

Волобуева Александрина Сергеевна

**ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ
ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ
РОДА *ENTEROVIRUS***

1.5.10. Вирусология

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург - 2025

Работа выполнена 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.

Научный руководитель:

Зарубаев Владимир Викторович - доктор биологических наук.

Официальные оппоненты:

Ленёва Ирина Анатольевна – доктор биологических наук, заведующий лабораторией экспериментальной вирусологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Голицына Людмила Николаевна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций, руководитель референс-центра по мониторингу за энтеровирусными инфекциями Федерального бюджетного учреждения науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Защита состоится «__» _____ 2025 года в _____ час. на заседании диссертационного совета 24.1.255.01 на базе Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П.Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, город Москва, поселение Московский, вн.тер.г. муниципальный округ Филimonковский, посёлок Института полиомиелита, дом 8, корпус 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П.Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, город Москва, поселение Московский, вн.тер.г. муниципальный округ Филimonковский, посёлок Института полиомиелита, дом 8, корпус 1 и на сайте: <http://chumakovs.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2025 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Белякова Алла Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. 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 иммунокорригирующих, патогенетических и симптоматических средств. Пациенты с поражением нервной системы и других органов, а также дети до 7 лет (при вспышках ЭВИ) подлежат госпитализации. 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. 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. 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. 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). 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 (в 1990-х г.г.), 4 – (диметиламино)-бензойная кислота (в 2019 году), позже были синтезированы их производные. Был изучен механизм их действия, и было установлено, что соединения этих групп являются капсид-связывающими агентами. Производные 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. ЭВИ 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. Таким образом, использование антиоксидантов либо в качестве 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 (лейковердазилов), 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 мутацией в белке 2С. Впервые показано, что штамм, резистентный к соединению-лидеру из группы лейковердазилов,

несущий аминокислотные замены в вирусном белке 2C (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 2C, 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 полного цикла 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)сульфамойл)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 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).

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 паспортам научной специальности

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Вирусы, клетки, исследуемые соединения

В исследовании использовали вирусы из коллекции вирусных штаммов ФБУН «НИИЭМ им. Пастера»: вирус Коксаки В3, штамм Nancy, риновирус 14 типа, вирус Коксаки В4 (GenBank: PV567714); Коксаки В5 (GenBank: OQ939946); Коксаки А16 (Genbank: PV567713); Коксаки А21 (GenBank: KR185976); ECHO3; ECHO30 (GenBank: KU841456.1); культуры клеток Vero (ATCC CCL-81), RD (ATCC CCL-136), MRC5 (ATCC CCL-171) культивировали при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO₂ с использованием ростовой питательной среды альфа-МЕМ и RPMI-1640 (Биолот, Россия) с добавлением 4 мМ L-глутамина, 5 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США) и антибиотика пенициллин/стрептомицин (Gibco, США). В экспериментах с вирусом проводили замену ростовой питательной среды на поддерживающую бессывороточную среду с добавлением антибиотика пенициллина/стрептомицина (Gibco, США). Инфекционный титр вируса определяли методом титрования по конечной точке (метод предельных серийных разведений). Титр вируса рассчитывали по методу Спирмена-Кэрбера и выражали в логарифмах числа 50 %-ных цитопатических доз (lgТЦД₅₀). Библиотеки химических соединений были синтезированы в ЦТФТ им. М.В. Дорогова ЯГПУ им. К.Д. Ушинского (производные бензолсульфамидов), Институте органического синтеза УрО РАН им. И.Я. Постовского (лейковердазилы и вердазилы), ФИЦ Биотехнологии РАН (аналоги плеконарила). Соединения были получены в виде порошков, навески которых растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) для получения маточного раствора с концентрацией 20 мг/мл.

Оценка цитотоксичности исследуемых соединений

Цитотоксичность исследуемых соединений исследовали при помощи методики метилтетразолиевого теста (МТТ). Определение цитотоксической концентрации, вызывающей потерю жизнеспособности 50 % клеток (CC₅₀), осуществляли при помощи программы GraphPad Prism 8.0 путем анализа нелинейной регрессии (4-параметрической логистической кривой).

Оценка цитопротективной активности исследуемых соединений

В лунки 96-луночных планшетов с монослоем клеток Vero 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 % и 36 °С в течение 30 мин, во все лунки планшета кроме лунок контроля клеток вносили по 100 мкл вируса Коксаки В3 (Nancy) (m.o.i. 0,01) в поддерживающей среде. Планшеты инкубировали в атмосфере 5 % CO₂ при 36 °С в течение 72 ч. По окончании инкубации определяли жизнеспособность клеток при помощи МТТ. Расчет эффективной концентрации, подавляющей цитопатическое действие вируса на 50 % (EC₅₀), проводили в программе GraphPad Prism 8.0 путем анализа нелинейной регрессии. Для каждого вещества рассчитывали индекс селективности (SI) – отношение CC₅₀ в точке 72 часа к EC₅₀.

Изучение вирус-ингибирующего действия соединений-лидеров

За 1 час до инфицирования вирусом в лунки 24 -луночного планшета с монослоем клеточной культуры 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 удаляли 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 чего определяли инфекционный титр вирусного потомства методом предельных серийных разведений. Определение концентрации, вызывающей ингибирование вирусной активности на 50 % (IC₅₀), осуществляли в программе GraphPad Prism 8.0 путем анализа нелинейной регрессии. 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.

Тест на термостабильность вирусного капсида

Вirus Коксаки В5 (10⁵ ТЦД₅₀) предварительно инкубировали с исследуемыми соединениями или с поддерживающей средой с добавлением 1% ДМСО (контроль вируса) в течение 30 минут при +37 °С. Полученную суспензию вируса вносили в стерильные 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). Определяли инфекционный титр вируса при каждой температуре нагревания методом титрования по конечной точке.

Тест на время добавления соединений-лидеров

В отдельные лунки 24-лучного планшета с монослоем клеток Vero вносили исследуемые соединения в следующие временные точки: -2 – 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, затем в точке 0 вирус удаляли, промывали планшеты чистой поддерживающей средой и помещали планшет в CO₂-инкубатор при +36 °С. Через 8 часов после завершения сорбции вируса определяли инфекционный титр вирусного потомства в каждой лунке методом титрования по конечной точке в клетках Vero.

Селекция устойчивых штаммов вируса Коксаки В3

Вirus Коксаки В3 (штамм Nancy) серийно пассировали в клетках Vero в присутствии увеличивающихся концентраций соединений-лидеров. В качестве контроля использовали вирус, который серийно пассировали такое же количество раз в клетках Vero в отсутствие исследуемого соединения.

Оценка бляшкообразования

В 6-луночные планшеты с монослоем клеток Vero вносили серийные разведения вирусов. После окончания сорбции в лунки планшета вносили по 3 мл 0,3% раствора агарозы в поддерживающей среде и выдерживали планшеты при 5 % CO₂ и 36 °С 72 ч, затем после фиксации клеток 10% раствором нейтрального забуференного формалина и окрашивания 0,1 % раствором кристаллического фиолетового определяли площадь бляшек с использованием прибора Cytation 5.

