅₀	-	50% cytotoxic concentration, 50%-ная цитотоксическая концентрация
COVID19	-	coronavirus disease 2019, коронавирусная инфекция 19
CVA	-	Coxsackie A virus, вирус Коксаки А

CVB	-	Coxsackie B virus, вирус Коксаки В
ECHO	-	Enteric Cytopathic Human Orphan, кишечные цитопатогенные человеческие «сиротские» вирусы
EC ₅₀	-	half maximal effective concentration, 50%-ная эффективная концентрация
EV	-	enterovirus, энтеровирус
HFMD	-	Hand, foot and mouth disease, «болезнь рука-нога-рот»
IC ₅₀	-	half maximal inhibitory concentration, 50%-ная ингибирующая концентрация
ICTV	-	International Committee on Taxonomy of Viruses, Международный комитет по таксономии вирусов
IRES	-	Internal Ribosome Entry Site, участок внутренней посадки рибосомы
m.o.i.	-	multiplicity of infection, множественность инфицирования
ORF	-	open reading frame, открытая рамка считывания
SI	-	selectivity index, индекс селективности
UTR	-	untranslated region, нетранслируемая область

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонова Т.В. Вирусные миокардиты: этиология и патогенез, проблемы диагностики / Т.В. Антонова, Н.С. Жевнерова // Журнал инфектологии. – 2013. – Т. 5 - № 2. – С. 13-21. DOI: 10.22625/2072-6732-2013-5-2-13-21.
2. Бичурина М.А. Глобальная ситуация по полиомиелиту. Стратегия и тактика ВОЗ по ликвидации полиомиелита / М.А. Бичурина, Н.И. Романенкова, Н.Р. Розаева, В.А. Воротникова В.А. // Журнал инфектологии. -2011. – Т. 3. - № 2. – С. 5-14. DOI: 10.22625/2072-6732-2011-3-2-5-14.
3. Волобуева А.С. Разработка противовирусных препаратов для терапии инфекции коксакивируса В3 / А.С. Волобуева, В.В. Зарубаев, К.С. Ланцева // Инфекция и иммунитет. - 2021. - Т. 11. - №1. - С. 57-67. DOI: 10.15789/2220-7619-DOA-1273.
4. Волобуева А.С. Противовирусные свойства вердазилов и лейковердазилов и их активность в отношении энтеровирусов группы В / А.С. Волобуева, В.В. Зарубаев, Т.Г. Федорченко и др. // Инфекция и иммунитет. - 2023. - Т. 13- № 1. - С. 107-118. DOI: 10.15789/2220-7619-VAL-2065
5. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году». – Режим доступа: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=27779 (дата обращения: 02.06.2024). – [Электронный ресурс].
6. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации в 2022 году». – Режим доступа: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=25077 (дата обращения: 02.06.2024). – [Электронный ресурс].
7. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году». - – Режим доступа: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=14933 (дата обращения: 02.06.2024). – [Электронный ресурс].

8. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году». – Режим доступа: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=18267 (дата обращения: 02.06.2024). – [Электронный ресурс].
9. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году». - – Режим доступа: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=21797 (дата обращения: 02.06.2024). – [Электронный ресурс].
10. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году». - – Режим доступа: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=12053 (дата обращения: 02.06.2024). – [Электронный ресурс].
11. Демина А. В. Энтеровирусы. Часть 1: история открытия, таксономия, строение генома, эпидемиология / А. В. Демина, Н. А. Маркович, С.В. Нетесов // Сибирский научный медицинский журнал. - 2008. - №1. – С. 92-100. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/enterovirusy-chast-1-istoriya-otkrytiya-taksonomiya-stroenie-genoma-epidemiologiya> (дата обращения: 02.06.2024).
12. Киселева И.В. Рино- и РС-вирусы в пандемию COVID-19 / И.В. Киселева, А.Д. Ксенафонтов // Инфекция и иммунитет. - 2022. - Т. 12. - №4. - С. 624-638. DOI: 10.15789/2220-7619-RAR-1826.
13. Львов Д.К. Медицинская вирусология: Руководство. Москва: Медицинское информационное агентство, 2007. 640 с.
14. Лобзин Ю.В. Энтеровирусные инфекции: Руководство для врачей / Ю. В. Лобзин, Н. В. Скрипченко, Е. А. Мурина. - Санкт-Петербург: НИИДИ, 2012. - 431 с.
15. Методические указания МУ 3.1.1.4015-24 "Эпидемиологический надзор за энтеровирусной (неполио) инфекцией" (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 18 марта 2024 г. – Режим доступа: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/408788475/> (дата обращения: 02.06.2024). – [Электронный ресурс].

16. Методические указания МУ 3.1.1.4016-24 "Эпидемиологический надзор за полиомиелитом и острыми вялыми параличами" (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 18 марта 2024 г.). – Режим доступа: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/408788411/> (дата обращения: 02.06.2024). – [Электронный ресурс].

17. Методические указания МУ 3.5.2431-08 "Изучение и оценка вирулицидной активности дезинфицирующих средств" (утв. Главным санитарным врачом РФ 13 декабря 2008 г. – Режим доступа: <https://base.garant.ru/71538198/> (дата обращения: 02.06.2024). – [Электронный ресурс].

18. Никонов О.С. Энтеровирусы: вызываемые заболевания и направления разработки противовирусных средств / О.С. Никонов, Е.С. Черных, М.Б. Гарбер, Е.Ю. Никонова // Успехи биологической химии. - 2017. - №57. - С. 119-152. URL: https://www.fbras.ru/wp-content/uploads/2017/12/4-Nikonov_et_al.pdf. (дата обращения: 02.06.2024).

19. Новиков Д.В. Энтеровирусные (*Picornaviridae*: Enterovirus) (неполио) вакцины / Д.В. Новиков, Д.А. Мелентьев // Вопросы вирусологии. - 2022. - Т. 67. - №3. - С. 185-192. DOI: 10.36233/0507-4088-111.

20. Патент № 2783659 Российская Федерация, МПК C07D 417/04 (2006.01), A61K 31/428 (2006.01), A61P 31/14 (2006.01). 2-[5-(4-метокси)-3-фенил-5,6-дигидро-4H-[1,2,4,5]тетразин-1-ил]-бензотиазолы с противовирусной активностью в отношении вирусов коксаки В3 : N 2022101582 : заявл. 24.01.2022 : опубликовано 15.11.2022 / Федорченко Т.Г., Волобуева А.С., Тунгусов В.Н., Зарубаев В.В., Липунова Г.Н., Чупахин О.Н. ; заявитель ФГБУН ИОС им. И.Я. Пастовского УО РАН, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера . – 4 с. : ил. – Текст: непосредственный.

21. Романенкова Н.И. Вакциноассоциированный паралитический полиомиелит и острые вялые параличи на ряде территорий России за двадцатилетний период / Н.И. Романенкова, Н.Р. Розаева, М.А. Бичурина, О.И.

Канаева // Журнал инфектологии. – 2019. – Т. 11. - № 3. - С. 102-109. DOI: 10.22625/2072-6732-2019-11-3-102-109.

22. Abdelnabi, R. A novel druggable interprotomer pocket in the capsid of rhino- and enteroviruses / R. Abdelnabi, J.A. Geraets, Y. Ma [et al.] // PLoS Biology. – 2019. – Vol. 11.- e3000281. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000281.

23. Al-Hello, H. Phenotypic and genetic changes in coxsackievirus B5 following repeated passage in mouse pancreas *in vivo* / H. Al-Hello, B. Davydova, T. Smura [et al.] // Journal of Medical Virology – 2005. – Vol. 75. - № 4. – P. 566-574. DOI: 10.1002/jmv.20303.

24. Anasir, M.I. Antivirals blocking entry of enteroviruses and therapeutic potential / M.I. Anasir, F. Zarif, C. Poh // Journal of Biomedical Science. – 2021. – Vol. 28. - № 10. – P. 1-12. DOI: 10.1186/s12929-021-00708-8.

25. Andries, K. In vitro activity of pirodavir (R 77975), a substituted phenoxy-pyridazinamine with broad-spectrum antipicornaviral activity / K. Andries, B. Dewindt, J. Snoeks [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1992. – Vol. 36. - № 1. – P.100-107. DOI: 10.1128/AAC.36.1.100.

26. Baer, A. Viral concentration determination through plaque assays: using traditional and novel overlay systems / A. Baer, K. Kehn-Hall // Journal of Visualized Experiments. – 2014. – Vol. 4. - № 93. - e52065. DOI: 10.3791/52065.

27. Baggen, J. Bypassing pan-enterovirus host factor PLA2G16 / J. Baggen, Y. Liu, H. Lyoo, A. van Vliet // Nature Communication. – 2019. –Vol. 10.- P. 3171. DOI: 10.1038/s41467-019-11256-z.

28. Baggen, J. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it / J. Baggen, H.J. Thibaut, J. Strating, F. van Kuppeveld // Nature Reviews Microbiology. – 2018. – Vol. 16. - № 6. – P. 368-381. DOI: 10.1038/s41579-018-0005-4.

29. Bauer, L. Direct-acting antivirals and host-targeting strategies to combat enterovirus infections / L. Bauer, H. Lyoo, H. van der Schaar, J. Strating // Current Opinion in Virology. – 2017. – Vol. 24. – P. 1-8. DOI: 10.1016/j.coviro.2017.03.009.

30. Bauer, L. Rational design of highly potent broad-spectrum enterovirus inhibitors targeting the nonstructural protein 2C / L. Bauer, R. Manganaro, B. Zonsics [et

al.] // PLoS Biol. – 2020. – Vol. 18. - № 11. - e3000904. DOI: 10.1016/j.coviro.2017.03.009.

31. Bauer, L. Fluoxetine inhibits enterovirus replication by targeting the viral 2C protein in a stereospecific manner / L. Bauer, R. Manganaro, B. Zonsics [et al.] // ACS Infectious Diseases. – 2019. - Vol. 13. - № 5.- P.1609-1623. DOI: 10.1021/acsinfecdis.9b00179.

32. Beaucourt, S. Ribavirin: a drug active against many viruses with multiple effects on virus replication and propagation. Molecular basis of ribavirin resistance / S. Beaucourt, M. Vignuzzi // Current Opinion in Virology. – 2014. – Vol. 8. – P. 10-15. DOI: 10.1016/j.coviro.2014.04.011.

33. Buchta, D. Enterovirus particles expel capsid pentamers to enable genome release / D. Buchta, T. Füzik T, D. Hrebík, Y. Leviansky // Nature Communication. - 2019.- Vol. 10. – P. 1138. DOI: 10.1038/s41467-019-09132-x.

34. Buontempo, P.J. SCH 48973: a potent, broad-spectrum, antienterovirus compound / P.J. Buontempo, S. Cox, J. Wright-Minogue [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1997. -Vol. 41. -№ 6. – P. 1220-1225. DOI: 10.1128/AAC.41.6.1220.

35. Certification of poliomyelitis eradication-European Region, June 2002. – Режим доступа: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5126a4.htm> (дата обращения: 02.06.2024). – [Электронный ресурс].

36. Chen, T.C. Development of antiviral agents for enteroviruses / T. C. Chen, K.F. Weng, S.C. Chang, J.Y. Lin // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2008. – Vol. 62. - № 6. – P. 1169–1173. DOI: 10.1093/jac/dkn424.

37. Chen, T.C. Novel antiviral agent DTriP-22 targets RNA-dependent RNA polymerase of enterovirus 71 / T.C. Chen, H.Y. Chang, P.F. Lin [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2009. – Vol.53. - № 7. -P. 2740- 2447. DOI: 10.1128/AAC.00101-09.

38. Chen, Y. A cysteine protease inhibitor GC376 displays potent antiviral activity against coxsackievirus infection / Y. Chen, X. Li, M. Wang, Y. [et al.] // Current

Research in Microbial Science. – 2023. - Vol. 16. - № 5. - 100203. DOI: 10.1016/j.crmicr.2023.100203.

39. Clustal Omega. – Режим доступа: <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo> (дата обращения: 05.04.2024) - [Электронный ресурс].

40. Clustal Omega. – Режим доступа: <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo> (дата обращения: 12.02.2022). - [Электронный ресурс].

41. Clustal Omega. – Режим доступа: <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo> (дата обращения: 27.03.2025). - [Электронный ресурс].

42. Coultas, J.A. Experimental Antiviral Therapeutic Studies for Human Rhinovirus Infections / J.A. Coultas, J. Cafferkey, P. Mallia, S.L. Johnston // Journal of Experimental Pharmacology. – 2021. – Vol. 13. - P. 645-659. DOI: 10.2147/JEP.S255211.

43. Daelemans, D. A time-of-drug addition approach to target identification of antiviral compounds / D. Daelemans, R. Pauwels, E. De Clercq, C. Pannecouque // Nature Protocols. – 2011. – Vol. 6. – P. 925-933. DOI: 10.1038/nprot.2011.330.

44. Debing, Y. The future of antivirals: broad-spectrum inhibitors / Y. Debing, J. Neyts, L. Delang // Current Opinion in Infectious Diseases. – 2015. – Vol. 28. - № 6. - P. 596-602. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000212.

45. De Palma AM, Pürstinger G, Wimmer E, Patick AK, Andries K, Rombaut B, De Clercq E, Neyts J. Potential use of antiviral agents in polio eradication. Emerg Infect Dis. 2008 Apr;14(4):545-51. doi: 10.3201/eid1404.070439. PMID: 18394270; PMCID: PMC2570929.

46. Egorova, A. Back to the future: Advances in development of broad-spectrum capsid-binding inhibitors of enteroviruses / A. Egorova, S. Ekins, M. Schmidtke, V. Makarov // European Journal of Medicinal Chemistry – 2019. – Vol. 178. – P. 606-622. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.06.008.

47. El Kazzi, P. 2C protein of Enterovirus: key protein of viral replication and antiviral target / P. El Kazzi, C. Yaacoub, Z. Fajloun, P. Vanelle // *Virologie (Montrouge)*. – 2023. – Vol. 27. - № 3. - P.35-49. DOI: 10.1684/vir.2023.1001.
48. EMBOSS Cons. - Режим доступа: <https://web.expasy.org/translate/> (дата обращения: 23.03.2025). – [Электронный ресурс].
49. Expasy. – Режим доступа: <https://web.expasy.org/translate/> (дата обращения: 05.04.2024). – [Электронный ресурс].
50. Expasy. – Режим доступа: <https://web.expasy.org/translate/> (дата обращения: 12.02.2022). – [Электронный ресурс].
51. Fang, Y. Antiviral Peptides Targeting the Helicase Activity of Enterovirus Nonstructural Protein 2C / Y. Fang, C. Wang, R. Yang, P. Bai [et al.] // *Journal of Virology*. – 2021. – Vol. 24. - № 95. - e02324-20. DOI: 10.1128/JVI.02324-20.
52. Fedorchenko, T.G. Synthesis and spectral, electrochemical, and antioxidant properties of 2-(5-Aryl-6-R-3-phenyl-5,6-dihydro-4H-1,2,4,5-tetrazin-1-yl)-1,3-benzothiazole / T.G. Fedorchenko, G.N. Lipunova, A.V. Shchepochkin, M.S. Valova // *Russian Journal of Organic Chemistry*. – 2020. – Vol. 56. - № 1. - P. 38–48. DOI: 10.1134/S1070428020010078.
53. Feil, S.C. An Orally Available 3-Ethoxybenzisoxazole Capsid Binder with Clinical Activity against Human Rhinovirus / S.C. Feil, S. Hamilton, G.Y. Krippner [et al.] // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2012. – Vol. 13. - № 4. – P. 303-307. DOI: 10.1021/ml2002955.
54. Frost, J. Telaprevir Treatment Reduces Paralysis in a Mouse Model of Enterovirus D68 Acute Flaccid Myelitis / J. Frost, M.J. Rudy, J.S. Leser [et al.] // *Journal of Virology*. – 2023. – Vol. 31. - № 97. - e0015623. DOI: 10.1128/jvi.00156-23.
55. Fu, X. National Epidemiology and Evolutionary History of Four Hand, Foot and Mouth Disease-Related Enteroviruses in China from 2008 to 2016 / X. Fu, Z. Wan, Y. Li [et al.] // *Virology Sinica*. – 2020. – Vol. 35. - № 1. - P. 21-33. DOI: 10.1007/s12250-019-00169-2.

