

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН»
(ИНСТИТУТ ПОЛИОМИЕЛИТА)

На правах рукописи

КОЗЛОВСКАЯ Любовь Игоревна

**ФЕНОТИП-НАПРАВЛЕННЫЙ АНАЛИЗ ПРОТИВОВИРУСНОЙ
АКТИВНОСТИ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ
В ОТНОШЕНИИ РНК-СОДЕРЖАЩИХ ВИРУСОВ**

1.5.10. – Вирусология

диссертация
на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
академик РАН, профессор,
доктор медицинских наук
А.А. Ишмухаметов

Москва
2023 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	10
Глава 1. Обзор литературы.....	23
1.1. Поиск новых лекарственных препаратов	23
1.1.1. Мишень-направленный поиск новых лекарственных препаратов (Target-Based Drug Discovery, TDD).....	23
1.1.2. Фенотип-направленный поиск новых лекарственных препаратов (Phenotype-based drug discovery, PDD).....	25
1.1.2.1. Фенотипические тесты <i>in vitro</i> (на клеточных культурах).....	28
1.1.3. Фенотип-направленный (PDD) и мишень-направленный (TDD) поиск новых лекарственных препаратов – сравнение подходов	29
1.1.4. Фенотипический скрининг как новый подход к поиску новых лекарственных препаратов.....	32
1.1.4.1. Разработка, оптимизация и валидация методик фенотипического скрининга для поиска лекарственных препаратов	35
1.1.4.2. Фенотипические тесты для первичного скрининга.....	36
1.1.4.3. Фенотипические тесты для поиска механизма действия.....	37
1.1.4.4. Применение фенотипических тестов для выбора одного или серии соединений-лидеров	38
1.2. Поиск новых лекарственных препаратов против РНК-содержащих вирусов	38
1.2.1. Проблемы в существующем поиске противовирусных препаратов	38
1.2.2. Фенотипические тесты <i>in vitro</i> как способ поиска новых противовирусных препаратов	40
1.3. Методы оценки ингибирующей активности соединений на репродукцию инфекционного вируса в культуре клеток как вариант фенотипического теста	42

1.3.1. Параметры и валидация фенотипического скрининга на основе оценки ингибирующей активности соединений на репродукцию инфекционного вируса в культуре клеток	42
1.3.2. Методы с оценкой вирус-индуцированной гибели (ЦПД) клеток	43
1.3.3. Методы с оценкой количества жизнеспособных клеток	44
1.3.4. Методы оценки уровня репродукции (урожае) инфекционного вируса (бляшки, фокусы)	45
1.3.5. Методы оценки уровня репродукции (урожае) и доли заражённых клеток по флуоресценции	46
1.3.6. Другие методы оценки уровня репродукции (урожае) вируса и доли заражённых клеток	48
1.4. Характеристика используемых в работе вирусов	49
1.4.1. Характеристика вирусов рода <i>Orthoflavivirus</i> семейства <i>Flaviviridae</i>	49
1.4.2. Характеристика вирусов рода <i>Alphavirus</i> семейства <i>Togaviridae</i>	54
1.4.3. Характеристика вирусов рода <i>Betacoronavirus</i> семейства <i>Coronaviridae</i>	58
1.4.4. Характеристика вирусов рода <i>Lentivirus</i> семейства <i>Retroviridae</i>	64
1.4.5. Характеристика вирусов рода <i>Enterovirus</i> семейства <i>Picornaviridae</i>	69
1.5. Лекарственные препараты против используемых в работе РНК-содержащих вирусов	72
1.5.1. Ингибирование связывания вириона с рецептором	74
1.5.2. Ингибирование проникновения вириона в клетку	75
1.5.3. Ингибирование работы вирусных полимераз	76
1.5.4. Ингибирование работы вирусных протеаз	78
1.5.5. Ингибирование интегразы ВИЧ	80
1.5.6. Клеточные белки как мишени для противовирусных препаратов	80