Картирование мутаций резистентности

Из вирусосодержащего материала экстрагировали РНК (набор «РИБО-преп» (АмплиСенс, Россия)) и после обратной транскрипции (набор MMLV RT (Евроген, Россия)) амплифицировали кДНК в виде фрагментов, перекрывающих весь геном вируса (набор Tersus Plus PCR kit (Евроген, Россия)). После очистки ПЦР-фрагментов (набор Cleanup Standard (Евроген, Россия)) проводили определение нуклеотидной последовательности ПЦР-фрагментов по методу Сэнгера (анализатор

ABI-3500 XL Genetic Analyser (Thermo Fisher Scientific®, UK), полимер 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). Файлы хроматограмм выравнивали относительно референсной последовательности генома вируса Коксаки В3, штамм Nancy (GenBank: M16572.1). Трансляцию нуклеотидных последовательностей проводили с помощью онлайн ресурса ExPASy. Сравнение аминокислотных последовательностей выполняли с использованием онлайн ресурса Clustal Omega.

Оценка динамики роста вирусных штаммов

В лунки 6-луночного планшета с монослоем клеток Vero вносили исследуемые соединения или поддерживающую питательную среду с добавлением 1% ДМСО. Через 1 час вносили исследуемые штаммы вирусов (резистентный или контрольный), выровненные по инфицирующей дозе (m.o.i 0,01). После этапа сорбции отмывали не связавшийся вирус и поверхность монослоя клеток заливали по 3 мл исследуемых соединений или поддерживающей питательной среды с добавлением 1% ДМСО (временная точка 0 часов). Отбирали образцы супернатанта во временные точки 0, 8, 10, 24 часа. Определяли инфекционный титр вирусного потомства в каждой временной точке методом титрования по конечной точке. Идентичность штаммов вируса после культивирования в течение 24 часов проверяли с помощью секвенирования методом Сэнгера.

Оценка противовирусной активности соединений в опытах *in vivo*

В экспериментах по оптимизации модели энтеровирусного панкреатита у мышей линии BALB/c участвовали самки (возраст животных 6-8 недель) и самцы (возраст животных 6-8 недель и 4-5 недель). Животным вводили вирус Коксаки В5 (6×10^6 ТЦД₅₀/200 мкл) внутрибрюшинно, через 3 суток их умерщвляли путем цервикальной дислокации, определяли инфекционный титр вируса в гомогенатах поджелудочной железы. Для исследования динамики репродукции вируса Коксаки В5 в поджелудочной железе самцов мышей BALB/c (возраст 4-5 недель) заражали внутрибрюшинно вирусом Коксаки В5 (6×10^6 ТЦД₅₀/200 мкл). На 3, 4, 5, 6, 7 сутки после инфицирования у животных извлекали поджелудочную железу для оценки инфекционного титра вируса. Подбор доз соединений-лидеров для проведения исследования *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. Затем трех животных подвергали эвтаназии, выполняли макроскопическое обследование внутренних органов. За оставшимися 6 животными наблюдали до 14 дня после начала введения соединений. В исследованиях протективной активности соединений *in vivo* самцам мышей BALB/c (4-5 недель) внутрибрюшинно вводили вирус Коксаки В5 (6×10^6 ТЦД₅₀/200 мкл). Животным опытных групп вводили соединения или плацебо (физиологический раствор) внутрибрюшинно по лечебно-профилактической схеме: 2 р./сут. в объеме 100 мкл, начиная с точки за 12 часов до инфицирования и в течение следующих 5 суток. Затем животных умерщвляли при помощи цервикальной дислокации. Поджелудочные железы изымали и делили на две части: для определения инфекционной активности вируса в ткани и для оценки морфологической структуры лёгких. 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. План проведения экспериментальных работ с лабораторными животными согласован и одобрен локальной комиссией по биоэтике ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» (Протокол заседания от 29.10.2020 г. № 68).

Приготовление гистологических микропрепаратов

Поджелудочные железы фиксировали 10% раствором нейтрального забуференного формалина, затем отмывали от формалина, 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.

Методы статистической обработки результатов

Расчет значений CC_{50} и IC_{50} проводили при помощи пакета программ GraphPad Prism 8.0 (4-параметрическое уравнение логистической кривой). Для оценки различий между двумя независимыми выборками использовали непараметрический U-тест Манна-Уитни. При проверке гипотез номинальный уровень статистической значимости составлял $p < 0,05$.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Исследования противовирусной активности *in vitro* новых аналогов плеконарила

По результатам скринингового теста с использованием вируса Коксаки В3 (штамм Nancy, устойчивый к плеконарилу) среди 34 аналогов плеконарила 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) (Рисунок 1, Таблица 1).

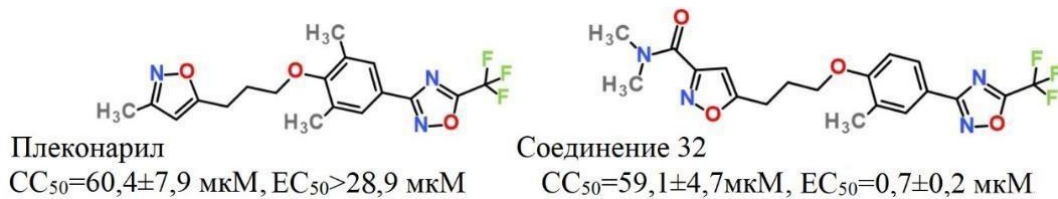


Рисунок 1 – Химические структуры и показатели цитопротективной активности плеконарила и соединения 32

Таблица 1 - 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)			
Соединение 32	$>235,61$	$0,02 \pm 0,01$	>10243
Плеконарил	$>262,19$	$0,25 \pm 0,02$	>1052
Вирус Коксаки В3 (клеточная линия Vero)			
Соединение 32	$>235,61$	$0,02 \pm 0,01$	>10000
Плеконарил	$>262,19$	$>78,65$	>3
Вирус Коксаки В4 (клеточная линия Vero)			
Соединение 32	$>235,61$	$0,12 \pm 0,05$	>1963
Плеконарил	$>262,19$	$0,02 \pm 0,01$	>13100
Вирус Коксаки В5 (клеточная линия Vero)			
Соединение 32	$>235,61$	$0,007 \pm 0,002$	>33658
Плеконарил	$>262,19$	$0,002 \pm 0,001$	>262190
Вирус ECHO30 (клеточная линия RD)			
Соединение 32	$>235,61$	$0,002 \pm 0,001$	>117805
Плеконарил	$>262,19$	$0,006 \pm 0,002$	>43698
Вирус ECHO3 (клеточная линия RD)			
Соединение 32	$>235,61$	$0,02 \pm 0,002$	>11780
Плеконарил	$>262,19$	$0,20 \pm 0,02$	>1311

Продолжение Таблицы 1

Соединение	CC ₅₀ (мкМ)	IC ₅₀ (мкМ)	SI
Вирус Коксаки A21 (клеточная линия RD)			
Соединение 32	>235,61	0,03±0,01	>7853
Плеконарил	>262,19	0,02±0,01	>13110
Риновирин 14 типа (клеточная линия MRC5)			
Соединение 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, показатель IC₅₀ при этом варьировал. Результаты выполненных тестов позволяют сделать вывод о перспективности соединения 32 как ингибитора широкого спектра вирусов рода *Enterovirus*.