56. Füzik, T. Structure of Human Enterovirus 70 and Its Inhibition by Capsid-Binding Compounds / T. Füzik, J. Moravcová, S. Kalynych, P. Plevka // Journal of Virology. – 2022. -Vol. 96. - № 17. - e0060422. DOI: 10.1128/jvi.00604-22.
57. Gagliardi, T.B. Rhinovirus C replication is associated with the endoplasmic reticulum and triggers cytopathic effects in an *in vitro* model of human airway epithelium / T.B. Gagliardi, M.E. Goldstein, D. Song [et al.] // PLoS Pathogens. – 2022. – Vol. 18. - №1. - e1010159. DOI: 10.1371/journal.ppat.1010159.
58. Galochkina, A.V. Virus-inhibiting activity of dihydroquercetin, a flavonoid from *Larix sibirica*, against coxsackievirus B4 in a model of viral pancreatitis / A.V. Galochkina, V.B. Anikin, V.A. Babkin [et al.] // Archives of Virology. – 2016. – Vol. 161 - № 4. - P. 929-938. DOI: 10.1007/s00705-016-2749-3.
59. Gazina, E.V. Amiloride is a competitive inhibitor of coxsackievirus B3 RNA polymerase / E.V. Gazina, E.D. Smidansky, J.K. Holien [et al.] // Journal of Virology. – 2011. – Vol. 85. - № 19. – P. 10364-10374. DOI: 10.1128/JVI.05022-11.
60. Genus: Enterovirus. – Режим доступа: <https://ictv.global/report/chapter/picornaviridae/picornaviridae/enterovirus>. (дата обращения: 22.01.2025). – [Электронный ресурс].
61. Guide for the care and use of laboratory animals (8th edn) – Washington, D.C.: National Academy press, 2012. – 246 p. Режим доступа: <https://grants.nih.gov/grants/olaw/guide-for-the-care-and-use-of-laboratory-animals.pdf>. (дата обращения: 02.06.2023). – [Электронный ресурс].
62. Gu, R. IL-10 is pathogenic during the development of coxsackievirus B4-induced chronic pancreatitis / R. Gu, A. Shampang, A. Reilly [et al.] / Virology. – 2009. – Vol. 395. - №1. – P. 77-86. DOI: 10.1016/j.virol.2009.09.005.
63. Hao, W. Infection and propagation of human rhinovirus C in human airway epithelial cells / W. Hao, K. Bernard, N. Patel // Journal of Virology. – 2012. – Vol. 86. - № 24. – P.13524-32. DOI: 10.1128/JVI.02094-12.
64. Harrison, D.N. Amiloride derivatives inhibit coxsackievirus B3 RNA replication / D.N. Harrison, E.V. Gazina, D.F. Purcell [et al.] // Journal of Virology. – 2008. – Vol. 82. - № 3. – P. 1465-1473. DOI: 10.1128/JVI.01374-07.

65. Ho, J.Y. In vitro and *in vivo* studies of a potent capsid-binding inhibitor of enterovirus 71 / J.Y. Ho, J.H. Chern, C.F. Hsieh [et al.] // The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2016. – Vol. 71. - № 7. – P. 1922-1932. DOI: 10.1093/jac/dkw101.
66. Hogle, J.M. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution / J. M. Hogle, M. Chow, D. J. Filman // Science. – 1985 – Vol. 229. – № 4720. - P:1358-1365. DOI: 10.1126/science.2994218.
67. Hughes, J.P. Principles of early drug discovery / J.P. Hughes, S. Rees, S.B. Kalindjian, K.L. Philpott // British Journal of Pharmacology. – 2011. – Vol. 162. - № 6. – P. 1239-1249. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.
68. Hurdiss, D.L. Fluoxetine targets an allosteric site in the enterovirus 2C AAA+ ATPase and stabilizes a ring-shaped hexameric complex / D.L. Hurdiss, P. El Kazzi, L. Bauer [et al.] // Science Advances. – 2022. – Vol. 8. – № 1. -eabj7615. DOI: 10.1126/sciadv.abj7615.
69. Ianevski, A. The combination of pleconaril, rupintrivir, and remdesivir efficiently inhibits enterovirus infections *in vitro*, delaying the development of drug-resistant virus variants / A. Ianevski, I.T. Frøysa, H. Lysvand [et al.] // Antiviral Research. – 2024. – Vol. 224. - 105842. DOI: 10.1016/j.antiviral.2024.105842.
70. Ianevski, A. Novel Synergistic Anti-Enteroviral Drug Combinations / A. Ianevski, E. Zusinaite, T. Tenson [et al.] // Viruses. – 2022. -Vol. 14.- № 9. – P.1866. DOI: 10.3390/v14091866.
71. Jackson, D.J. Rhinovirus Infections and Their Roles in Asthma: Etiology and Exacerbations / D.J. Jackson, J.E. Gern [et al.] // The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice. – 2022. – Vol. 10. - №3. – P. 673-681. DOI: 10.1016/j.jaip.2022.01.006.
72. Jensen, S. Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. / S. Jensen, A.R. Thomsen // Journal of Virology. – 2012. – Vol. 86. - № 6. – P. 2900-2310. DOI: 10.1128/JVI.05738-11
73. Kang, H. Synergistic antiviral activity of gemcitabine and ribavirin against enteroviruses / H. Kang, C. Kim, D.E. Kim [et al.] // Antiviral Research. – 2015. – Vol. 124. – P. 1-10. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.10.011.

74. Kejriwal, R. Development of Enterovirus Antiviral Agents That Target the Viral 2C Protein / R. Kejriwal, T. Evans, J. Calabrese [et al.] // *ChemMedChem*. – 2023. – Vol. 18. - № 10. - e202200541. DOI: 10.1002/cmdc.202200541.
75. Kärber G. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologiseher reihenversuche. / G. Kärber // *Archiv fur Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. – 1931. – Vol. 162. - P.480–484. DOI: 10.1007/BF01863914.
76. Kim, B.K. Benserazide, the first allosteric inhibitor of Cocksackievirus B3 3C protease / B.K. Kim, J.H. Cho, P. Jeong [et al.] // *FEBS Letters*. – 2015. – Vol. 589. - № 15. – P. 1795-801. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.05.027
77. Kim, B.K. 2,3,4-Trihydroxybenzyl-hydrazide analogues as novel potent coxsackievirus B3 3C protease inhibitors / B.K. Kim, H. Ko, E.S. Jeon [et al.] // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2016. – Vol. 120. – P. 202-16. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.03.085.
78. Krogvold, L. Pleconaril and ribavirin in new-onset type 1 diabetes: a phase 2 randomized trial / L. Krogvold, I.M. Mynarek, E. Ponzi [et al.] // *Nature Medicine*. – 2023. – Vol. 29. – P. 2902–2908. DOI: 10.1038/s41591-023-02576-1.
79. Kumar, D. The transformation of enterovirus replication structures: a three-dimensional study of single- and double-membrane compartments / D. Kumar, A.J. Koster, E.J. Snijder [et al.] // *mBio*. – 2011. – Vol. 2. - № 5. - e00166-11. DOI: 10.1128/mBio.00166-11.
80. Lacroix, C. In vitro characterisation of a pleconaril/pirodavir-like compound with potent activity against rhinoviruses / C. Lacroix, S. Laconi, S. Angius [et al.] // *Virology Journal*. – 2015. – Vol. 12. – P. 106. DOI: 10.1186/s12985-015-0330-4.
81. Laitinen, O.H. Enteroviral proteases: structure, host interactions and pathogenicity / O.H. Laitinen, E. Svedin, S. Kapell [et al.] // *Reviews in Medical Virology*. – 2016. – Vol. 4. – P. 251-267. DOI: 10.1002/rmv.1883.
82. Lane T.R. Efficacy of an isoxazole-3-carboxamide analog of pleconaril in mouse models of Enterovirus-D68 and Cocksackie B5 / T.R. Lane, J. Fu J., B. Sherry, B. Tarbet, B.L. Hurst, O. Riabova, E. Kazakova, A. Egorova, P. Clarke, J.S. Leser, J. Frost, M. Rudy, K.L. Tyler, T. Klose, A.S. Volobueva, S.V. Belyaevskaya, V.V. Zarubaev, R.J.

Kuhn, V. Makarov, S. Ekins // *Antiviral Res.* – 2023. – Vol. 216. – P. 105654. DOI: 10.1016/j.antiviral.2023.105654.

83. Lanko, K. Assessing In Vitro Resistance Development in Enterovirus A71 in the Context of Combination Antiviral Treatment / K. Lanko, C. Shi, S. Patil [et al.] // *ACS Infectious Diseases.* – 2021. – Vol. 7. - № 10. – P. 2801-2806. DOI: 10.1021/acsinfecdis.0c00872.

84. Li, D. Structure Prediction and Potential Inhibitors Docking of Enterovirus 2C Proteins / D. Li, L. Zhang // *Frontiers in Microbiology.* – 2022. -Vol. 13. - P. 856574. DOI: 10.3389/fmicb.2022.856574.

85. Li, P. Risk Factors for Severe Hand-Foot-Mouth Disease in China: A Systematic Review and Meta-Analysis / P. Li, Y. Huang, D. Zhu [et al.] // *Frontiers in Pediatrics.* – 2021. – Vol. 9. – P. 716039. DOI: 10.3389/fped.2021.716039.

86. Li, X. Enterovirus Replication Organelles and Inhibitors of Their Formation / X. Li, M. Wang, A. Cheng [et al.] // *Frontiers in Microbiology.* - 2020. – Vol. 11. – P. 1817. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01817.

87. Li, Z.H. Ribavirin reduces mortality in enterovirus 71-infected mice by decreasing viral replication / Z.H. Li, C.M. Li, P. Ling // *Journal of Infectious Diseases.* – 2008. – Vol. 197. - № 6. – P. 854-857. DOI: 10.1086/527326.

88. Lin, J.Y. Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle / J.Y. Lin, T.C. Chen, K.F. Weng [et al.] // *Journal of Biomedical Sciences.* – 2009. – Vol. 16. - № 1. – P. 103. DOI:10.1186/1423-0127-16-103.

89. Linden, L. Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses / L.V.d. Linden, K.C. Wolthers, F.J.M. Van Kuppeveld // *Viruses.* – 2015. – Vol. 7. -№ 8. – P. 4529-4562. DOI: 10.3390/v7082832.

90. Liu, B. The whole genome sequence of coxsackievirus B3 MKP strain leading to myocarditis its molecular phylogenetic analysis / B. Liu, Z. Li, F. Xiang [et al.] // *Virology Journal.* – 2014. – Vol. 11. - P.33. DOI: 10.1186/1743-422X-11-33.

91. Liu, Y. Atomic structure of a rhinovirus C, a virus species linked to severe childhood asthma / Y. Liu, M.G. Hill, T. Klose [et al.] // *PNAS.* – 2016. – Vol. 113. - № 32. – P. 8997-9002. DOI: 10.1073/pnas.1606595113.

92. Liu, Y. Direct interaction between two viral proteins, the nonstructural protein 2C and the capsid protein VP3, is required for enterovirus morphogenesis / Y. Liu, C. Wang, S. Mueller [et al.] // PLoS Pathogens. – 2010. – Vol. 6. - № 8. - e1001066. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001066.
93. Liu, X. Identification of a novel acylthiourea-based potent broad-spectrum inhibitor for enterovirus 3D polymerase *in vitro* and *in vivo* / X. Liu, J. Liang, L. Yu [et al.] // Antiviral Research. – 2023. – Vol. 213. - 105583. DOI: 10.1016/j.antiviral.2023.105583.
94. Liu, M. Reversible covalent inhibitors suppress enterovirus 71 infection by targeting the 3C protease / M. Liu, B. Xu, Y. Ma [et al.] // Antiviral Research. – 2021. – Vol. 192. - 105102. DOI: 10.1016/j.antiviral.2021.105102.
95. Lloyd, R.E. Enteroviruses and Type 1 Diabetes: Multiple Mechanisms and Factors? / R.E. Lloyd, M. Tamhankar, A. Lernmark // Annual Review of Medicine. – 2022. – Vol. 73. - P.483-499. DOI: 10.1146/annurev-med-042320-015952.
96. Lulla, V. An upstream protein-coding region in enteroviruses modulates virus infection in gut epithelial cells / V. Lulla, A.M. Dinan, M. Hosmillo [et al.] // Nature Microbiology. – 2019. – Vol. 4. – P. 280-292. DOI: 10.1038/s41564-018-0297-1.
97. Ma, C. Pharmacological Characterization of the Mechanism of Action of R523062, a Promising Antiviral for Enterovirus D68 / C. Ma, Y. Hu, J. Zhang, J. Wang // ACS Infectious Diseases. – 2020. – Vol. 6. - № 8. – P. 2260-2270. DOI: 10.1021/acsinfecdis.0c00383.
98. Ma, Y. New class of early-stage enterovirus inhibitors with a novel mechanism of action / Y. Ma, R. Abdelnabi, L. Delang [et al.] // Antiviral Research. – 2017. – Vol. 147. – P. 67-74. DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.10.004.
99. Mackay, I.M. Human rhinoviruses: the cold wars resume / I.M. Mackay // Journal of clinical virology. – 2008. – Vol. 42. - № 4. – P. 297-320. DOI: 10.1016/j.jcv.2008.04.002.
100. Makarov, V.A. Pyrazolopyrimidines: Potent Inhibitors Targeting the Capsid of Rhino- and Enteroviruses / V.A. Makarov, H. Braun, M. Richter [et al.] //

ChemMedChem. – 2015. – Vol. 10. - № 10. – P. 1629–1634. DOI: 10.1002/cmdc.201500304.

101. Melnick, J.L. My role in the discovery and classification of the enteroviruses / J.L. Melnick // *Annual Review of Microbiology*. – 1996. – Vol. 50. – P.1-24. DOI: 10.1146/annurev.micro.50.1.1.

102. Mena, I. Coxsackievirus infection of the pancreas: evaluation of receptor expression, pathogenesis, and immunopathology / I. Mena, C. Fischer, J.R. Gebhard [et al.] // *Virology*. – 2000. – Vol. 271. - № 2. – P.276-288. DOI: 10.1006/viro.2000.0332.