Глава 2. Материалы и методы.....	83
2.1. Материалы	83
2.1.1. Культуры клеток	83
2.1.2. Вирусы	83
2.1.3. Соединения	84
2.2. Методы выделения и титрования вируса в культуре клеток.....	85
2.2.1. Выделение изолятов вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero.....	85
2.2.2. Выделение изолятов энтеровирусов в культуре клеток RD.....	86
2.2.3. Титрование вируса по цитопатическому действию (ЦПД) в культуре клеток Vero	87
2.2.4. Титрование энтеровирусов по цитопатическому действию (ЦПД) в культуре клеток RD	88
2.2.5. Титрование вируса по бляшкообразующим единицам (БОЕ) в культуре клеток СПЭВ под агаровым покрытием.....	88
2.2.6. Титрование вируса по бляшкообразующим единицам (БОЕ) в культуре клеток СПЭВ под метилцеллюлозным покрытием.....	89
2.2.7. Титрование вируса по фокусобразующим единицам (ФОЕ) в культуре клеток СПЭВ под метилцеллюлозным покрытием.....	90
2.3. Методы оценки токсического действия соединений в культуре клеток.....	91
2.3.1. Анализ токсического действия соединений по гибели клеток, детектируемой визуально методом световой микроскопии, для линий клеток СПЭВ, Vero, RD и МТ-4.....	91
2.3.2. Анализ токсического действия соединений по снижению доли жизнеспособных клеток по окраске резазурином для линий клеток СПЭВ, Vero и RD	91
2.4. Методы оценки противовирусной активности соединений в культуре клеток	92

2.4.1. Оценка противовирусной активности соединений по ингибированию ЦПД (SARS-CoV-2, ЧИКВ)	92
2.4.2. Оценка противовирусной активности соединений по ингибированию ЦПД (ВИЧ-1)	93
2.4.3. Оценка противовирусной активности соединений по ингибированию ЦПД (энтеровирусы).....	93
2.4.4. Оценка противовирусной активности соединений по ингибированию ЦПД, определяемого по выживаемости клеток в резазуриновом тесте (энтеровирусы)	94
2.4.5. Оценка противовирусной активности соединений по ингибированию бляшкообразования (SARS-CoV-2, ЧИКВ).....	94
2.4.6. Оценка противовирусной активности соединений по ингибированию бляшкообразования (ортофлавивирусы)	95
2.4.7. Оценка противовирусной активности соединений по ингибированию фокусообразования (ортофлавивирусы).....	96
2.4.8. Оценка противовирусной активности соединений по снижению урожая вируса (ортофлавивирусы, энтеровирусы, SARS-CoV-2)	96
2.4.9. Оценка вирулицидной активности соединений против высоких доз вируса (SARS-CoV-2).....	97
2.5. Другие методы.....	97
2.5.1. ИФА для количественного определения белка Е ВКЭ	97
2.5.2. Количественная ОТ-ПЦР для ВКЭ	98
2.5.3. Концентрирование вирионов ВКЭ методом ультрацентрифугирования	99
2.5.4. Трансмиссионная электронная микроскопия вирионов ВКЭ	99
2.5.5. Высокопроизводительное секвенирование и анализ данных	100
2.6. Статистическая обработка	100

Глава 3. Результаты и их обсуждение	101
3.1. Методика определения токсичности соединений для клеток по визуальным показателям – морфология и выживаемость клеток	101
3.1.1. Отработка методики определения цитотоксичности соединений с визуальной оценкой гибели клеток методом световой микроскопии.....	101
3.1.2. Применение методики определения цитотоксичности соединений с визуальной оценкой методом световой микроскопии	103
3.2. Методика определения цитотоксичности соединений по снижению доли жизнеспособных клеток в резазуриновом тесте	104
3.2.1. Отработка методики определения доли жизнеспособных клеток в резазуриновом тесте	105
3.2.2. Применение методики определения цитотоксичности по снижению доли жизнеспособных клеток в резазуриновом тесте.....	107
3.3. Фенотипическая оценка противовирусной активности ингибиторов репродукции ортофлавивирусов	108
3.3.1. Отработка методики фенотипического скрининга на основе реакции подавления бляшкообразования ортофлавивирусов.....	108
3.3.2. Сравнение методик фенотипического скрининга против ортофлавивирусов – подавление появления бляшек и фокусов	111
3.3.3. Применение методики фенотипического скрининга по подавлению бляшкообразования ортофлавивирусов.....	112
3.4. Фенотипический скрининг противовирусной активности ингибиторов репродукции энтеровирусов	139
3.4.1. Отработка методики фенотипического скрининга против энтеровирусов по подавлению вирус-индуцированного ЦПД.....	139