Исследования активности производных бензолсульфамидов в отношении энтеровирусов

Среди 17 новых соединений группы бензолсульфамидов по результатам теста на цитопротекцию были выбраны два соединения, которые проявляли активность, сравнимую с соединением-прототипом 4-(4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)фенилсульфониламино)бензойной кислотой (Рисунок 2, Таблица 2).

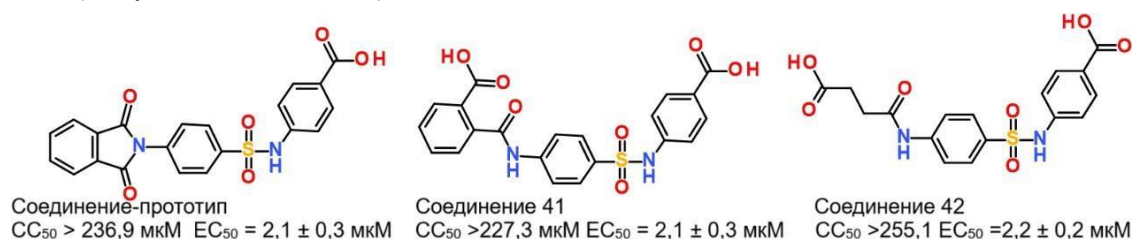


Рисунок 2 – Химические структуры и показатели цитопротективной активности соединения-прототипа, соединения 41 и соединения 42

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

Продолжение Таблицы 2

Соединение	CC ₅₀ (мкМ)	IC ₅₀ (мкМ)	SI
Вирус Коксаки В5 (клеточная линия Vero)			
Соединение 41	>568,2	15,9 ± 2,3	>35
Соединение 42	>637,5	12,8 ± 1,2	>50
Соединение-прототип	>592,4	18,9 ± 4,2	>31
Вирус ECHO30 (клеточная линия RD)			
Соединение 41	>568,2	> 227,3	>2
Соединение 42	>637,5	153,8 ± 12,5	>4
Соединение-прототип	>592,4	49,8 ± 10,2	>12
Вирус ECHO3 (клеточная линия RD)			
Соединение 41	>568,2	79,5 ± 14,1	>7
Соединение 42	>637,5	76,5 ± 15,5	>8
Соединение-прототип	>592,4	>236,9	>2
Вирус Коксаки A21 (клеточная линия RD)			
Соединение 41	>568,2	>227,3	>2
Соединение 42	>637,5	>255,1	>2
Соединение-прототип	>592,4	>236,9	>2
Риновирус 14 типа (клеточная линия MRC5)			
Соединение 41	>568,2	>227,3	>2
Соединение 42	>637,5	>255,1	>2
Соединение-прототип	>592,4	>236,9	>2

Значения представлены как среднее ± SD трех независимых экспериментов.

Спектр активности соединений 41 и 42 соответствовал соединению- прототипу. Наиболее выраженное вирус-ингибирующее действие соединений 41 и 42 было отмечено в отношении вирусов Коксаки В3, В4 и В5.

Исследования активности соединений групп лейковердазилов и вердазилов в отношении энтеровирусов

Среди 13 вердазилов и 34 лейковердазилов цитопротективная активность была отмечена только для 3 лейковердазилов. Наибольшим вирусингибирующим потенциалом в отношении вируса Коксаки В3 обладали соединения группы лейковердазилов. В качестве соединения-лидера было выбрано соединение 65 (2-(3,5-дифенил-5,6-дигидро-4Н-[1,2,4,5]тетразин-1-ил)-бензотиазол) из группы лейковердазилов (Рисунок 3, Таблица 3).

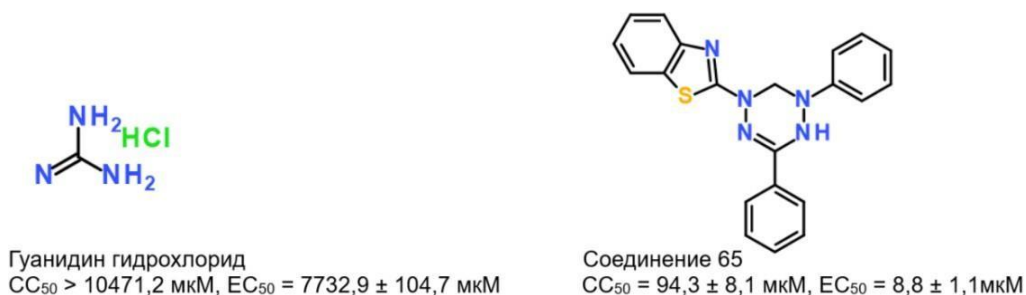


Рисунок 3 – Химические структуры и показатели цитопротективной активности гуанидин гидрохлорида и соединения 65

Таблица 3 - Спектр противовирусной активности соединения 65 в отношении ряда вирусов рода *Enterovirus*

Соединение	CC ₅₀ , мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
Вирус Коксаки А16 (клеточная линия RD)			
Соединение 65	673,3±60,1	0,8±0,2	841
Гуанидин гидрохлорид	> 10471,2	336,8 ± 28,3	>31
Вирус Коксаки В3 (клеточная линия Vero)			
Соединение 65	619,9 ± 52,7	1,8 ± 0,3	>230
Гуанидин гидрохлорид	> 5235,6	495,3± 39,8	>10
Вирус Коксаки В4 (клеточная линия Vero)			
Соединение 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)			
Соединение 65	619,9±52,7	1,5±0,3	413
Гуанидин гидрохлорид	> 5235,6	473,7 ± 33,4	>10
Вирус ЕСНО30 (клеточная линия RD)			
Соединение 65	673,3±60,1	1,6±0,4	420
Гуанидин гидрохлорид	> 10471,2	125,6 ± 18,2	>83
Вирус ЕСНО3 (клеточная линия RD)			
Соединение 65	673,3±60,1	0,9±0,3	747
Гуанидин гидрохлорид	> 10471,2	162,6± 64,4	>19
Вирус Коксаки А21 (клеточная линия RD)			
Соединение 65	673,3±60,1	67±12,2	10
Гуанидин гидрохлорид	> 10471,2	260,2±31,5	>40
Риновирус 14 типа (клеточная линия MRC5)			
Соединение 65	>673,1	>80,7	>8
Гуанидин гидрохлорид	> 3141,4	> 3141,4	>1

Значения представлены как среднее ± SD трех независимых экспериментов.

Соединение 65 обладало наиболее выраженным вирус-ингибирующим эффектом в отношении вируса Коксаки А16, Коксаки В3, В4, В5, ЕСНО3, ЕСНО30, при этом его активность превосходила активность гуанидина гидрохлорида. Соединение 65 обладало умеренной активностью также в отношении вируса Коксаки А21. Как и гуанидин гидрохлорид, соединение 65 не ингибировало репродукцию риновируса 14 типа. Таким образом, лейковердазилы являются перспективными ингибиторами энтеровирусов.