103. Meng, T. In Vitro and In Vivo Inhibition of the Infectivity of Human Enterovirus 71 by a Sulfonated Food Azo Dye, Brilliant Black BN / T. Meng, Q. Jia, S.M. Wong, K.B. Chua // *Journal of Virology*. – 2019. – Vol. 93. - № 17. - e00061-19. DOI: 10.1128/JVI.00061-19.

104. Messacar, K. 2014 outbreak of enterovirus D68 in North America / K. Messacar, M.J. Abzug, S.R. Dominguez // *Journal of Medical Virology*. – 2016. – Vol. 88. - № 5. – P. 739-745. DOI: 10.1002/jmv.24410.

105. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays / T. Mosmann // *Journal of Immunological Methods*. – 1983. – Vol. 65. – P. 55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

106. Muehlenbachs, A. Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. / A. Muehlenbachs, J. Bhatnagar, S.R. Zaki // *Journal of Pathology* – 2015. – Vol. 235. - № 2. – P. 217-228. DOI: 10.1002/path.4438.

107. Musharrafieh, R. Validating Enterovirus D68-2Apro as an Antiviral Drug Target and the Discovery of Telaprevir as a Potent D68-2Apro Inhibitor / R. Musharrafieh, C. Ma, J. Zhang [et al.] // *Journal of Virology*. – 2019. -Vol. 93. - № 7. - e02221-18. DOI: 10.1128/JVI.02221-18.

108. Mutsafi, Y. Enterovirus Transmission by Secretory Autophagy / Y. Mutsafi, N. Altan-Bonnet // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10. - № 3. – P. 39. DOI: 10.3390/v10030139.

109. Netanyah, E. Extracellular Vesicles Released by Enterovirus-Infected EndoC-βH1 Cells Mediate Non-Lytic Viral Spread / E. Netanyah, M. Calafatti, J.

Arvastsson [et al.] // *Microorganisms*. – 2020. -Vol. 8. - № 11. – P. 1753. DOI: 10.3390/microorganisms8111753.

110. Nisrine F. Blocking human enterovirus 71 replication by targeting viral 2A protease / F. Nisrine, R. Montserret, V. Lelogeais [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2012. - Vol. 67. - № 12. – P. 2865–2869. DOI: 10.1093/jac/dks304.

111. Nix, W.A. Sensitive, Seminested PCR Amplification of VP1 Sequences for Direct Identification of All Enterovirus Serotypes from Original Clinical Specimens / W.A. Nix, M.S. Oberste, M.A. Pallansch // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2006. – Vol. 44. – P. 2698–2704. DOI: 10.1128/JCM.00542-06.

112. Nguyen, A. Host lipidome analysis during rhinovirus replication in HBECs identifies potential therapeutic targets / A. Nguyen, A. Guedán, A. Mousnier [et al.] // *Journal of Lipid Research*. – 2018. – Vol. 59. – № 9. - P. 1671-1684. DOI: 10.1194/jlr.M085910.

113. Oberste, M.S. In vitro antiviral activity of V-073 against polioviruses / M.S. Oberste, D. Moore, B. Anderson, M.A. Pallansch [et al.] / *Antimicrob Agents Chemother*. – 2009. – Vol. 53. – № 10. - P4501-3. DOI: 10.1128/AAC.00671-09.

114. Ogram, S.A. Amiloride inhibits the initiation of Coxsackievirus and poliovirus RNA replication by inhibiting VPg uridylylation / S.A. Ogram, C.D. Boone, R. McKenna, J. B. Flanagan // *Virology*. – 2014. – Vol. 464-465. – P. 87-97. DOI: 10.1016/j.virol.2014.06.025.

115. Okonechnikov, K. UGENE team. Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov, UGENE team // *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28. - №8. - P. 1166–1167. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091.

116. Patick, A.K. In vitro antiviral activity of AG7088, a potent inhibitor of human rhinovirus 3C protease / A.K. Patick, S. Binford, M. Brothers // *Antimicrob Agents Chemother*. – 1999. – Vol. 43. - № 10. – P. 2444-50. DOI: 10.1128/AAC.43.10.2444.

117. Pevear, D.C. Activity of pleconaril against enteroviruses / D.C. Pevear, T.M. Tull, M.E. Seipel, J.M. Groarke // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1999. – Vol. 43. - № 9. – P. 2109-2115. DOI: 10.1128/aac.43.9.2109.

118. Quiner, C.A. Fragmentation of the Golgi apparatus provides replication membranes for human rhinovirus 1A / C.A. Quiner, W.T. Jackson // *Virology*. – 2010. – Vol. 407. - № 2. – P. 185-195. DOI: 10.1016/j.virol.2010.08.012.

119. Rhoden, E. In Vitro Efficacy of Antiviral Compounds against Enterovirus D68 / E. Rhoden, M. Zhang, W.A. Nix, M.S. Oberste // *Antimicrob Agents Chemother.* - 2015. – Vol. 59. - № 12. - P.7779-81. DOI: 10.1128/AAC.00766-15.

120. Royston, L. Rhinoviruses and Respiratory Enteroviruses: Not as Simple as ABC / L. Royston, C. Tapparel // *Viruses*. – 2016. – Vol. 8. - №1. – P. 16. DOI: 10.3390/v8010016.

121. Salmikangas, S. Detection of Viral -RNA and +RNA Strands in Enterovirus-Infected cells and tissues / S. Salmikangas, J.E. Laiho, K. Kalandar [et al.] // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8. - № 12. – P. 1928. DOI: 10.3390/microorganisms8121928.

122. Schmidtke, M. New pleconaril and [(biphenyloxy)propyl]isoxazole derivatives with substitutions in the central ring exhibit antiviral activity against pleconaril-resistant coxsackievirus B3 / M. Schmidtke, P. Wutzler, R. Zieger, O.B. Riabova // *Antiviral Research* – 2009. – Vol. 81. - № 1. – P. 56-63. DOI: 10.1016/j.antiviral.2008.09.002.

123. Schmidtke, M. Susceptibility of coxsackievirus B3 laboratory strains and clinical isolates to the capsid function inhibitor pleconaril: antiviral studies with virus chimeras demonstrate the crucial role of amino acid 1092 in treatment / M. Schmidtke, E. Hammerschmidt, S. Schüler [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2005. – Vol. 56. - № 4. – P. 648–656. DOI: 10.1093/jac/dki263.

124. Sesti-Costa, R. The IL-33/ST2 pathway controls coxsackievirus B5-induced experimental pancreatitis / R. Sesti-Costa, G.K. Silva, J.L. Proença-Módena [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2013. – Vol. 191. - № 1. – P. 283-92. DOI: 10.4049/jimmunol.1202806.

125. Shetnev, A.A./ Design of 4-Substituted Sulfonamidobenzoic Acid Derivatives Targeting Coxsackievirus B3 // Shetnev A.A., Volobueva A.S., Panova V.A. [et al.] // *Life*. – 2022. – Vol. 12. – N. 11. – P. 1832. DOI: 10.3390/life12111832.

126. Simmonds, P. Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses / P. Simmonds, A.E. Gorbalenya, H. Harvala [et al.] // Archives of Virology. – 2020. – Vol. 165. - № 3. – P. 793-797. DOI: 10.1007/s00705-019-04520-6

127. Sioofy-Khojine, A.B. A preclinical assessment to repurpose drugs to target type 1 diabetes-associated type B coxsackieviruses / A.B. Sioofy-Khojine, A. Honkimaa H. Hyöty // Diabet Med. – 2020. – Vol. 37. - № 11. – P. 1849-1853. DOI: 10.1111/dme.14175.

128. Skern, T. 100 years poliovirus: from discovery to eradication. A meeting report / T. Skern // Archives of Virology. – 2010. – Vol. 155. – P. 1371–1381. DOI: 10.1007/s00705-010-0778-x.

129. Smee, D.F. Evaluation of cell viability dyes in antiviral assays with RNA viruses that exhibit different cytopathogenic properties / D.F. Smee, B.L. Hurst, W.J. Evans [et al.] // Journal of Virology Methods. – 2017. – Vol. 246. – P. 51-57. DOI: 10.1016/j.jviromet.2017.03.012.

130. Staring, J. PLA2G16 represents a switch between entry and clearance of *Picornaviridae* / J. Staring, E. von Castelmur, V. Blomen [et al.] // Nature. – 2017. – Vol. 541. – P. 412–416. DOI: doi.org/10.1038/nature21032.

131. Sun, L. Antiviral Activity of Broad-Spectrum and Enterovirus-Specific Inhibitors against Clinical Isolates of Enterovirus D68 / L. Sun, A. Meijer, M. Froeyen [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2015. – Vol. 59. - № 12. – P.:7782-5. DOI: 10.1128/AAC.01375-15.

132. Tammaro, C. Direct-Acting Antivirals and Host-Targeting Approaches against Enterovirus B Infections: Recent Advances / C. Tammaro, M. Guida, F. Appetecchia [et al.] // Pharmaceuticals – 2023. – Vol. 16. – №2. - P. 203. DOI: 10.3390/ph16020203.

133. Tang, Q. Identification of dibucaine derivatives as novel potent enterovirus 2C helicase inhibitors: In vitro, *in vivo*, and combination therapy study / Q.Tang, Z. Xu, M. Jin [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry – 2020. – Vol. 202. – P. 112310. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112310.

134. Tijsma, A. The capsid binder Vapendavir and the novel protease inhibitor SG85 inhibit enterovirus 71 replication / A. Tijsma, D. Franco, S. Tucker [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2014. – Vol. 58. - № 11. – P. 6990-2. DOI: 10.1128/AAC.03328-14.

135. Ulferts, R. Screening of a Library of FDA-Approved Drugs Identifies Several Enterovirus Replication Inhibitors That Target Viral Protein 2C / R. Ulferts, S.M. de Boer, L. van der Linden [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2016. – Vol. 60. - №5. - P. 2627-2638. DOI: 10.1128/AAC.02182-15.

136. Ulferts, R. Selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine inhibits replication of human enteroviruses B and D by targeting viral protein 2C / R. Ulferts, L. van der Linden, H.J. Thibaut [et al.] // *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* – 2013. – Vol. 57. - № 4. - :1952-6. DOI: 10.1128/AAC.02084-12.

137. Valiente, L. Molecular Determinants of Human Rhinovirus Infection, Assembly, and Conformational Stability at Capsid Protein Interfaces / L. Valiente, S. López-Argüello, A. Rodríguez-Huete [et al.] // *Journal of Virology.* – 2022. – Vol. 96. – №23. - P. e00840-22. DOI: 10.1128/jvi.00840-22.

138. van der Linden, L. The RNA template channel of the RNA-dependent RNA polymerase as a target for development of antiviral therapy of multiple genera within a virus family / L. van der Linden, L. Vives-Adrián, B. Selisko [et al.] // *PLoS Pathogens.* – 2015. - Vol. 11. - № 3. - e1004733. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004733.

139. van der Schaar H.M. A novel, broad-spectrum inhibitor of enterovirus replication that targets host cell factor phosphatidylinositol 4-kinase III β / H.M. van der Schaar, P. Leyssen, H.J. Thibaut [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* - 2013. – Vol. 57. - № 10. – P. 4971-4981. DOI: 10.1128/AAC.01175-13.

140. Vella, C. Coxsackievirus B4 infection of the mouse pancreas: acute and persistent infection / |C. Vella, C.L. Brown, D.A. McCarthy // *The Journal of General Virology.* – 1992. - Vol. 73. – P. 1387-1394. DOI: 10.1099/0022-1317-73-6-1387.

141. Viktorova, E.G. The development of resistance to an inhibitor of a cellular protein reveals a critical interaction between the enterovirus protein 2C and a small

GTPase Arf1 / E.G. Viktorova, S. Gabaglio, S. Moghimi [et al.] // PLoS Pathogens. – 2023. – Vol. 19. - № 9. - e1011673. DOI: 10.1371/journal.ppat.1011673.

142. Volobueva, A.S. Leucoverdazyls as Novel Potent Inhibitors of Enterovirus Replication / A.S. Volobueva, T.G. Fedorchenko, G.N. Lipunova [et al.] // Pathogens. – 2024. – Vol. 13. - № 5. – P. 410. DOI: 10.3390/pathogens13050410.

143. Wagoner, J. Combinations of Host- and Virus-Targeting Antiviral Drugs Confer Synergistic Suppression of SARS-CoV-2 / J. Wagoner, S. Herring, T.Y. Hsiang [et al.] // Microbiology Spectrum. – 2022. – Vol. 10. - № 5. - e0333122. DOI: 10.1128/spectrum.03331-22.

144. Wang, Q. Molecular basis of differential receptor usage for naturally occurring CD55-binding and -nonbinding coxsackievirus B3 strains / Q. Wang, Q. Yang, C. Liu [et al.] // PNAS. – 2022. – Vol. 25. - № 119. - e2118590119. DOI: 10.1073/pnas.2118590119.

145. Wang, S.H. The Structure, Function, and Mechanisms of Action of Enterovirus Non-structural Protein 2C / S.H. Wang, K. Wang, K. Zhao [et al.] // Frontiers in Microbiology – 2020. – Vol. 11. – P. 615965. DOI: 10.3389/fmicb.2020.615965.

146. Wang, Y. In vitro Assessment of Combinations of Enterovirus Inhibitors against Enterovirus 71 / Y. Wang, G. Li, S. Yuan, Q. Gao [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2016. – Vol. 60. - № 9. – P. 5357-5367. DOI: 10.1128/AAC.01073-16.

147. Wells, A.I. Enteroviruses: A Gut-Wrenching Game of Entry, Detection, and Evasion / A.I. Wells, C.B. Coyne // Viruses. – 2019. – Vol. 11. – №5. - P. 460. DOI: 10.3390/v11050460.

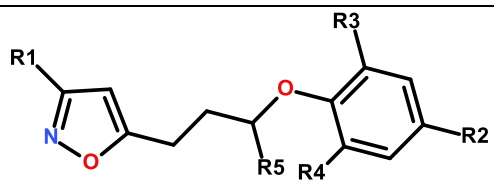
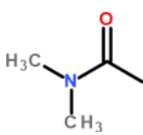
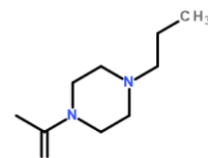
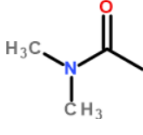
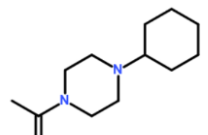
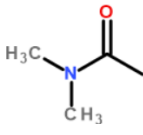
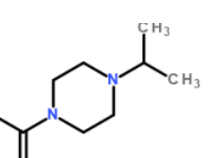
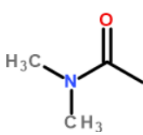
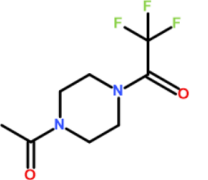
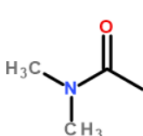
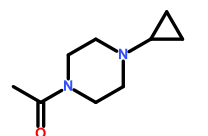
148. Weng, S. Research progress and application prospects of animal models of group B Coxsackievirus infections / R. Weng, S. Zhu, Y. Whu [et al.] // Emerging Microbes and Infections. – 2025. – Vol. 14. - № 1. – P. 2441391. DOI: 10.1080/22221751.2024.2441391.