3.4.2. Сравнение методик фенотипического скрининга по подавлению энтеровирус-индуцированного ЦПД с учётом результатов методом световой микроскопии и по оценке доли жизнеспособных клеток (резазуриновый тест)	141
3.4.3. Применение методики фенотипического скрининга по подавлению появления признаков энтеровирус-индуцированного ЦПД.....	144
3.5. Фенотипический скрининг противовирусной активности ингибиторов репродукции тогавирусов.....	156
3.5.1. Отработка методики фенотипического скрининга против тогавирусов по подавлению вирус-индуцированного ЦПД.....	156
3.5.2. Сравнение методик фенотипического скрининга против тогавирусов по подавлению ЦПД и бляшкообразования	157
3.5.3. Применение методики фенотипического скрининга по ингибированию тогавирус-индуцированного ЦПД или бляшкообразования	158
3.6. Фенотипический скрининг противовирусной активности ингибиторов репродукции лентивирусов	166
3.6.1. Отработка методики фенотипического скрининга против лентивирусов по подавлению вирус-индуцированного ЦПД.....	166
3.6.2. Применение методики фенотипического скрининга по подавлению лентивирус-индуцированного ЦПД.....	167
3.7. Фенотипический скрининг противовирусной активности ингибиторов репродукции коронавируса.....	171
3.7.1. Выделение штамма SARS-CoV-2 и отработка условий размножения вируса в культуре клеток Vero	171
3.7.2. Отработка методики постановки реакции нейтрализации и фенотипического скрининга против коронавируса по подавлению вирус-индуцированного ЦПД.....	173

3.7.3. Сравнение методики фенотипической оценки противовирусной активности по снижению урожая SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero и в псевдовирусной системе	177
3.7.4. Применение методики фенотипического скрининга по подавлению коронавируса-индуцированного ЦПД.....	178
3.8. Методики фенотипической оценки вирулицидной активности соединений	194
3.8.1. Методика оценки вирулицидной активности соединений против высоких доз ортофлавириусов	194
3.8.2. Методика оценки вирулицидной активности соединений против высоких доз SARS-CoV-2.....	195
3.9. Методики фенотипического определения механизма действия соединений	197
3.9.1. Методика оценки активности соединений от времени добавления для ортофлавириусов – по снижению урожая	197
3.9.2. Методика оценки активности соединений от времени добавления для энтеровириусов – по снижению урожая	198
3.9.3. Методика оценки активности соединений от времени добавления для SARS-CoV-2 – по снижению урожая и подавлению бляшкообразования	200
3.10. Подходы к выбору штамма для фенотипического скрининга по ингибированию репродукции вируса в культуре клеток.....	203
3.10.1. Сравнение противовирусной активности 4-аминопиримидинов против разных штаммов ВКЭ.....	203
3.10.2. Сравнение противовирусной активности производных N ⁶ -бензиладенозина против разных штаммов ЭВ-А71	208
3.10.3. Сравнение противовирусной активности фавипиравира против разных вариантов SARS-CoV-2	212