2.2 Изучение механизмов-действия соединений-лидеров

Изучение механизма действия нового аналога плеконарила

Принадлежность соединения 32 к группе капсид-связывающих агентов подтверждали с помощью теста на термостабильность капсида вируса Коксаки В5 и теста на время добавления исследуемого соединения в разные временные точки в течение одного полного цикла репродукции вируса Коксаки В5 (Рисунок 4, Рисунок 5).

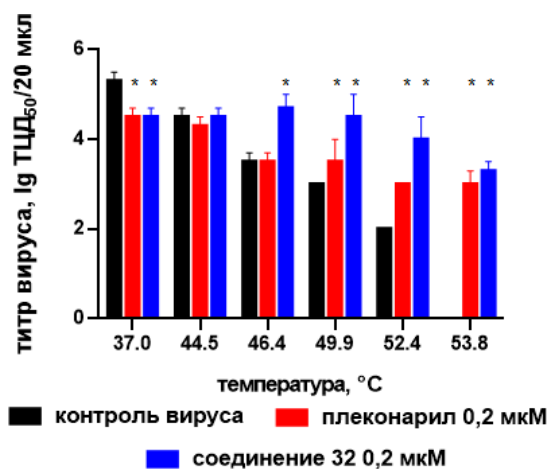


Рисунок 4 - Исследование термической инактивации вируса Коксаки В5 в присутствии соединения 32. Значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха для трех независимых экспериментов. Звездочкой отмечены статистически значимые различия в титрах вируса для каждого экспериментального варианта (плеконарил, соединение 32) по сравнению с контролем вируса, $p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни

В группе контроля вируса наблюдалась полная инактивация вируса при нагревании до 53,8°C. В присутствии соединения 32 (0,2 мкМ) или плеконарила (0,2 мкМ) вирус Коксаки В5 сохранял инфекционность при повышении температуры до 53,8°C. Известно, что капсид-связывающие агенты напрямую взаимодействуют с капсидом энтеровирусов, стабилизируя его структуру и предотвращая его диссоциацию и проникновение РНК вируса в клетку. Это взаимодействие повышает устойчивость вирусного капсида к кратковременному повышению температуры. Таким образом, на основании полученных данных, соединение 32 по механизму действия следует отнести к капсид-связывающим агентам.

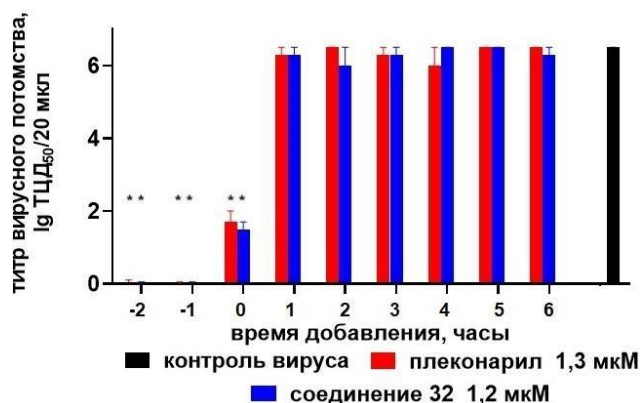


Рисунок 5 - Влияние соединения 32 на репродукцию вируса Коксаки В5 в зависимости от времени добавления соединения в культуру клеток Vero. Значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха для трех независимых экспериментов. Звездочкой отмечены статистически значимые различия в титрах вируса для каждого экспериментального варианта (плеконарил, соединение 32) по сравнению с контролем вируса, $p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни

Выраженный ингибирующий эффект соединения 32 отмечали при его добавлении не позже окончания сорбции вируса на мембране клеток (точка 0 часов). Препарат сравнения плеконарил продемонстрировал самую высокую ингибирующую активность при его добавлении в период от -2 до 0 часов. В совокупности полученные результаты двух тестов позволяют сделать вывод о том, что соединение 32 относится к группе капсид-связывающих агентов и ингибирует ранние стадии жизненного цикла вируса Коксаки В5.

Изучение механизма действия соединения-лидеров из группы бензолсульфамидов

Принадлежность соединений 41 и 42 к группе капсид-связывающих агентов подтверждали с помощью теста на термостабильность капсида вируса Коксаки В5 и теста на время добавления исследуемых соединений в разные временные точки в течение одного полного цикла репродукции вируса Коксаки В5 (Рисунок 6, Рисунок 7).

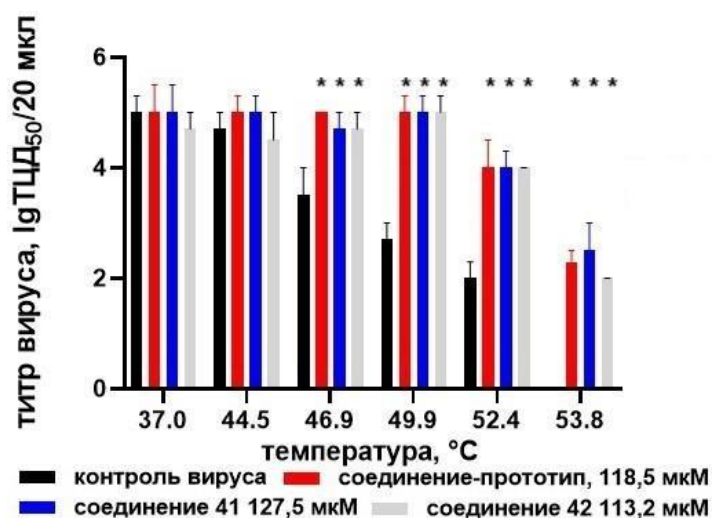


Рисунок 6 – Исследование термической инактивации вируса Коксаки В5 в присутствии соединения 41 и соединения 42. Значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха. Звездочкой отмечены статистически значимые различия в титрах вируса для каждого экспериментального варианта по сравнению с контролем 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.

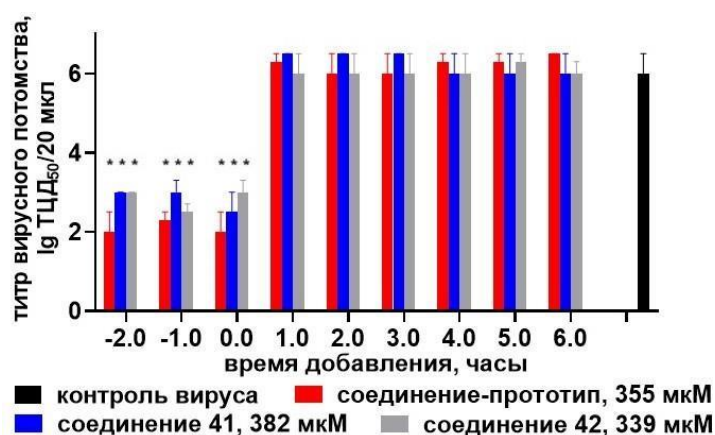


Рисунок 7 - Влияние соединения 41 и соединения 42 на репродукцию вируса Коксаки В5 в зависимости от времени их добавления в культуру клеток Vero. Значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха. Звездочкой отмечены статистически значимые различия в титрах вируса по сравнению с контролем 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 клеток. 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 подавляют ранние стадии цикла репродукции вируса Коксаки В5.