149. Xu, L. Cryo-EM structures reveal the molecular basis of receptor-initiated coxsackievirus uncoating / L. Xu, Q. Zheng, R. Zhu [et al.] // Cell Host & Microbe. – 2021. – Vol. 29. - № 3. – P. 448-462. DOI: 10.1016/j.chom.2021.01.001.

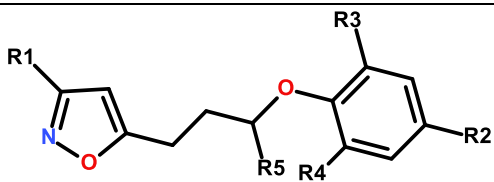
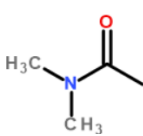
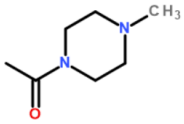
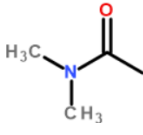
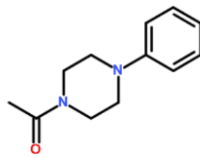
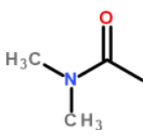
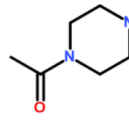
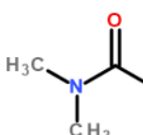
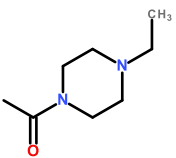
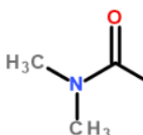
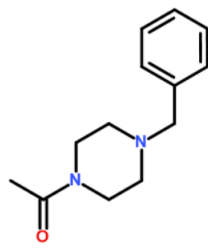
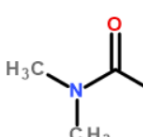
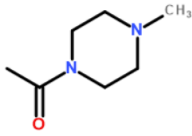
150. Yang, S. Association between enterovirus infection and clinical type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational studies / S. Yang, B. Zhao, Z. Zhang [et al.] // *Epidemiology and Infection*. – 2021.- Vol. 150. – P. e23. DOI: 10.1017/S0950268821002442.
151. Yin, C. Picornavirus 2C proteins: structure-function relationships and interactions with host factors / C. Yin, H. Zhao, X. Xia [et al.] // *Frontiers in Cellular and Infectious Microbiology*. – 2024. – Vol. 14. – P. 1347615. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1347615.
152. Ying, L. Update on enteroviral protease 2A: Structure, function, and host factor interaction / L. Ying, L. Jichen, Z. Yong // *Biosafety and Health*. – 2023. – Vol. 5. - № 6. – P. 331-338. DOI: 10.1016/j.bsheal.2023.09.001.
153. Yuan, J. Enterovirus A71 Proteins: Structure and Function / J. Yuan, I. Shen, J. Wu [et al.] // *Frontiers in Microbiology* – 2018. - Vol. 9. – P. 286. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00286.
154. Zhu, L. Structures of Coxsackievirus A10 unveil the molecular mechanisms of receptor binding and viral uncoating / L. Zhu, Y. Sun, J. Fan [et al.] 140 Zhu, P. Current status of hand-foot-and-mouth disease / P. Zhu, W. Ji, D. Li [et al.] // *Journal of Biomedical Sciences* – 2023. – Vol. 30. - P.15. DOI: 10.1186/s12929-023-00908-4.
155. Zhu, L. Structures of Coxsackievirus A10 unveil the molecular mechanisms of receptor binding and viral uncoating / L. Zhu, Y. Sun, J. Fan [et al.] // *Nature Communication*. – 2018. - № 9. – 4985. DOI: 10.1038/s41467-018-07531-0.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. Результаты исследования противовирусной активности соединений аналогов плеконарила, бензолсульфамидов, лейковердазилов и вердазилов в отношении вируса Коксаки В3 штамм Nancy

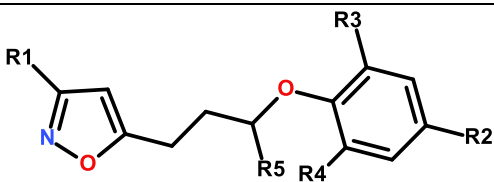
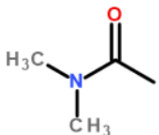
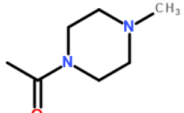
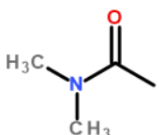
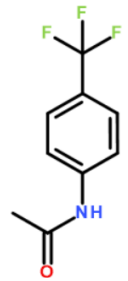
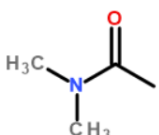
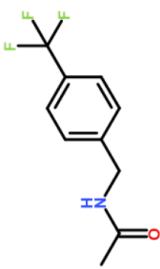
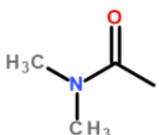
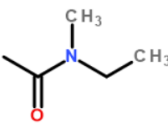
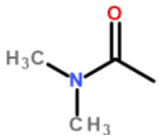
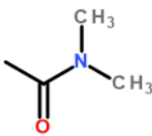
Таблица А1 - Показатели цитопротективной и цитотоксической активности исследованных аналогов плеконарила в условиях инфицирования вирусом Коксаки В3 (Nancy) культуры клеток Vero

								
Соединение	R1	R2	R3	R4	R5	CC ₅₀ , мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI
1			CH ₃	H	H	>626,2	>208,2	н/а
2			CH ₃	H	H	>578,1	>192,1	н/а
3			CH ₃	H	H	>627,2	>209,1	н/а
4			CH ₃	H	H	>604,8	>201,6	н/а
5			CH ₃	H	H	183,3 ± 14,2	>67,2	н/а

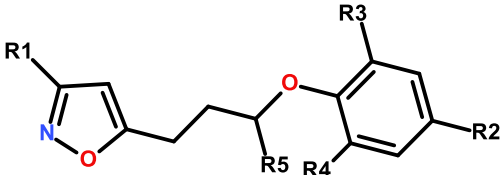
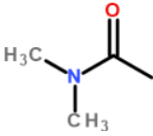
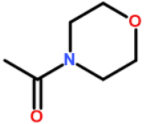
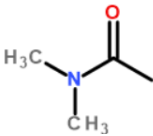
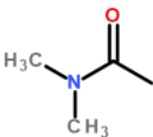
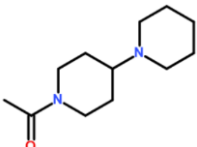
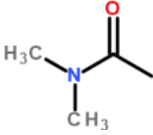
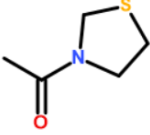
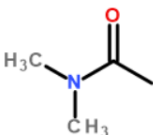
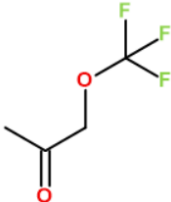
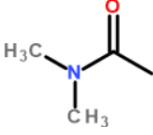
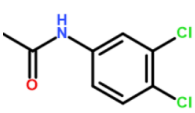
Продолжение Таблицы А1

								
Соедине ние	R1	R2	R3	R4	R5	CC ₅₀ , мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI
6			CH ₃	H	H	>241,5	>79,7	н/а
7			CH ₃	H	H	86,6 ± 10,5	>33	н/а
8			CH ₃	H	H	> 250,1	>82,5	н/а
9			CH ₃	H	H	>233,6	>77,1	н/а
10			CH ₃	H	H	40,1 ± 7,2	>33	н/а
11			CH ₃	CH ₃	H	>204,1	67,3 ± 2,1	>3

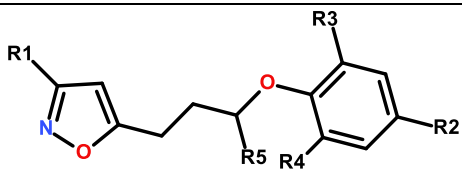
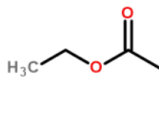
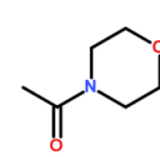
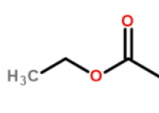
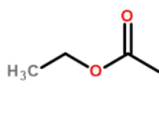
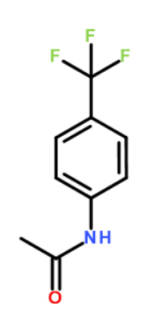
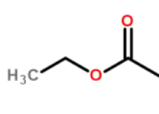
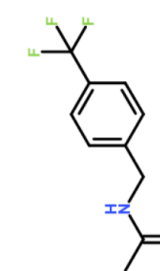
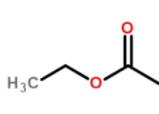
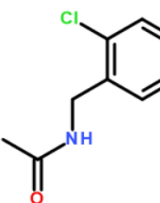
Продолжение Таблицы А1

								
Соединение	R1	R2	R3	R4	R5	CC ₅₀ , мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI
12			Cl	Cl	H	>213,2	70,3 ± 4,3	>3
13			CH ₃	H	H	332,6 ± 25,2	>210,5	н/а
14			CH ₃	H	H	478,5 ± 51,1	>204,5	н/а
15			CH ₃	H	H	45,1 ± 8,1	>29,5	н/а
16			CH ₃	H	H	>278,5	>91,9	н/а

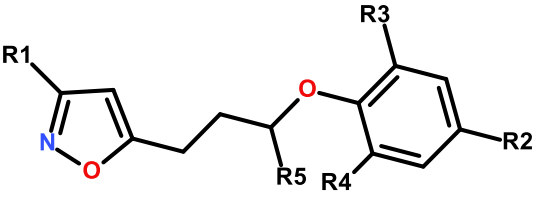
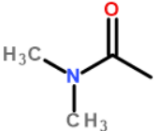
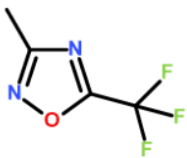
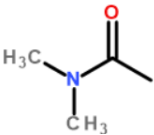
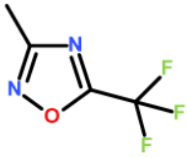
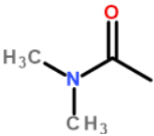
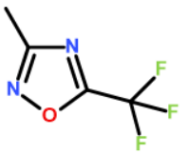
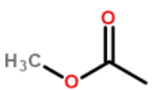
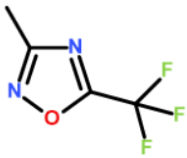
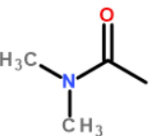
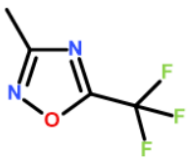
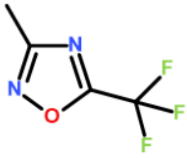
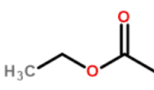
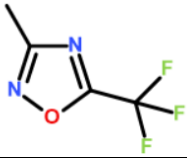
Продолжение Таблицы А1

								
Соединение	R1	R2	R3	R4	R5	CC ₅₀ , мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI
17			CH ₃	H	H	454,4 ± 34,8	>249,4	н/а
18			CH ₃	H	H	>719,4	86,3 ± 7,2	>8
19			CH ₃	H	H	82,9 ± 6,2	>68,4	н/а
20			CH ₃	H	H	493,8 ± 19,5	>248,1	н/а
21			CH ₃	H	H	144,9 ± 10,1	91,8 ± 5,6	н/а
22			CH ₃	H	H	132,3 ± 10,5	>69,3	н/а

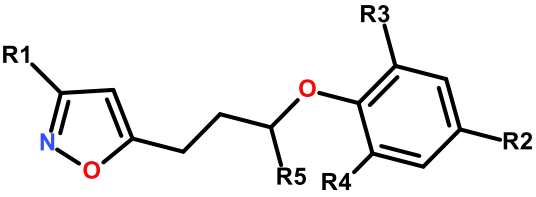
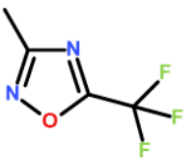
Продолжение Таблицы А1

								
Соединение	R1	R2	R3	R4	R5	CC ₅₀ , мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI
23			CH ₃	H	H	156,7 ± 12,4	>82,1	н/а
24			CH ₃	H	H	239,1 ± 26,3	>78,9	н/а
25			CH ₃	H	H	163,8 ± 10,6	>69,3	н/а
26			CH ₃	H	H	183,7 ± 14,2	>67,3	н/а
27			CH ₃	H	H	407,9 ± 26,3	>219,3	н/а

Продолжение Таблицы А1

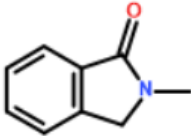
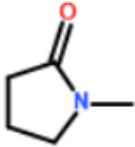
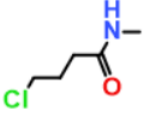
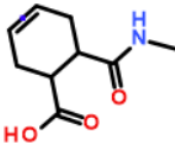
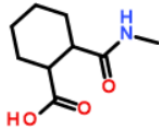
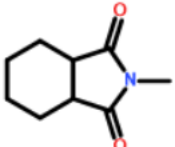
								
Соедине ние	R1	R2	R3	R4	R5	CC ₅₀ , мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI
28			NO ₂	-O-CH ₃	H	514,4 ± 45,2	>205,7	н/а
29			CH ₃	CH ₃	H	>707,5	>235,8	н/а
30			H	NO ₂	H	141,5 ± 11,8	>77,8	н/а
31			CH ₃	CH ₃	H	94,1 ± 7,1	>77,6	н/а
32			H	CH ₃	H	59,1 ± 4,7	0,7 ± 0,2	85
33	CH ₃		CH ₃	H	O	524,9 ± 36,7	>262,4	н/а
34			CH ₃	H	O	455,6 ± 26,6	>227,8	н/а

Продолжение Таблицы A1

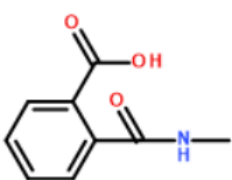
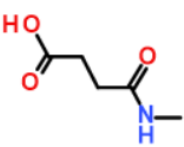
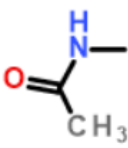
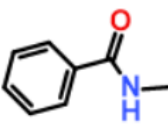
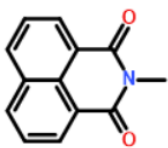
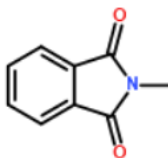
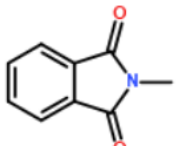
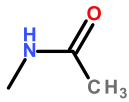
								
Соедине ние	R1	R2	R3	R4	R5	CC ₅₀ , мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI
Плекона рил	CH ₃		CH ₃	CH ₃	H	60,4 ± 7,9	>28,9	н/а

Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов, н/а – соединение неактивно