Изучение механизма действия соединения-лидера из группы лейковердазилов

Для того, чтобы подтвердить или исключить принадлежность соединения 65 к группе капсид-связывающих агентов, к которым относятся плеконарил и его производные, выполняли тест на термостабильность капсида вируса Коксаки В5 в присутствии соединения 65 (Рисунок 8).

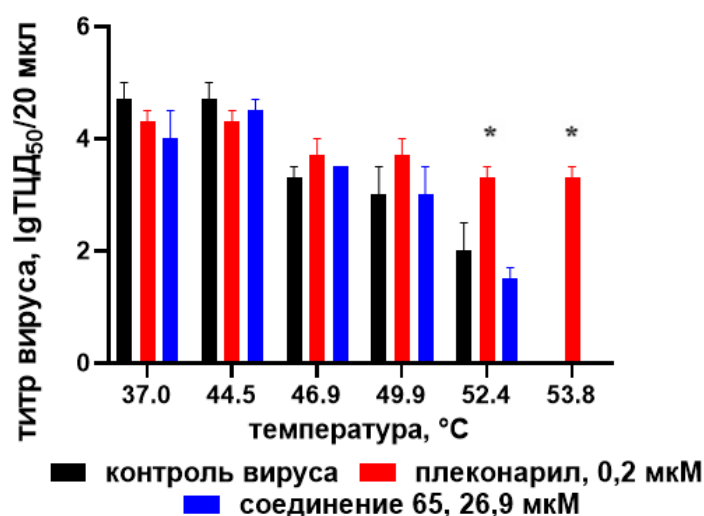


Рисунок 8 - Исследования термической инактивации вируса Коксаки В5 в присутствии соединения 65. Значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха. Звездочкой отмечены статистически значимые различия в титрах вируса в каждой экспериментальной группе по сравнению с контролем вируса, $p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни

При нагревании до 53,8°C в контроле вируса происходила полная инактивация вируса. Капсид-связывающий агент плеконарил обеспечивал сохранение инфекционности вируса при нагревании до 53,8°C. Соединение 65 не обладало такой активностью. Таким образом, был сделан вывод о том, что соединение 65 не относится к группе капсид-связывающих ингибиторов энтеровирусов.

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 в пределах одного цикла репродукции вируса (Рисунок 9).

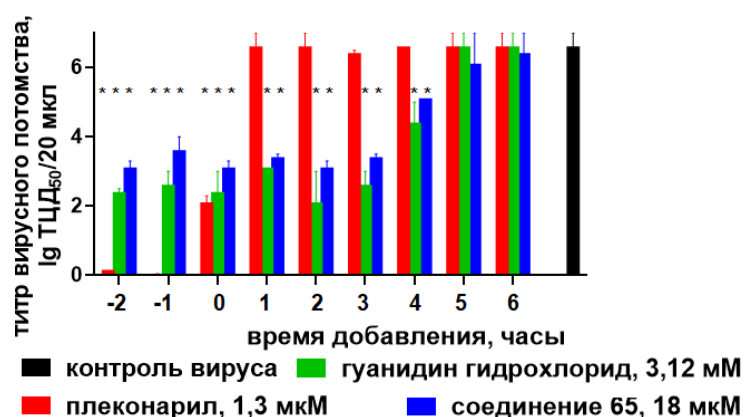


Рисунок 9 - Влияние соединения 65 на репродукцию вируса Коксаки В5 в зависимости от времени добавления в культуру клеток Vero. Значения представлены в виде медианы и межквартильного размаха. Звездочкой отмечены статистически значимые различия в титрах вируса по сравнению с контролем вируса, $p < 0,05$ по U-критерию Манна-Уитни

Плеконарил проявил самую высокую активность при добавлении в период от -2 до 0 часов, как и ожидалось для ингибиторов ранней стадии взаимодействия вируса с клеткой. Гуанидин гидрохлорид (ингибитор этапа репликации вирусной РНК) проявлял активность при его наличии в среде в интервале (-2)-4 часов. Для соединения 65 был отмечен вирус-ингибирующий эффект, если его вносили в среду не позже 4 часов после заражения. Ингибирования воспроизводства вируса не наблюдалось, если его добавляли спустя 5 часов после окончания сорбции вируса на поверхности клеток или позже. Известно, что репликация вирусной РНК начинается не ранее точки 3 часа после заражения: дцРНК-интермедиат и вновь синтезированная (+)РНК детектируются внутри инфицированной клетки, начиная с точки 3 часа. 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 начало ее репликации. Полученные результаты позволяют заключить, что исследуемое соединение действует на мишени, связанные с внутриклеточным этапом репродукции вируса Коксаки В5.

2.3 Оценка противовирусной активности соединений *in vivo* Адаптация модели энтеровирусного панкреатита у белых мышей

В ходе данной серии экспериментов оценивали чувствительность к внутрибрюшинному инфицированию вирусом Коксаки В5 самцов и самок белых мышей BALB/c (возраст 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 ткани поджелудочной железы (Таблица 4).

Таблица 4 - 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

Различия между двумя группами животных не были статистически значимыми, но с учетом литературных данных о большей чувствительности к развитию энтеровирусного панкреатита самцов мышей, для дальнейшей оптимизации животной модели были выбраны самцы мышей BALB/c. Оценили восприимчивость к инфицированию вирусом Коксаки В5 самцов мышей BALB/c разного возраста: 4-5 недель и 6-8 недель (по 10 животных в группе) (Таблица 5).

Таблица 5 - 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

Различия между двумя группами животных не были статистически значимыми, и для дальнейшей работы были выбраны самцы мышей в возрасте 4-5 недель, у которых исследовали динамику репродукции вируса Коксаки В5 при внутрибрюшинном инфицировании (Рисунок 10).

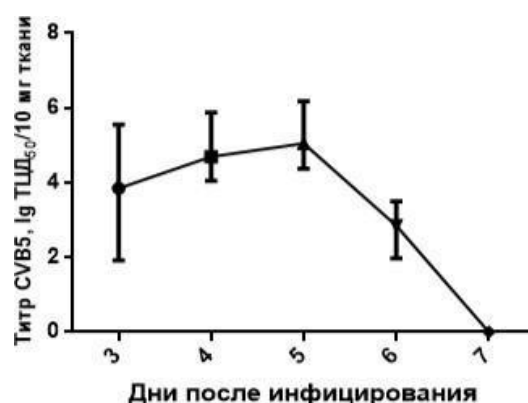


Рисунок 10 - Динамика репродукции вируса Коксаки В5 в ткани поджелудочной железы у самцов мышей BALB/c (возраст 4-5 недель) при внутрибрюшинном введении. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха

В период с 3 по 6 сутки после инфицирования в поджелудочной железе мышей BALB/c наблюдалась активная репродукция вируса. В дальнейшей временной точке 7 суток после инфицирования животных инфекционная активность вируса снижалась.

На основании полученных результатов для 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).

Активность аналога плеконарила на модели инфекции мышей BALB/c, вызванной вирусом Коксаки B5

Доза соединения 32 и плеконарила (100 мг/кг) для проведения исследования *in vivo* была определена по результатам предварительных экспериментов по оценке токсичности соединений *in vivo*, в которых было показано отсутствие гибели животных и макроскопических изменений в органах животных, получавших соединение 32 или плеконарил в дозе 100 мг/кг/сут внутрибрюшинно. При исследовании протективной активности за 12 часов до внутрибрюшинного инфицирования вирусом Коксаки B5 (6×10^6 ТЦД₅₀/200 мкл), в день заражения (день 0) и в течение 5 суток после дня заражения животным вводили внутрибрюшинно 2 р./сут. физиологический раствор (плацебо), соединение 32 (100 мкг/мл) или препарат сравнения плеконарил (100 мг/кг/сут). На 5 сутки после инфицирования животных умерщвляли, изымали поджелудочную железу, делили ее на две части (для вирусологического и гистологического исследования) (Рисунок 11).

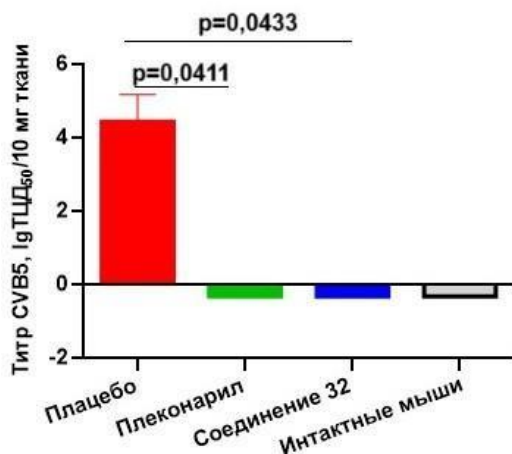


Рисунок 11 - Вирусная нагрузка в поджелудочной железе животных в группе плацебо, группе введения плеконарила или соединения 32 (100 мг/кг/сутки) и интактной группе животных (N=6). Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха титра вируса для каждой группы. Статистическую значимость различий титра вируса в каждой группе введения препаратов по сравнению с группой плацебо оценивали с помощью критерия Манна-Уитни

В группе плацебо 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).

Оценка интенсивности вирусного панкреатита в контрольных и опытных группах животных была проведена при помощи гистологического и морфометрического анализа ткани поджелудочной железы (Рисунок 12).

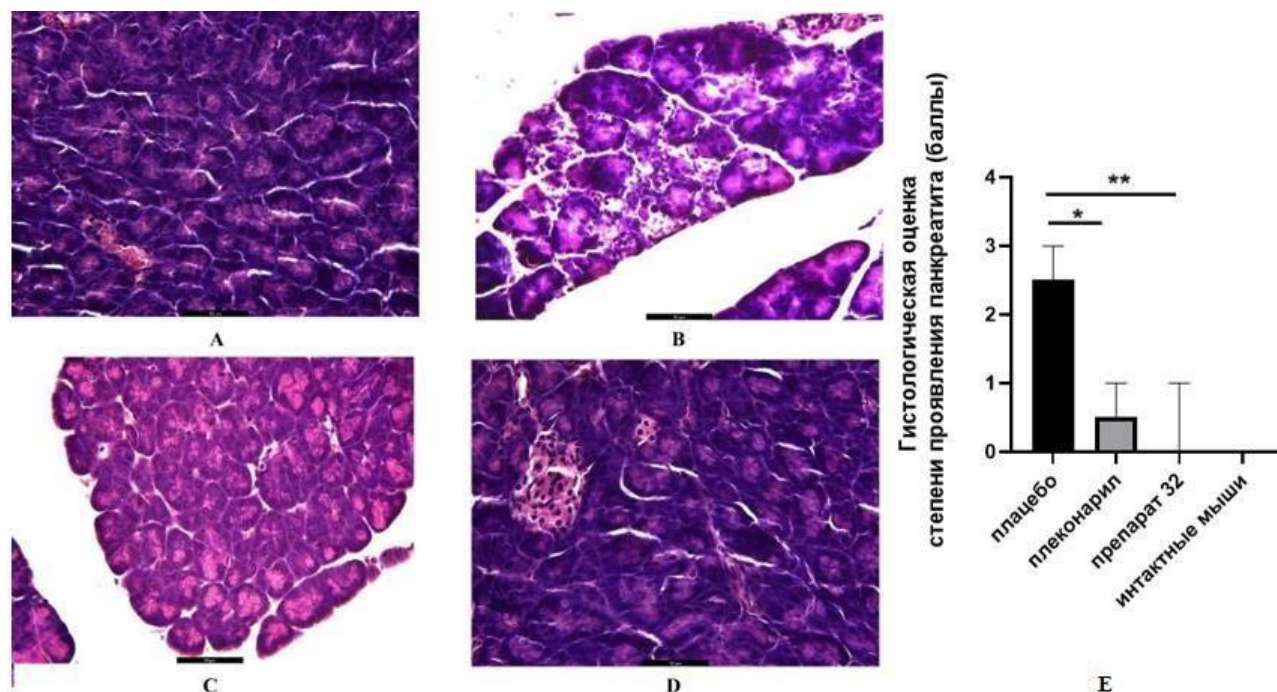


Рисунок 12 – Репрезентативные микрофотографии структуры поджелудочных желез мышей через 5 сут. после заражения вирусом Коксаки В5 в интактной группе мышей (А), группе плацебо (В), группе введения плеконарила (С) или соединения 32 (D). Окраска гематоксилин и эозин, масштабная линейка 50 мкм. Гистологическая 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 $p < 0,05$.

В группе плацебо отмечались признаки воспалительного процесса в ткани поджелудочной железы в виде цитолиза, очагов некроза и инфильтратов воспалительных клеток. 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*.

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

Доза соединения 41, 42 и препарата сравнения (4-(4-(1,3-диоксоизоиндолин-2-ил)фенилсульфониламино)бензойной кислоты) (100 мг/кг) для проведения исследования *in vivo* была определена на основании результатов предварительных экспериментов по оценке токсичности соединений *in vivo*, в которых было показано отсутствие гибели животных и отсутствие макроскопических изменений при вскрытии в группе животных, получавших исследуемые соединения в дозе 100 мг/кг/сут внутривентрально. В исследовании протективной активности животных инфицировали внутривентрально вирусом Коксаки В5 (6×10^6 ТЦД₅₀/200 мкл). За 12 часов до инфицирования вирусом, в день заражения (день 0) и в течение 5 суток после дня заражения животным вводили внутривентрально 2 р./сут. физиологический раствор (плацебо), соединение 41, соединение 42 или препарат сравнения (100 мг/кг/сут). На 5 сутки после инфицирования животных умерщвляли путем цервикальной дислокации, изымали

поджелудочную железу и определяли инфекционный титр вируса в поджелудочной железе. (Рисунок 13).