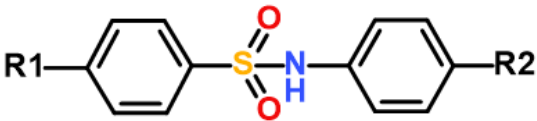
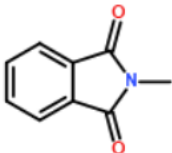
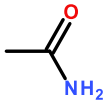
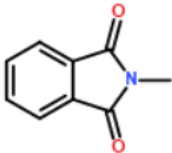
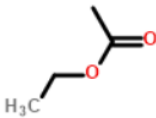
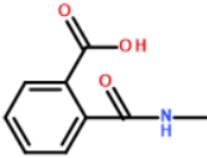
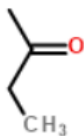
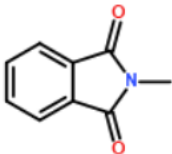
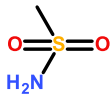
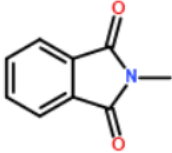
Таблица А2 - Показатели цитопротективной и цитотоксической активности исследованных производных бензолсульфамидов в условиях инфицирования вирусом Коксаки В3 (Nancy) культуры клеток Vero

					
Соединение	R1	R2	CC ₅₀ , (мкМ)	EC ₅₀ (мкМ)	SI
35			>741,8	>247,3	н/а
36			>832,5	>277,5	н/а
37			125,9 ± 25,2	>83,2	н/а
38			652,5 ± 53,9	116,9 ± 26,9	6
39			604,7 ± 44,8	>223,9	н/а
40			140,1 ± 23,3	>77,1	н/а

Продолжение Таблицы A2

					
Соединение	R1	R2	CC ₅₀ , (мкМ)	EC ₅₀ (мкМ)	SI
41			>227,3	2,1 ± 0,3	>111
42			>255,1	2,2 ± 0,2	>117
43			383,3 ± 21,7	239,5 ± 12,5	н/а
44			252,5 ± 15,8	227,3 ± 10,4	н/а
45			531,2 ± 48,4	>211,8	н/а
46			624,7 ± 57,5	>248,2	н/а
47			181,4 ± 19,2	>75,8	н/а

Продолжение Таблицы A2

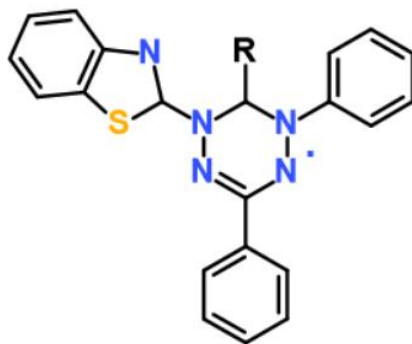
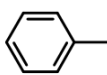
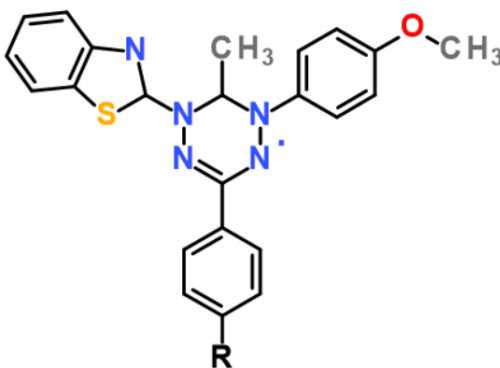
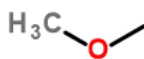
					
Соединение	R1	R2	CC ₅₀ , (мкМ)	EC ₅₀ (мкМ)	SI
48			472,2 ± 38,2	>237,5	н/а
49			39,9 ± 4,1	>24,4	н/а
50			>640,4	>213,6	н/а
51			437,2 ± 35,1	>218,8	н/а
(4-[[4-(1,3-диоксоизоиндولين-2-ил)фенил]сульфониламино]бензойная кислота)			> 236,9	2,1±0,3	>116

Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов, н/а – соединение неактивно

Таблица А3 - Показатели цитопротективной, цитотоксической и вирус-ингибирующей активности вердазилов (вирус Коксаки В3, культура Vero)

Номер соединения	R	Результаты теста на цитопротекцию			Результаты теста на снижение продукции вирусного потомства		
		CC ₅₀ , 72 часа, мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI	CC ₅₀ , 24 часа, мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
52		>184,1	>61,3	н/а	>184,1	>61,3	н/а
53		>203,2	>67,6	н/а	>203,2	>67,6	н/а
54		246,3 ± 24,6	>81,2	н/а	>615	123,2 ± 11,1	>5

Продолжение Таблицы АЗ

Номер соединения	R	Результаты теста на цитопротекцию			Результаты теста на снижение продукции вирусного потомства		
		CC ₅₀ , 72 часа, мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI	CC ₅₀ , 24 часа, мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
							
55	CH ₃	77,7 ± 12,9	>28,9	н/а	>259,1	>85,4	н/а
56		>223,2	>73,7	н/а	>223,2	>73,7	н/а
							
57	Br	>626,3	>208,7	н/а	>208,7	>68,8	н/а
58	Cl	>691,2	>230,4	н/а	>230,4	>76,1	н/а
59	H	>250,2	>82,5	н/а	>250,2	>82,5	н/а
60		>241,5	>79,7	н/а	>241,5	>79,7	н/а

Продолжение Таблицы А3

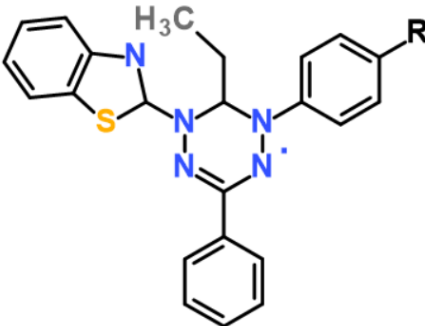
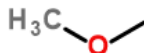
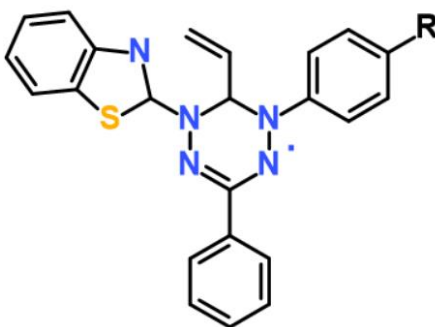
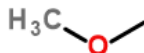
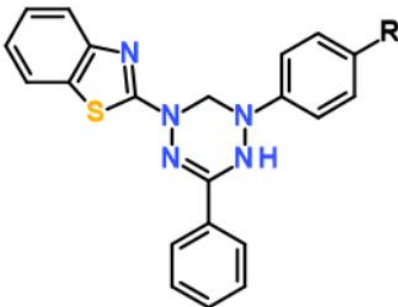
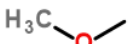
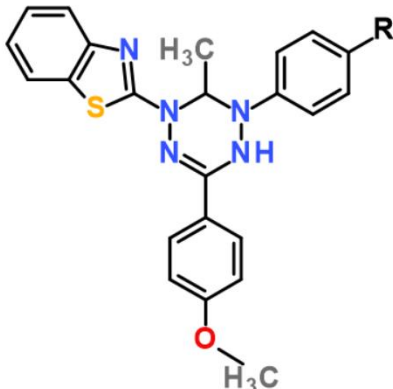
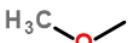
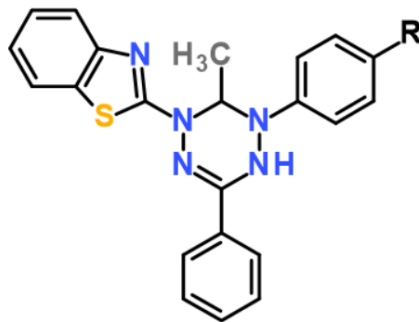
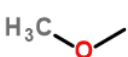
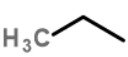
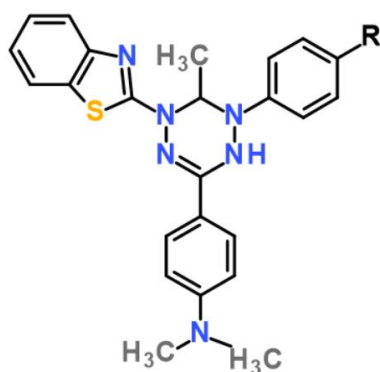
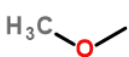
Номер соединения	R	Результаты теста на цитопротекцию			Результаты теста на снижение продукции вирусного потомства		
		CC ₅₀ , 72 часа, мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI	CC ₅₀ , 24 часа, мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
							
61	F	>240,1	>80,2	н/а	>240,1	>80,2	н/а
62		>233,2	>77,7	н/а	>233,2	>77,7	н/а
							
63	F	>724,1	>241,1	н/а	>724,1	>241,1	н/а
64		>234,2	>78,2	н/а	>234,2	>78,2	н/а

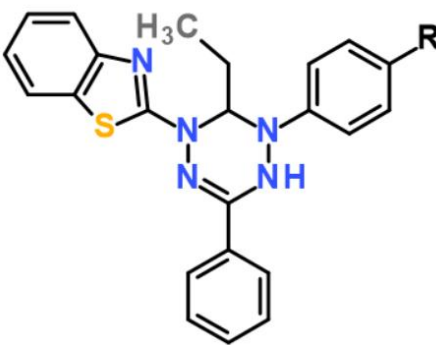
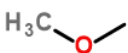
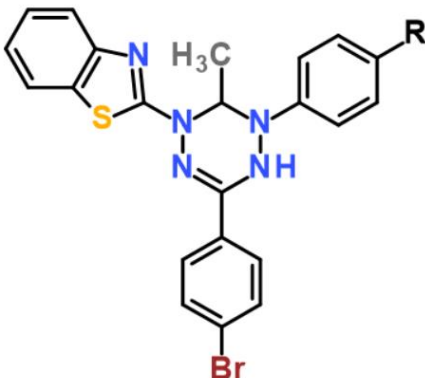
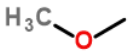
Таблица А4 - Показатели цитопротективной, цитотоксической и вирус-ингибирующей активности лейковердазолов (вирус Коксаки В3, культура Vero)

Номер соединения	R	Результаты теста на цитопротекцию			Результаты теста на снижение продукции вирусного потомства		
		CC ₅₀ , 72 часа, мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI	CC ₅₀ , 24 часа, мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
							
65	H	94,3 ± 8,1	8,8 ± 1,1	11	619,9 ± 52,7	1,8 ± 0,3	>230
66		150,7 ± 20,1	<9	>16	>1347	5,4 ± 0,8	>205
67	F	12,8 ± 2,1	10,1±1,7	н/а	27,4 ± 6,2	3,1 ± 0,2	13
68	Br	8,7 ± 2,1	>6,7	н/а	886,4 ± 90,4	6,2 ± 1,9	142
69	Cl	8,2 ± 2,1	>7,4	н/а	320,9 ± 28,2	7,4 ± 2,2	43
							
70	H	20,2 ± 4,1	>7,5	н/а	>202,0	>60,6	н/а
71		28,5 ± 3,8	>7,04	н/а	>190,4	>57,1	н/а

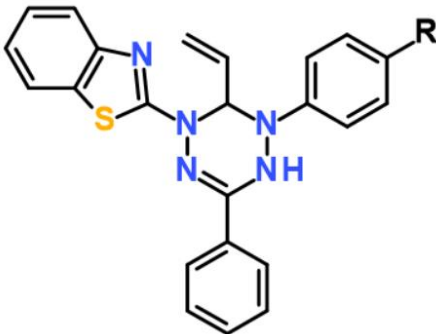
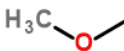
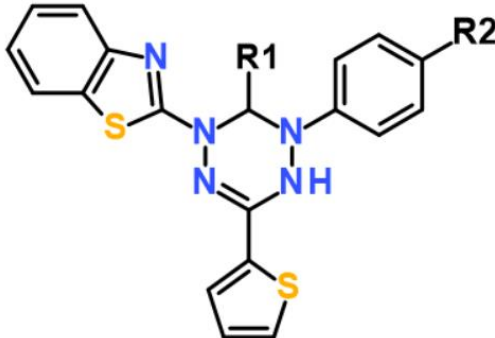
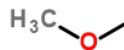
Продолжение Таблицы А4

Номер соединения	R	Результаты теста на цитопротекцию			Результаты теста на снижение продукции вирусного потомства		
		CC ₅₀ , 72 часа, мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI	CC ₅₀ , 24 часа, мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
							
72		12,9 ± 2,5	>9,61	н/а	2048,2 ± 198,5	24,1 ± 3,2	85
73	Br	<6,4	>6,4	н/а	69,1 ± 5,9	>69,1	н/а
74	F	<7,4	>7,4	н/а	49,6 ± 3,7	>49,6	н/а
75		62,9 ± 7,2	>11	н/а	>302,7	>121,1	н/а
76	H	10,3 ± 2,5	>9,6	н/а	>324,7	6,5 ± 0,8	>50
							
77	H	280,3 ± 32,7	>233,6	н/а	>467,3	>233,6	н/а
78		>655,0	>218,3	н/а	>436,6	>218,3	н/а

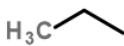
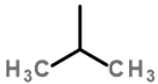
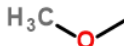
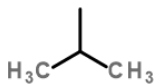
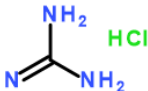
Продолжение Таблицы А4

Номер соединения	R	Результаты теста на цитопротекцию			Результаты теста на снижение продукции вирусного потомства		
		CC ₅₀ , 72 часа, мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI	CC ₅₀ , 24 часа, мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
							
79	H	>757,8	>252,6	н/а	>313,3	>125,3	н/а
80		>751,8	>250,6	н/а	2331,1 ± 25,3	60,1 ± 7,2	>38
81	Br	>627,6	>209,2	н/а	945,5 ± 89,6	>209,6	н/а
82	Cl	>692,8	>230,9	н/а	>250	>100	н/а
83	F	>719,4	>239,8	н/а	359,7 ± 41,7	71,9 ± 6,4	5
							
84	H	17,2 ± 4,3	>7,9	н/а	>539,9	17,5 ± 5,8	>31
85		>608,5	>202,8	н/а	>507,0	26,7 ± 5,8	>19

Продолжение Таблицы А4

Номер соединения	R	Результаты теста на цитопротекцию			Результаты теста на снижение продукции вирусного потомства		
		CC ₅₀ , 72 часа, мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI	EC ₅₀ , мкМ	CC ₅₀ , 72 часа, мкМ	SI
							
86	I	22,9 ± 5,7	>11	н/а	1529,5 ± 17,2	51,6 ± 6,4	29
87		>729,9	>243,3	н/а	>292,7	>117,1	н/а
88	H	<7,5	<7,5	н/а	>314,8	>125,9	н/а
89	Cl	>696,1	>232,0	н/а	>290,7	27,9 ± 3,3	>10
							
90	R1: CH₃, R2: 	>580,2	>193,4	н/а	>241,7	29,6 ± 5,4	>8

Продолжение Таблицы А4

Номер соединения	R	Результаты теста на цитопротекцию			Результаты теста на снижение продукции вирусного потомства		
		CC ₅₀ , 72 часа, мкМ	EC ₅₀ , мкМ	SI	EC ₅₀ , мкМ	CC ₅₀ , 72 часа, мкМ	SI
91	R1: CH ₃ , R2: 	29,8 ± 3,3	>26,2	н/а	>477,3	>238,7	н/а
92	R1: H, R2: 	83,5 ± 7,1	>78,7	н/а	>596,7	>71,5	н/а
93	R1: H, R2: 	>245,7	24,6	>10	>614,3	12,3	>50
94	R1: CH ₃ , R2: 	43,8 ± 5,3	>25,4	н/а	>577,3	>69,3	н/а
95	R1: H, R2: Br	48,4 ± 3,7	>24,2	н/а	>550,6	15,5 ± 2,5	>35
96	R1: CH ₃ , R2: Br	12,8 ± 2,1	>6,4	н/а	>533,0	>63,9	н/а
97	R1: H, R2: I	29,8 ± 3,1	>21,9	н/а	>498,0	>59,8	н/а
98	R1: CH ₃ , R2: I	48,4 ± 3,7	>21,3	н/а	>483,5	>58,1	н/а
Гуанидин гидро-хлорид		>10471,2 0	7732,9 ± 104,7	>14	> 5235,6	495,3 ± 39,8	>10

Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов, н/а – соединение неактивно

ACTCTGGTATCACGGTACCTTTGTGCGCCTGTITTTATACCCCTCCCCAACTGTAACCTTAGAAGTAA
CACACACCGATCAACAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGTTTTGTATCAAGCACTTCTGTTACCCCGGACTGA
GTATCAATAGACTGCTCACGCGTTGAAGGAGAAAGCGTTCGTTATCCGGCCAACTACTTTCGAAAAACCTAG
TAACACCGTGGAAGTTGCAGAGTGTTTCGCTCAGCACTACCCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCA
TTCCCCACGGGCGACCGTGGCGGTGGCTGCGTTGGCGGCCTGCCATGGGGAAACCCATGGGACGCTCTAAT
ACAGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACT
GCGGAGCACACACCCTCAAGCCAGAGGGCAGTGTGTCGTAACGGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTT
GGGTGTCCGTGTTTCATTTTATTCTATACTGGCTGCTTATGGTGACAATTGAGAGATTGTTACCATATAGCTA
TTGGATTGGCCATCCGGTGACCAATAGAGCTATTATATATCTCTTTGTTGGGTTTATACCACTTAGCTTGAAA
GAGGTTAAAAACATTACAATTCATTGTTAAGTTGAATACAGCAAAATGGGAGCTCAAGTATCAACGCAAAAG
CTGGGGCACATGAGACCGGGGCTGAATGCTAGCGGCAATTCATCATTTCACTACACAAATATTAATTATTACA
AGGATGCCGCATCCAACTCAGCCAATCGGCAGGATTTCACTCAAGACCCGGGCAAGTTCACAGAACCAGTAA
AAGATATCATGATTAAATCACTACCAGCTCTCAACTCCCCACAGTAGAGGAGTGCGGATACAGTGACAGGG
CGAGATCAATCACATTAGGTAACCTCCACCATAACGACTCAGGAATGCGCCAACGTGGTGGTGGGCTATGGAG
TATGGCCAGATTATCTAAAGGATAGTGAGGCAACAGCAGAGGACCAACCGACCCAACCAGACGTTGCCACA
TGTAGGTTCTATAACCTTGACTCTGTGCAATGGCAGAAACCTCACCAAGGATGGTGGTGAAGCTGCCCGAT
GCTTTGTCGAACCTAGGACTGTTTGGGCAGAACATGCAGTACCACCTACTTAGGCCGAACCTGGGTATACCGTA
CATGTGCAAGTGCAATTGCATCTAAGTTCACCAAGGATGCTTGCTAGTAGTGTGTGTACCGGAAGCTGAGATG
GGTTGCGCAACGCTAGACAACACCCCATCCAGTGCGAGAATTGCTGGGGGGCGATAGCGCAAAAGAGTTTGC
GGACAAACCGGTTCGCATCCGGGTCCAACAAGTTGGTACAGAGGGTGGTGTATAATGCAGGCATGGGGGTGG
GTGTTGGAAACCTCACCATTTTCCCCACCAATGGATCAACCTACGCACCAATAATAGTGCTACAATTGTGAT
GCCATACCAACAGTGTAACCTATGGATAACATGTTTAGGCATAACAATGTCACCCTAATGGTTATCCCATT
GTACCGCTAGATTACTGCCCTGGGTCCACCACGTACGTCCAATTACGGTCACGATAGCCCCAATGTGTGCCG
AGTACAATGGGTTACGTTTAGCAGGGCACAGGGGCTTACCAACCATGAATACTCCGGGGAGCTGTCAATTC
TGACATCAGACGACTTCCAATCACCATCCGCCATGCCGCAATATGACGTCACACCAGAGATGAGGATACCTG
GTGAGGTGAAAAAATTGATGGAAATAGCTGAGGTTGACTCAGTTGTCCAGTCCAAAATGTTGGAGAGAAG
GTCAACTCTATGGAAGCATACCAGATACCTGTGAGATCCAATGAAGGATCTGGAACGCAAGTATTCGGCTTT
CCACTGCAACCAGGGTACTCGAGTGTTTTTAGTCGGACGCTCCTAGGAGAGATCTTGAACCTATTATACACATT
GGTCAGGCAGCATAAAGCTTACGTTTATGTTCTGTGGTTCGGCCATGGCTACTGGAAAATTCCTTTTGGCATA
CTCACCACCAGGTGCTGGAGCTCCTACAAAAAGGGTTGATGCCATGCTTGGTACTCATGTAATTTGGGACGT
GGGGCTACAATCAAGTTGCGTGCTGTGTATACCCTGGATAAGCCAAACACACTACCGGTWTGTTGCTTCAGA
TGAGTATACCGCAGGGGGTTTTATTACGTGCTGGTATCAAACAAACATAGTGGTCCCAGCGGATGCCCAAAG
CTCCTGTTACATCATGTGTTTTCGTGTCAGCATGCAATGACTTCTCTGTGAGGCTATTGAAGGACACTCCTTTCA
TTTTCGCAGCAAACTTTTTCCAGGGCCCAGTGGAAGACGCGATAACAGCCCGCTATAGGGAGAGTTGCGGATA
CCGTGGGTACAGGGCCAACCAACTCAGAAGCTATACCAGCACTACTGCTGCTGAGACAGGTACACAGCTCAC
AAGTAGTGCCGGGTGACACCATGCAGACAGCCACGTTAAGAAGTACCATTCAAGGTCCGAGTCAACCATAG
AGAAGCTTCCTATGTAGGTGAGCATGCGTGTACTTTACGGAGTATAAAAACTCAGGTGCCAAGCGGTATGCTG
AATGGGTATTAACACCACGACAAGCAGCACAACTTAGGAGAAAAGCTAGAATTCTTTACCTACGTCCGGTTTCG
ACCTGGAGCTGACGTTTGTATATAACAAGTACTCAACAGCCCTCAACCACACAGAACCAAGACGCACAGATCC
TAACACACCAAAATTATGTATGTACCACCAGGTGGACCTGTACCAGATAAAGTTGATTTCATACGTGTGGCAA
CATCTACGAATCCCAGTGTTTGGACCGAGGGAAACGCCCGCGCGCATGTCCATACCGTTTTTGTAGCAT
TGGCAACGCCTATTCAAATTTCTATGACGGATGGTCTGAATTTTCCAGGAACGGAGTTTACGGCATCAACAC
GCTAAACAACATGGGCACGCTATATGCAAGACATGTCAACGCTGGAARCACGGGTCCAATAAAAAGCACCA
TTAGAATCTACTTCAAACCGAAGCATGTCAAAGCGTGGATACCTAGACCACCTAGACTCTGCCRATACGAGA
AGGCAAAGAACGTGAACTTCCRACCCAGCGGAGTTACCACTACTAGGCAAAGCATCACTACAATGACAAAT
ACGGGCGCATTTGGACAACAATCAGGGGCAGTGTATGTGGGGAACTACAGGGTAGTAAATAGACATCTAGC
TACCAGTGCTGACTGGCAAAACTGTGTGTGGGAAAGTTACAACAGAGACCTCTTAGTGAGCACGACCACAGC
ACATGGATGTGATATTATAGCCAGATGTCAAGTGCACAACGGGAGTGTAATTTGTGCGTCCAAAAACAAGCA
CTACCCAATTTTCGTTTGAAGGACCAGGTCTAGTAGAGGTCCAAGAGAGTGAATACTACCCACAGGAGATACCA
ATCCCATGTGCTTTTATGACAGCTGGATTTTCCGAACCAGGTGACTGTGGCGGTATCCTAAGGTGTGAGCATGGT
GTCATTGGCATTGTGACCATGGGGGGTGAAGGCGTGGTTCGGCTTTGCAGACATCCGTGATCTCCTGTGGCTG
GAAGATGATGCAATGGAACAGGGAGTGAAGGACTATGTGGAACAGCTTGGAAATGCATTCGGCTCCGGCTT
TACTAACCAAAATATGTGAGCAAGTCAACCTCCTGAAAGAATCACTAGTGGGTCAAGACTCCATCTTAGAGAA
ATCTCTAAAAAGCCTTAGTTAAGATAAATATCAGCCTTAGTAATTGTGGTGAGGAACCAACGATGACCTGATC
TGTGACTGCCACACTAGCCCTTATCGGTTGTAACCTCGTCCCGTGGCGGTGCTCAAAACAGAAAGGTGTCA
ATATTACGGAATCCCTATGGCTGAACGCCAAAACAATAGCTGGCTTAAGAAATTTACTGAAATGACGAATGC
TTGCAAGGGTATGGAATGGATAGCTGTCAAAATTCAGAAATTCATTGAATGGCTCAAAGTAAAAATTTTGCC

AGAGGTCAGGGAAAAACACGAATTCCTGAACAGACTTAAACAACCTCCCCTTATTAGAAAGTCAGATCGCCAC
 AATCGAGCAGAGCGCGCCATCCCCAAAGTGACCAGGAACAATTATTTTCCAATGTCCAATACTTTGCCCACTA
 TTGCAGAAAGTACGCTCCCTCTACGCAGCTGAAGCAAAGAGGGTGTTCTCCCTTGAGAAGAAGATGAGCAA
 TTACATACAGTTCAAGTCCAAATGCCGTATTGAACCTGTATGTTTGCTCCTGCACGGGAGCCCTGGTGCCGGC
 AAGTCGGTGGAACAACTTAATTGGAAGGTCGCTTGCTGAGAACTCAACAGCTCAGTGTACTGGACGATC
 TATGCCAGAATCCTGATGGGAAAGACGTCTCCTTGTTCTGCCAAATGGTCTCCAGTGTAGATTTTGTACCACC
 CATGGCTGCCCTAGAAGAGAAAGGCATTCTGTTACCTCACCGTTTGTCTTGGCATCGACCAATGSARGATCT
 ATTAATGCTCCAACCGTGTGATAGTAGCAGAGCCTTGCCAAGGAGATTTCACTTTGACATGAACATCGAGGTT
 ATTTCCATGTACAGTCAGAATGGCAAGATAAACATGCCCATGTCAGTCAAGACTTGTGACGATGAGTGTTGC
 CCGGTCAATTTTAAAAAGTGCTGCCCTCTTGTTGTGTGGGAAGGCTATACAATTCATTGATAGAAGAACACAG
 GTCAGATACTCTCTAGACATGCTAGTCACCGAGATGTTTAGGGAGTACAATCATAGACATAGCGTGCGGACC
 ACGCTTGAGGCACTGTTCCAGGGACCACAGTATACAGAGAGATCAAAATTAGCGTTGCACCAGAGACACC
 ACCACCGCCCGCCATTGCGGACCTGCTCAAATCGGTAGACAGTGAGGCTGTGAGGGAGTACTGCAAAGAAA
 AAGGATGGTTGGTTCTGAGATCAACTCCACCCTCCAAATTGAGAAACATGTCAGTCGGGCTTTTCATTTGCTT
 ACAGGCATTGACCACATTTGTGTGCTAGTGCGTGAATCATATATATAATATATAAGCTCTTTGATGAAAAGGA
 ACTCAAGCACGGTGAAAACCTGAATATGGCGAGTTTACCATGCTGGGCATCTATGACAGGTGGGCCGTTTTGC
 CACGCCACGCCAAACCTGGGCCAACCATCTTGATGAATGATCAAGAGGTTGGTGTGCTAGATGCCAAGGAGC
 TAGTAGACAAGGACGGCACCAACTTAGAACTGACACTACTCAAATTGAACCGGAATGAGAAGTTCAGAGAC
 ATCAGAGGCTTCTTAGCCAAGGAGGAAGTGGAGGTTAATGAGGCAGTGCTAGCAATTAACACCAGCAAGTTT
 CCCAACATGTACATTCCAGTAGGACAGGTACAGAATACGGCTTCCTAAACCTAGGTGGCACACCCACCAAG
 AGAATGCTTATGTACAACCTCCCCACAAGAGCAGGCCAGTGTGGTGGAGTGCTCATGTCCACCGGCAAGGTA
 CTGGGTATCCATGTTGGTGGAATGGCCATCAGGGCTTCTCAGCAGCACTCCTCAAACACTACTTCAATGATG
 AGCAAGGTGAAATAGAATTTATTGAGAGCTCAAAGGACGCCGGGTTTCCAGTCATCAACACACCAAGTAAA
 ACAAAGTTGGAGCCTAGTGTTTTCCACCAGGTCTTTGAGGGGAACAAAGAACCAGCAGTACTCAGGAGTGGG
 GATCCACGTCTCAAGGCCAATTTGAAGAGGCTATATTTTCCAAGTATATAGGAAATGTCAACACACACGTG
 GATGAGTACATGCTGGAAGCAGTGGAACCTACGCAGGCCAACTAGCCACCCTAGATATCAGCACTGAACC
 AATGAACTGGAGGACGCAGTGACGGTACCGAGGGTCTTGAGGCGCTTGATCTAACGACGAGTGCCGGTTA
 CCCATATGTTGCTCTGACTTATGTAAAAGATGAGCTCAGGTCCATAGAGAAGGTAGCGAAAGGAAAGTCTAG
 GCTGATTGAGGCGTCCAGTTTGAATGATTGAGTGCGATGAGACAGACATTTGGTAATCTGTACAAAACCTT
 CCACCTAAACCCAGGGGTTGTGACTGGTAGTGCTGTTGGGTGTGACCCAGACCTCTTTTGGAGCAAGATACC
 AGTGATGTTAGATGGACATCTCATAGCATTTGATTACTCTGGGTACGATGCTAGCTTAAGCCCTGTCTGGTTT
 GCTTGCCTAAAAATGTTACTTGAGAAGCTTGATACACGCACAAAGAGACAAACTACATTGACTACTTGTGC
 AACTCCCATCACCTGTACAGGGATAAACATTACTTTGTGAGGGGTGGCATGCCCTCGGGATGTTCTGGTACC
 AGTATTTTCAACTCAATGATTAACAATATCATAATTAGGACACTAATGCTAAAAGTGTACAAAGGGATTGAC
 TTGGACCAATTCAGGATGATCGCATATGGTGATGATGTGATCGCATCGTACCCATGGCCTATAGATGCATCTT
 TACTCGCTGAAGCTGGTAAGGGTTACGGGCTGATCATGACACCAGCAGATAAGGGAGAGTGCTTTAACGAA
 GTTACCTGGACCAACGTCACTTTCCTAAAGAGGTATTTTAGAGCAGATGAACAGTACCCCTTCCTGGTGCATC
 CTGTTATGCCCATGAAAGACATACACGAATCAATTAGATGGACCAAGGATCCAAAGAACACCCAAGATCAC
 GTGCGCTCACTGTGTCTATTAGCTTGGCATAACGGGGAGCACGAATATGAGGAGTTCATCCGTAATAATTAGA
 AGCGTCCCAGTCGGACGTTGTTTGACCCTCCCCGCGTTTTCAACTCTACGCAGGAAGTGGTTGGACTCCTTTT