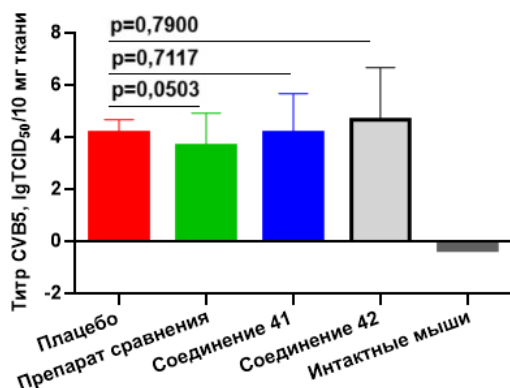


Рисунок 13 - Вирусная нагрузка в поджелудочной железе животных в группе плацебо, группе введения соединения 42, соединения 41 или препарата сравнения (100 мг/кг/сутки) и интактной группе животных (N=10). Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха титра вируса для каждой группы. Статистическую 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 (инфекционный титр вируса составил 4,2 lgTCID₅₀/10 мг ткани). У животных, получавших соединения 41, 42 и препарат сравнения, инфекционный титр вируса (медиана) составил 4,2, 4,4 и lgTCID₅₀/10 мг ткани, соответственно. Введение соединений 42 и 41, как и препарата сравнения, 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*.

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

Дозу соединения 65 (50 мг/кг) для проведения исследования *in vivo* определяли с учетом результатов предварительных экспериментов по оценке токсичности соединения *in vivo*, в которых было показано отсутствие гибели животных и макроскопических изменений при вскрытии в группе животных, получавших 65 в дозе 50 мг/кг/сут. В группе животных, получавших соединение 65 в дозе 100 мг/кг/сут в брюшной полости животных отмечалось накопление вязкого экссудата. В отдельных случаях на поверхности почек и печени присутствовали очаги некроза в виде белых пятен. В исследовании протективной активности животных инфицировали внутрибрюшинно вирусом Коксаки B5 (6×10^6 TCID₅₀/200 мкл). За 12 часов до инфицирования вирусом, в день заражения (день 0) и в течение 5 суток после дня заражения животным вводили внутрибрюшинно 2 р./сут. физиологический раствор (плацебо), соединение 65 или препарат сравнения плеконарил (100 мг/кг/сут). На 5 сутки после инфицирования животных умерщвляли путем цервикальной дислокации, изымали поджелудочную железу и определяли в ней инфекционный титр вируса (Рисунок 14).

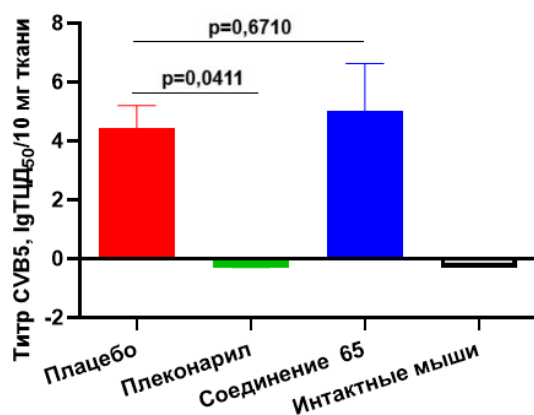


Рисунок 14 - Вирусная нагрузка в поджелудочной железе животных в группе плацебо, группе введения соединения 65 (50 мг/кг/сутки), группе введения плеконарила (100 мкг/кг/сутки) и интактной группе животных (N=6). Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха титра вируса для каждой группы. Статистическую значимость различий титра вируса в каждой группе введения препаратов по сравнению с группой плацебо оценивали с помощью критерия Манна-Уитни

В группе плацебо инфекционный титр вируса (медиана) составил 4,4 lgТЦД₅₀/10 мг ткани. Введение плеконарила приводило к статистически значимому снижению вирусной нагрузки в органе-мишени на 4,8 lgТЦД₅₀/10 мг ткани по сравнению с группой плацебо ($p=0,0411$). В группе введения соединения 65 инфекционный титр вируса (медиана) составил 4,5 lgТЦД₅₀/10 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 В5 *in vivo*.

2.4 Характеристика штаммов вируса Коксаки, устойчивых к соединениям-лидерам

Штамм вируса Коксаки В3, устойчивый к соединению 32

Вирус Коксаки В3 (штамм Nancy) серийно пассировали (7 пассажей) в присутствии возрастающих концентраций соединения 32 (от 0,2 до 14,2 мкМ). Контрольный вирус последовательно пассировали семь раз без добавления исследуемого соединения. Семь пассажей в клетках Vero не изменили чувствительность контрольного вируса к соединению 32 ($EC_{50}=0,6\pm0,3$ мкМ). Однако культивирование вируса в присутствии соединения 32 в течение 7 пассажей вызывало многократное повышение устойчивости к нему (для резистентного вируса $EC_{50}=30,3\pm2,8$ мкМ) по сравнению с исходным вирусом ($EC_{50}=0,7\pm0,2$ мкМ). Методом секвенирования по Сэнгеру в последовательности пула резистентного вируса были обнаружены полиморфизмы, соответствующие аминокислотным заменам в белке VP1 (S225N, Q254R, Q264R) и в белке VP3 (Y178F). При секвенировании отдельных клонов резистентного штамма вируса в двух клонках была обнаружена замена в белке VP3 (Y178F), а в четырех клонках были обнаружены замены в белке VP1: I207T (не выявленная при секвенировании пула) и Q264R. Это свидетельствует о наличии в пуле резистентного вируса клонов с разными аминокислотными заменами, доля которых в общем пуле варьирует. 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. Остальные аминокислоты, в положениях которых были выявлены замены, расположены на наружной поверхности капсида.

Была проведена сравнительная оценка фенотипа бляшек, образованных резистентным (R) и контрольным (С) штаммом. Площадь бляшек, образованных резистентным вирусом (медиана $0,4\times10^6$ мкм², межквартильный размах $0,2-0,6\times10^6$ мкм²), была значительно меньше, чем площадь бляшек, образованных контрольным штаммом вируса (медиана $2,1\times10^6$ мкм², межквартильный размах $1,2-3,6\times10^6$ мкм²). Также исследовали временную динамику роста резистентного штамма и контрольного штамма в присутствии 32 и без него (Рисунок 15).

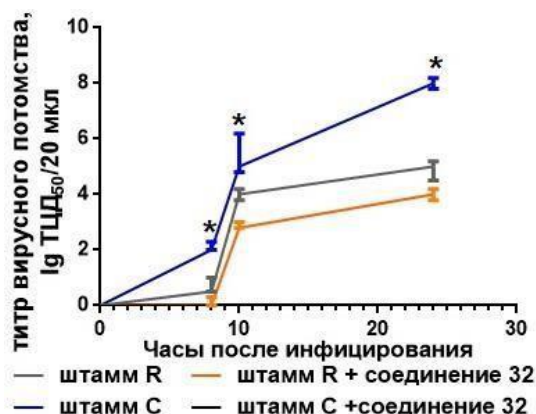


Рисунок 15 – Динамика размножения штаммов С и R клетках Vero в присутствии соединения 32 (20 мкМ) и без него (m.o.i 0,01). Титр вирусного потомства отображается в зависимости от времени инкубации. Представлены многоступенчатые кривые роста. Звездочка указывает на значимость разницы в титре вируса между 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).

Штамм вируса Коксаки В3, устойчивый к соединению 65

Вирус Коксаки В3 (штамм Nancy), серийно пассировали (9 пассажей) в присутствии возрастающих концентраций соединения 65 (1,2-18,8 мкМ) с целью получения вируса, устойчивого к нему. Контрольный вирус последовательно пассировали 9 раз без добавления соединения 65. Культивирование вируса Коксаки В3 в присутствии соединения 65 вызывало многократное повышение устойчивости к препарату у резистентного вируса ($IC_{50}=12,9\pm 2,5$ мкМ) по сравнению с исходным штаммом ($IC_{50}=1,8\pm 0,7$ мкМ) или контрольным вирусом, пассированным без него ($IC_{50}=0,8\pm 0,2$ мкМ). Методом секвенирования по Сэнгеру в последовательности пула резистентного вируса были обнаружены полиморфизмы, соответствующие аминокислотным заменам в белке 2С (S109I, H318Q). При анализе отдельных клонов резистентного штамма вируса во всех шести клонах была обнаружена только одна замена в белке 2С (S109I), что свидетельствует о разной доле отдельных клонов в общем пуле резистентного штамма.

Была проведена сравнительная оценка фенотипа бляшек, образованных резистентным (R) и контрольным (С) штаммом. Площадь бляшек, образованных резистентным вирусом (медиана $6,7\times 10^6$ мкм², межквартильный размах $4,6-10,7\times 10^6$ мкм²), была значительно меньше, чем площадь бляшек, образованных контрольным штаммом вируса (медиана $27,1\times 10^6$ мкм², межквартильный размах $16,9-36,3\times 10^6$ мкм²). Также исследовали временную динамику роста резистентного штамма и контрольного штамма в присутствии 32 и без него (Рисунок 16).

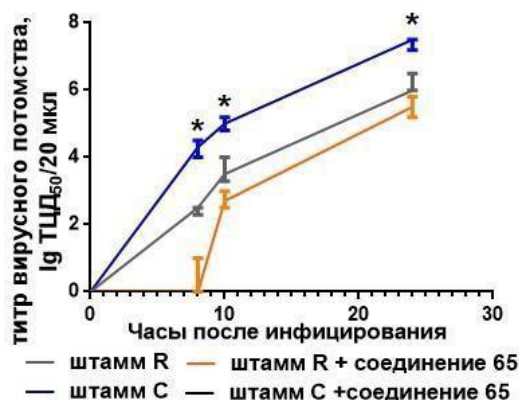


Рисунок 16 - Динамика размножения штаммов С и R в клетках Vero в присутствии 65 (18 мкМ) и без него (т.о.и 0,01). Титр вирусного потомства отображается в зависимости от времени инкубации. Представлены многоступенчатые кривые роста. Звездочка указывает на значимость разницы в титрах между резистентным 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представители рода *Enterovirus* являются этиологическими агентами полиомиелита, энтеровирусных инфекций и риновирусной инфекции человека. На сегодняшний момент в мире отсутствуют зарегистрированные этиотропные препараты, направленные на борьбу с энтеровирусами и риновирусами. В данной работе было проведено исследование противовирусной активности новых гетероциклических соединений четырех разных групп. У исследуемых соединений было показано наличие цитопротективной активности *in vitro* при инфицировании клеток Vero вирусом Коксаки В3. Была проведена оценка вирус-ингибирующей активности соединений-лидеров в каждой группе в отношении вирусов рода *Enterovirus*: вирусов

Коксаки В3, В4, В5, ЕСНО3, ЕСНО30, Коксаки А16, А21, риновируса 14 типа. Наиболее широким спектром действия обладал аналог плеконарила, N,N-диметил-5-[3-[2-метил-4-[5-(трифторметил)-1,2,4-оксадиазол-3-ил]фенокси]пропил]изоксазол-3-карбоксамид (соединение 32). Для соединения-лидера из группы лейковердазилов (соединение 65) была показана активность в отношении всех выбранных типов вирусов, за исключением риновируса. Соединения-лидеры из группы бензолсульфамидов были активными только в отношении вирусов Коксаки В. Далее было показано, что аналог плеконарила и соединения из группы бензолсульфамидов относятся к группе капсид-связывающих агентов и действуют на вирус на ранних стадиях его жизненного цикла. Соединение-лидер из группы лейковердазилов ингибирует воспроизводство вируса при добавлении к инфицированным клеткам не позже точки 4 часа после заражения.

Активность соединений-лидеров *in vivo* исследовали 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. Также по результатам гистологического исследования введение аналога плеконарила сопровождалось уменьшением степени проявления панкреатита. В совокупности полученные результаты свидетельствуют о перспективности проведения развернутых доклинических исследований данного соединения.

Была исследована возможность выработки резистентности к указанному аналогу плеконарила и соединению-лидеру из группы лейковердазилов. У резистентных штаммов были локализованы аминокислотные замены в вирусных белках 2С, VP3, VP1, было показано, что полученные резистентные штаммы имеют сниженные ростовые свойства *in vitro*.

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 2С (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 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)фенилсульфониламино)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 ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Волобуева А.С.**, Зарубаев В.В., Ланцева К.С. / Разработка противовирусных препаратов для терапии инфекции коксакивируса В3 // Инфекция и иммунитет. - 2021. - Т. 11. - № 1. - С. 57-67. DOI: 10.15789/2220-7619-DOA-1273 (Web of Science, RSCI, Scopus, BAK, K1).
2. **Волобуева А.С.**, Зарубаев В.В., Федорченко Т.Г., Липунова Г.Н., Тунгусов В.Н., Чупахин О.Н. / Противовирусные свойства вердазилов и лейковердазилов и их активность в отношении энтеровирусов группы В // Инфекция и иммунитет. - 2023. - Т. 13- № 1. - С. 107-118. DOI: 10.15789/2220-7619-VAL-2065 (Web of Science, RSCI, Scopus, BAK, K1).
3. Shetnev A.A., **Volobueva A.S.**, Panova V.A., Zarubaev V.V., Baykov S.V. / Design of 4-Substituted Sulfonamidobenzoic Acid Derivatives Targeting Coxsackievirus B3 // Life. – 2022. – Vol. 12. – N. 11. – P. 1832. DOI: 10.3390/life12111832 (Web of Science, Scopus, PubMed, Q2).
4. **Volobueva A.S.**, Fedorchenko T.G., Lipunova G.N., Valova M.S., Sbarzaglia V.A., Gladkikh A.S., Kanaeva O.I., Tolstykh N.A., Gorshkov A.N., Zarubaev V.V. / Leucoverdaizyls as Novel Potent Inhibitors of Enterovirus Replication // Pathogens. – 2024. – Vol. 13. – N. 5. – P. 410. DOI: 10.3390/pathogens13050410 (Web of Science, Scopus, PubMed, Q2).
5. Lane T.R., Fu J., Sherry B., Tarbet B., Hurst B.L., Riabova O., Kazakova E., Egorova A., Clarke P., Leser J.S., Frost J., Rudy M., Tyler K.L., Klose T., **Volobueva A.S.**, Belyaevskaya S.V., Zarubaev V.V., Kuhn R.J., Makarov V., Ekins S. / Efficacy of an isoxazole-3-carboxamide analog of pleconaril in mouse models of Enterovirus-D68 and Coxsackie B5 // Antiviral Res. – 2023. – Vol. 216. – P. 105654. DOI: 10.1016/j.antiviral.2023.105654 (Scopus, PubMed, Q1).
6. 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-4н-[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. Постовского УО РАН, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера . – 4 с. : ил. – Текст: непосредственный.