ПРИЛОЖЕНИЕ В. Пространственное расположение аминокислотных остатков, подвергшихся замене при выработке устойчивости к соединению 32

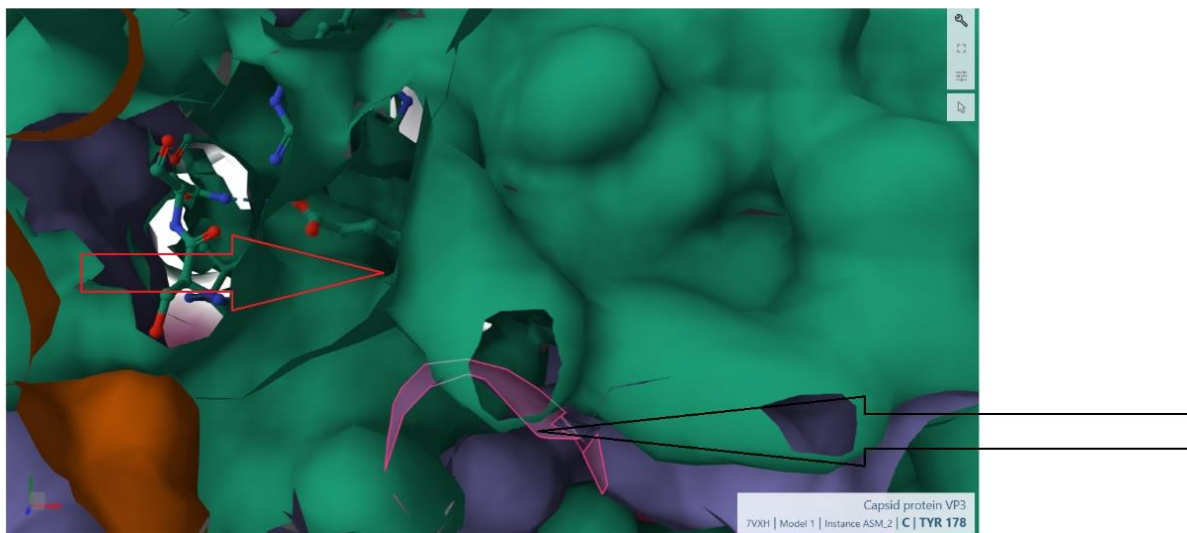


Рисунок В1 – Пространственное расположение аминокислоты тирозин в положении 178 белка VP3 вируса Коксаки В3. Красной стрелкой обозначен карман VP1, черной стрелкой - положение тирозин 178. PDB ID: 7VXH [144].

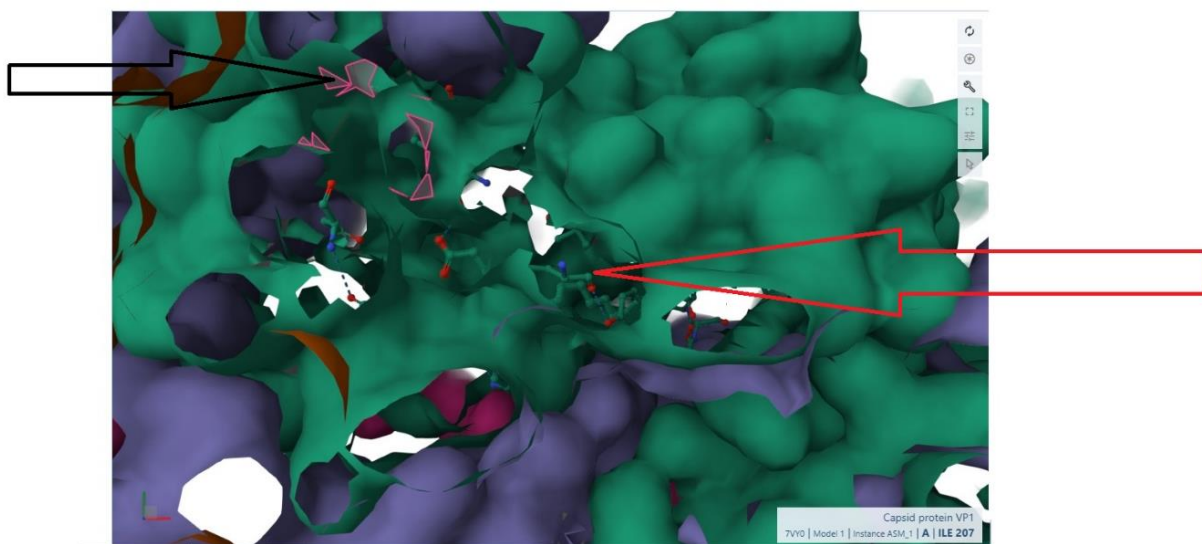
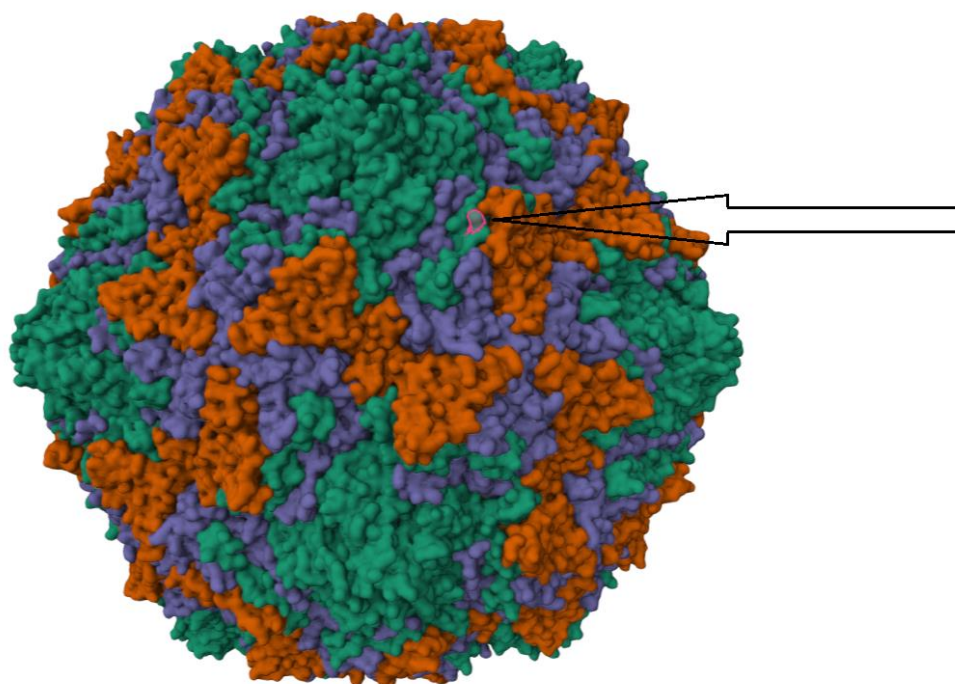
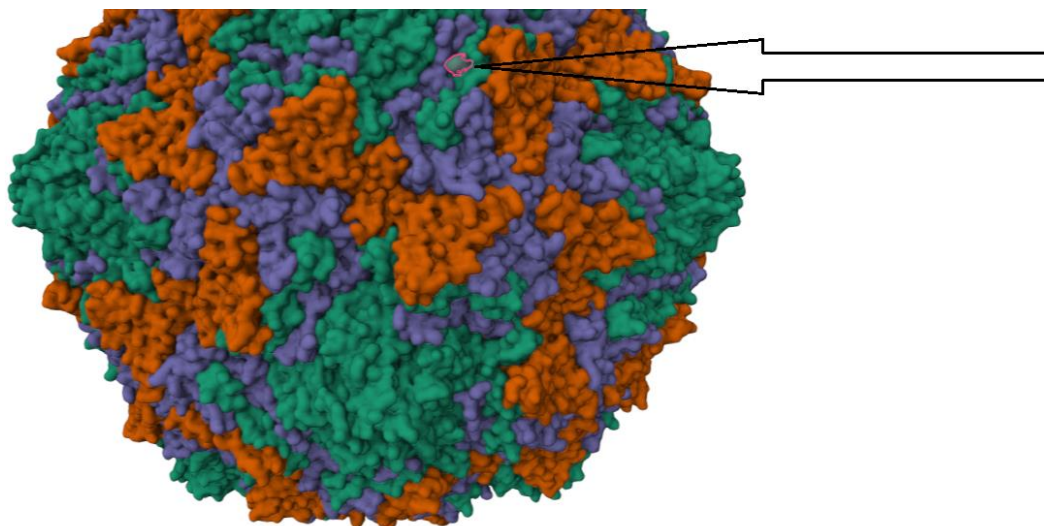


Рисунок В2 – Пространственное расположение аминокислоты изолейцин в положении 207 белка VP1 вируса Коксаки В3. Красной стрелкой обозначен карман VP1, черной стрелкой – изолейцин в позиции 207. PDB ID: 7VXH [144].



Capsid protein VP1
7VXH | Model 1 | Instance ASM_21 | A | **GLN 264**

Рисунок В3 – Пространственное расположение аминокислоты глутамин в положении 264 белка VP1 вируса Коксаки В3 (черная стрелка, розовый контур). PDB ID: 7VXH [144].



Capsid protein VP1
7VXH | Model 1 | Instance ASM_21 | A | **GLN 254**

Рисунок В4 – Пространственное расположение аминокислоты глутамин в положении 254 белка VP1 вируса Коксаки В3 (черная стрелка, розовый контур). PDB ID: 7VXH [144].

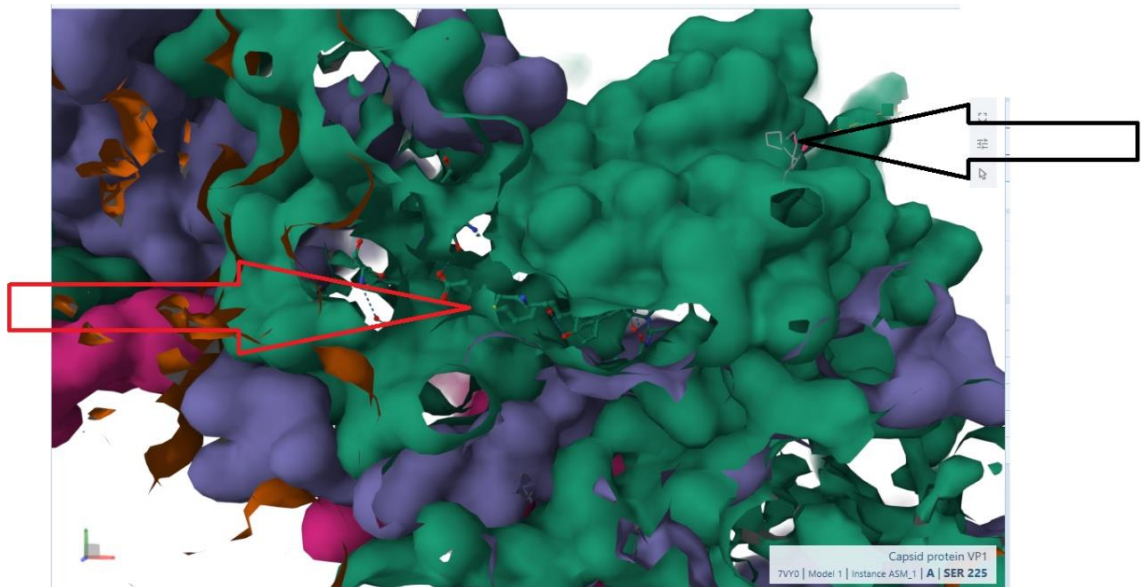


Рисунок В5 – Пространственное расположение аминокислоты серин в положении 225 белка VP1 вируса Коксаки В3. Красной стрелкой обозначен карман VP1, черной стрелкой - серин в позиции 225. PDB ID: 7VXH [144].

**ПРИЛОЖЕНИЕ Г. Последовательности геномов вирусов рода *Enterovirus*,
использованные для построения консенсусов вирусного полипептида**

Таблица Г1 - ID базы данных Genbank последовательностей, использованных для построения консенсусов вирусного полипептида

HRV14	ECHO30	CVA16	CVA21	CVB5	CVB4	CVB3	ECHO3
QYI877 84.1	QGI7948 1.1	AXG50 777.1	AXF507 37.1	WGZ82 020.1	WDE31 171.1	QQL137 23.1	AXH81 619.1
QEG03 824.1	QGI7947 9.1	SCQ056 81.1	ANQ44 601.1	WGZ82 019.1	WDE31 175.1	QQL137 26.1	AVI009 94.1
NP_041 009.1	XLM245 66.1	SCQ056 63.1	WPN77 736.1	WGZ82 018.1	WDE31 177.1	UWT50 258.1	ACX33 135.1
K02121 .1	WHA313 07.1	SCQ056 61.1	WPN77 721.1	WGZ82 017.1	WDE31 188.1	WGU13 658.1	
AAA45 758.1	WHA312 90.1	SCQ056 59.1	WPN77 704.1	WGZ82 016.1	WDE31 198.1	WHA31 332.1	
	WBW30 773.1	WDD41 331.1	UPX083 74.1	WGZ82 015.1	XDE911 19.1	WLE88 280.1	
	WBY692 52.1	SCQ056 57.1	ABM54 539.1	WGZ82 014.1	XDE911 20.1	XCO530 32.1	
	WAK986 98.1	UQT18 852.1	ABM54 537.1	WGZ82 013.1	XDE911 21.1	XDE911 31.1	
	UWT502 60.1	UYS982 34.1	BAA00 426.1	WGZ82 012.1	XDE911 22.1	ACJ053 89.1	
	UPN623 23.1	UYS98 230.1	AAQ02 684.1	WGZ82 011.1	XDE911 24.1	AAA42 931.1	
	UKH515 08.1	UYS982 27.1		WBW48 328.1	XHM70 553.1	AAG23 918.1	
	QTX154 23.1	UYS982 24.1		WBW48 327.1	XHM70 559.1	AHK09 954.1	
	QQP235 45.1	UYS98 216.1		WBW48 326.1	XDE911 23.1	AAG23 920.1	
	AMD825 45.1	QWX10 104.1		WBW48 325.1		AAB022 28.1	
	QFP4117 5.1	QWX10 039.1		WBW48 323.1		ACS347 58.1	
	QFP4117 1.1	QSH718 29.1		WGZ82 022.1		AGJ727 50.1	
	QFP4116 5.1	QSH718 19.1		WBW48 321.1		UPI4152 3.1	

**ПРИЛОЖЕНИЕ Д. Нуклеотидная последовательность вируса Коксаки В3,
Nancy, резистентного к соединению 65**

GATCCACCCACAGGGCCCATTTGGGCGCTAGCACTCTGGTATCACGGTACCTTTGTGCGCCTGTTTTA
TACCCCTCCCCCAACTGTAACCTAGAAGTAACACACACCGATCAACAGTCAGCGTGGCACACCAGCCACGT
TTTGATCAAGCACTTCTGTACCCCGGACTGAGTATCAATAGACTGCTCACGCGGTTGAAGGAGAAAGCGTT
CGTTATCCGGCCAACTACTTCGAAAAACCTAGTAACACCGTGGAAGTTGCAGAGTGTTCGCTCAGCACTAC
CCCAGTGTAGATCAGGTCGATGAGTCACCGCATTCCCACGGGCGACCGTGGCGGTGGCTGCGTTGGCGGCC
TGCCCATGGGGAAACCCATGGGACGCTCTAATACAGACATGGTGCGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGGTAGT
CCTCCGGCCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACTGCGGAGCACACACCCTCAAGCCAGAGGGCAGTGTGTCGTA
ACGGGCAACTCTGCAGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCATTTTATTCTATACTGGCTGCTTAT
GGTGACAATTGAGAGATTGTTACCATATAGCTATTGGATTGGCCATCCGGTGACCAATAGAGCTATTATATAT
CTCTTTGTTGGGTTTATACCACTTAGCTTGAAAGAGGTTAAACATTACAATTCAATTGTTAAGTTGAATACAG
CAAAATGGGAGCTCAAGTATCAACGCAAAAGACTGGGGCACATGAGACCGGGCTGAATGCTAGCGGCAATT
CCATCATCTACTACACAAATATTAATTATTACAAGGATGCCGCATCCAACCTCAGCCAATCGGCAGGATTTAC
TCAAGACCCGGGCAAGTTCACAGAACCAGTAAAAGATATCATGATTAATCACTACCAGCTCTCAACTCCCC
CACAGTAGAGGAGTGC GGATACAGTGACAGGGCGAGATCAATCACATTAGGTAACCTACCACATAACGACTC
AGGAATGCGCCAACGTGGTGGTGGGCTATGGAGTATGGCCAGATTATCTAAAGGATAGTGAGGCAACAGCA
GAGGACCAACCGACCCAACCAGACGTTGCCACATGTAGGTTCTATAACCCTTGACTCTGTGCAATGGCAGAAA
ACCTCACCAGGATGGTGGTGGAAAGCTGCCCCGATGCTTTGTCGAACTTAGGACTGTTTGGGCAGAACATGCAG
TACCACTACTTAGGCCGAACCTGGGTATACCGTACATGTGCAGTGCAATGCATCTAAGTTCCACCAAGGATGC
TTGCTAGTAGTGTGTGTACCGGAAGCTGAGATGGGTGCGCAACGCTAGACAACACCCCATCCAGTGCAGAA
TTGCTGGGGGGCGATAGCGCAAAAGAGTTTGGCGACAACCGGTGCGATCCGGGTCCAACAAGTTGGTACA
GAGGGTGGTGTATAATGCAGGCATGGGGGTGGGTGTTGGAAACCTCACCATTTTCCCCACCAATGGATCAA
CCTACGCACCAATAATAGTGCTACAATTGTGATGCCATACCAACAGTGTACCTATGGATAACATGTTTAG
GCATAACAATGTCAACCTAATGGTTATCCCATTTGTACCGCTAGATTACTGCCCTGGGTCCACCACGTACGTC
CCAATTACGGTCACGATAGCCCCAATGTGTGCCGAGTACAATGGGTACGTTTAGCAGGGCACCAGGGGCTTA
CCAACCATGAATACTCCGGGGAGCTGTCAATTTCTGACATCAGACGACTTCCAATCACCATCCGCCATGCCG
CAATATGACGTCACACCAGAGATGAGGATACCTGGTGAGGTGAAAACTTGATGGAAATAGCTGAGGTTGA
CTCAGTTGTCCAGTCCAAAATGTTGGAGAGAAGGTCAACTCTATGGAAGCATACCAGATACCTGTGAGATC
CAATGAAGGATCTGGAACGCAAGTATTCGGCTTTCCACTGCAACCAGGGTACTCGAGTGTTTTTAGTCGGAC
GCTCCTAGGAGAGATCTTGAACATTTATACACATTGGTCAGGCAGCATAAAGCTTACGTTTATGTTCTGTGGT
TCGGCCATGGCTACTGGAAAATTCCTTTTGGCATACTCACCACCAGGTGCTGGAGCTCCTACAAAAGGGTT
GATGCCATGCTTGGTACTCATGTAAATTTGGGACGTGGGGGTACAATCAAGTTGCGTGCTGTGTATACCCTGGA
TAAGCCAAACACACTACCGGTATGTTGCTTCAGATGAGTATACCGCAGGGGGTTTTATTACGTGCTGGTATGA
AACAACATAGTGTTCCAGCGGATGCCCAAGCTCCTGTTACATCATGTGTTCTGTGTCAGCATGCAATGA
CTTCTCTGTCAAGCTATTGAAGGACACTCCTTTTCATTTGCGAGCAAACTTTTCCAGGGCCCCAGTGGAAGAC
GCGATAACAGCCGCTATAGGGAGAGTTGCGGATACCGTGGGTACAGGGGCCAACCAACTCAGAAGCTATACC
AGCACTCACTGCTGCTGAGACAGGTACACGTCACAAGTAGTGCCGGGTGACACCATGCAGACACGCCACGT
TAAGAACTACCATCAAGGTCCGAGTCAACCATAGAGAACTTCCTATGTAGGTGAGCATGCGTGTACTTTAC
GGAGTATAAAAACTCAGGTGCCAAGCGGTATGCTGAATGGGTATTAACACCACGACAAGCAGCACAACTTA
GGAGAAAGCTAGAATTTCTTACCTACGTCCGGTTCGACCTGGAGCTGACGTTTGTGATAACAAGTACTCAAC
AGCCCTCAACCACACAGAACCAAGACGCACAGATCCTAACACACCAAAATTATGTATGTACCACCAGGTGGAC
CTGTACCAGATAAAGTTGATTACATACGTGTGGCAAACATCTACGAATCCAGTGTGTTTTGGACCGAGGGAA
ACGCCCCGCGCGCATGTCCATACCGTTTTTGGAGCATTGGCAACGCCTATTCAAATTTCTATGACGGATGGTC
TGAATTTTCCAGGAACGGAGTTTACGGCATCAACACGCTAAACAACATGGGCACGCTATATGCAAGACATGT
CAACGCTGGAAGCACGGGTCCAATAAAAAGCACCATTAGAATCTACTTCAAACCGAAGCATGTCAAAGCGT
GGATACCTAGACCACCTAGACTCTGCCAATACGAGAAGGCAAAGAAGCTGAACCTCCGACCCAGCGGAGTT
ACCACTACTAGGCAAAGCATCACTACAATGACAAATACGGGCGCATTTGGACAACAATCAGGGGCAGTGTA
TGTGGGGAACCTACAGGGTAGTAAATAGACATCTAGCTACCAGTGCTGACTGGCAAACTGTGTGTGGGAAA
GTTACAACAGAGACCTCTTAGTGAGCACGACCACAGCACATGGATGTGATATTATAGCCAGATGTCAGTGCA
CAACGGGAGTGTACTTTTGTGCGTCCAAAAACAAGCACTACCCAATTTTCGTTTGAAGGACCAGGTCTAGTAG
AGGTCCAAGAGAGTGAATACTACCCAGGAGATACCAATCCCATGTGCTTTTAGCAGCTGGATTTCCGAAC
CAGGTGACTGTGGCGGTATCCTAAGGTGTGAGCATGGTGTCAATTGGCATTGTGACCATGGGGGGTGAAGGCG
TGGTCCGCTTTGCAGACATCCGTGATCTCCTGTGGCTGGAAGATGATGCAATGGAACAGGGAGTGAAGGACT
ATGTGGAACAGCTTGGAATGCATTCCGGCTCCGGCTTTACTAACCAAAATATGTGAGCAAGTCAACCTCCTGA
AAGAATCACTAGTGGGTCAAGACTCCATCTTAGAGAAATCTCTAAAAGCCTTAGTTAAGATAATATCAGCCT
TAGTAATTGTGGTGAAGAACACGATGACCTGATCACTGTGACTGCCACACTAGCCCTTATCGGTTGTACCTC
GTCCCCGTGGCGGTGGCTCAAACAGAGAAGGTGTCAACAATTACGGAATCCCTATGGCTGAACGCCAAAACAA
TAGCTGGCTTAAGAAATTTACTGAAATGACGAATGCTTGCAAGGGTATGGAATGGATAGCTGTCAAAATTCA
GAAATTCATTGAATGGCTCAAAGTAAAAATTTTGCCAGAGGTGAGGAAAAACACGAATTCCTGAACAGACT
TAAACAACCTCCCCTTATTAGAAAGTCAGATCGCCACAATCGAGCAGAGCGCGCCATCCCAAAGTGACCAGGA

ACAATTATTTTCCAATGTCCAATACTTTGCCCACTATTGCAGAAAGTACGCTCCCCTCTACGCAGCTGAAGCA
 AAGAGGGTGTTCTCCCTTGAGAAGAAGATGA~~K~~CAATTACATACAGTTCAAGTCCAAATGCCGTATTGAACCT
 GTATGTTTGCTCCTGCACGGGAGCCCTGGTGCCGGCAAGTCGGTGGCAACAACTTAATTGGAAGGTCGCTT
 GCTGAGAACTCAACAGCTCAGTGTACTCACTACCGCCAGACCCAGATCACTTCGACGGATACAAACAGCAG
 GCCGTGGTGATTATGGACGATCTATGCCAGAATCCTGATGGGAAAGACGTCTCCTTGTTCTGCCAAATGGTCT
 CCAGTGTAGATTTTGTACCACCCATGGCTGCCCTAGAAGAGAAAGGCATTCTGTTACCTCACCGTTTGTCTT
 GGCATCGACCAATGCAGGATCTATTAATGCTCCAACCGTGTGAGATAGCAGAGCCTTGGCAAGGAGATTTC
 CTTTGACATGAACATCGAAGTTATTTCCATGTACAGTCAGAATGGCAAGATAAACATGCCCATGTCAGTCAA
 GACTTGTGACGATGAGTGTTGCCCGGTCAATTTTAAAAAGTGCTGCCCTCTTGTTGTGGGAAGGCTATACAA
 TTCATTGATAGAAGAACACAGGTCAGATACTCTCTAGACATGCTAGTCACCGAGATGTTTAGGGAGTACAAT
 CATAGAC~~R~~TAGCGTGGGGACCACGCTTGAGGCACTGTTCCAGGGACCACCAGTATACAGAGAGATCAAAAT
 TAGCGTTGCACCAGAGACACCACCACCGCCCGCCATTGCGGACCTGCTCAAATCGGTAGACAGTGAGGCTGT
 GAGGGAGTACTGCAAAGAAAAAGGATGGTTGGTTCCTGAGATCAACTCCACCCTCCAAATTGAGAAACATGT
 CAGTCGGGCTTTTCATTTGCTTACAGGCATTGACCACATTTGTGTGTCAGTGGCTGGAATCATATATATAATAT
 AAGCTCTTTGCGGGTTTTCAAGGTGCTTATACAGGAGTGCCCAACCAGAAGCCCAGAGTGCCTACCCTGAGG
 CAAGCAAAAGTGCAAGGCCCTGCCTTTGAGTTCGCCGTCGCAATGATGAAAAGGAACTCAAGCACGGTGAA
 AACTGAATATGGCGAGTTTACCATGCTGGGCATCTATGACAGGTGGGCCGTTTTGCCACGCCACGCCAAACC
 TGGGCCAACCATCTTGATGAATGATCAAGAGGTTGGTGTGCTAGATGCCAAGGAGCTAGTAGACAAGGACG
 GCACCAACTTAGAACTGACACTACTCAAATTGAACCGGAATGAGAAGTTCAGAGACATCAGAGGCTTCTTAG
 CCAAGGAGGAAGTGGAGGTTAATGAGGCAGTGCTAGCAATTAACACCAGCAAGTTTCCCAACATGTACATTC
 CAGTAGGACAGGTCACAGAATACGGCTTCCTAAACCTAGGTGGCACACCCACCAAGAGAATGCTTATGTACA
 ACTTCCCCACAAGAGCAGGCCAGTGTGGTGGAGTGCTCATGTCCACCGGCAAGGTACTGGGTATCCATGTTG
 GTGGAAATGGCCATCAGGGCTTCTCAGCAGCACTCCTCAAACACTACTTCAATGATGAGCAAGGTGAAATAG
 AATTTATTGAGAGCTCAAAGGACGCCGGGTTTCCAGTCATCAACACACCAAGTAAAAACAAAGTTGGAGCCTA
 GTGTTTTCCACCAGGTCTTTGAGGGGAACAAAGAACCAGCAGTACTCAGGAGTGGGGATCCACGTCTCAAGG
 CCAATTTTGAAGAGGCTATATTTTCCAAGTATATAGGAAATGTCAACACACACGTGGATGAGTACATGCTGG
 AAGCAGTGGACCACTACGCAGGCCAACTAGCCACCCTAGATATCAGCACTGAACCAATGAACTGGAGGAC
 GCAGTGTACGGTACCGAGGGTCTTGAGGCGCTTGATCTAACGACGAGTGCCGGTTACCCATATGTTGCACTG
 GGTATCAAGAAGAGGGACATCCTCTCTAAGAAGACTAAGGACCTAACAAAGTTAAAGGAATGTATGGACAA
 GTATGGCCTGAACCTACCAATGGTGACTTATGTAAAAGATGAGCTCAGGTCCATAGAGAAGGTAGCGAAAG
 GAAAGTCTAGGCTGATTGAGGCGTCCAGTTTGAATGATTGAGTGGCGATGAGACAGACATTTGGTAATCTGT
 ACAAAACTTTCCACCTAAACCCAGGGGTTGTGACTGGTAGTGCTGTTGGGTGTGACCCAGACCTCTTTTGGAG
 CAAGATACCAGTGATGTTAGATGGACATCTCATAGCATTTGATTACTCTGGGTACGATGCTAGCTTAAGCCCT
 GTCTGTTTTGCTTGCCTAAAAATGTTACTTGAGAAGCTTGATACACGCACAAAGAGACAAACTACATTGAC
 TACTTGTGCAACTCCCATCACCTGTACAGGGATAAACATTACTTTGTGAGGGGTGGCATGCCCTCGGGATGTT
 CTGGTACCAGTATTTTCAACTCAATGATTAACAATATCATAATTAGGACACTAATGCTAAAAAGTGACAAAG
 GGATTGACTTGGACCAATTCAGGATGATCGCATATGGTGATGATGTGATCGCATCGTACCCATGGCCTATAG
 ATGCATCTTTACTCGCTGAAGCTGGTAAGGGTTACGGGCTGATCATGACACCAGCAGATAAGGGAGAGTGCT
 TTAACGAAGTTACCTGGACCAACGTCACCTTTCTAAAGAGGTATTTTAGAGCAGATGAACAGTACCCCTTCCT
 GGTGCATCCTGTTATGCCCATGAAAGACATACACGAATCAATTAGATGGACCAAGGATCCAAAGAACACCCA
 AGATCACGTGCGCTCACTGTGTCTATTAGCTTGGCATAACGGGGAGCACGAATATGAGGAGTTCATCCGTAA
 AATTAGAAGCGTCCAGTCGGACGTTGTTTGACCCTCCCCGCGTTTTCAACTCTACGCAGGAAGTGGTTGGAC
 TCCTTTTA