3.11. Подходы к выбору дозы вируса для фенотипического скрининга по ингибированию репродукции вируса в культуре клеток.....	214
3.11.1. Активность препаратов против 50 и 200 ТЦД ₅₀ SARS-CoV-2 при оценке по подавлению ЦПД в культуре клеток Vero	214
3.11.2. Активность препаратов против 25 и 200 ТЦД ₅₀ (25 и 72 БОЕ) ЧИКВ при оценке по подавлению ЦПД и бляшкообразования в культуре клеток Vero .	216
3.12. Влияние характеристик препарата вируса на результаты фенотипического скрининга по ингибированию репродукции вируса в культуре клеток на примере ВКЭ.....	218
3.13. Сравнение результатов фенотипического скрининга противовирусной активности в культуре клеток, проведённых разными методами	222
3.13.1. Сравнение результатов фенотипического скрининга активности против ЭВ-А71 в культуре клеток RD с оценкой по ЦПД и доле жизнеспособных клеток, полученных разными лабораториями	222
3.13.2. Сравнение результатов фенотипического скрининга противовирусной активности в культуре клеток, проведённых разными методами, для одной серии производных периленовых нуклеозидов против оболочечных вирусов	228
3.14. Подходы к стандартизации параметров фенотипической оценки противовирусной активности по ингибированию репродукции вируса в культуре клеток	229
3.15. Разработка схемы поиска лекарственных препаратов с использованием фенотипических тестов	232
Глава 4. Заключение.....	235
Глава 5. Выводы	241
Список сокращений и условных обозначений.....	243
Список литературы	247

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Разработка лекарств — это рискованный, дорогостоящий и трудоёмкий процесс, зависящий от междисциплинарных методов создания безопасных и эффективных препаратов. Существует два принципиально различных подхода к поиску лекарств: мишень-направленный (Target-Based Discovery, TDD) и фенотип-направленный (Phenotype-Based Discovery, PDD). Мишень-направленный подход сосредоточен на конкретных молекулярных мишенях, определяющих течение заболевания, тогда как фенотипический подход рассматривает условия развития признаков (фенотипа) заболевания и способы его предотвратить. Фенотип заболевания при этом подразумевает совокупность изменений нормальных клеточных процессов, происходящую при развитии патологии, которую можно описать и количественно оценить.

Прогресс в молекулярной и клеточной биологии, генетике и связанных с ними технологий, ознаменовавший начало XXI века, открыл возможность непосредственно изучать влияние низкомолекулярных соединений на функции конкретных белков. Однако прошедшие десятилетия показали, что TDD имеет свои ограничения ввиду множества факторов, лежащих в основе патогенеза заболевания, в том числе низкой исследованности мишеней, слабого понимания механизма их функционирования при патологии и плохой корреляции модельных систем с заболеваниями человека. При этом даже в годы активного развития и использования TDD, PDD успешно применяли в поиске терапии сложных заболеваний с ограниченным пониманием механизма. Прогресс в области создания клеточных моделей, технологий детекции и изучения механизма действия (Mechanism of Action, MoA) способствовал возрождению фенотипических стратегий поиска новых лекарственных средств и эволюции PDD как нового научного направления, которое предполагает тестирование большого количества соединений в системном подходе с использованием независимого от конкретной

молекулярной мишени метода анализа, который отслеживает фенотипические изменения. Новое понимание фенотипического подхода требует создания своих методов и технологий, в том числе, разработки новых модельных систем и методик оценки изменения фенотипических признаков заболевания. Более того, современный фенотипический подход позволяет не только находить новые лекарственные препараты, но и новые мишени и ассоциированные с ними сигнальные пути, вовлечённые в развитие фенотипа заболевания.

PDD обладает более высоким потенциалом для трансляции результатов *in vivo* и в клиническую практику, чем мишень-ориентированные подходы, ввиду обычно большей биологической релевантности фенотипических модельных тест-систем, которые включают всю сложность клеточных структур и сигнальных путей и позволяют оценивать исследуемые соединения в контексте полноценно функционирующей клетки.

В современной классификации вирусов выделяют более одиннадцати тысяч видов, более двух сотен представляют собой РНК-содержащие вирусы, ассоциированные с заболеваниями человека. Несмотря на значительный прогресс в разработке противовирусных лекарственных средств, на сегодняшний день всего для пары десятков вирусных инфекций применяется специфическая терапия. Это инфекции, вызванные вирусами иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатита В (ВГВ) и С (ВГС), гриппа А, простого герпеса (ВПГ) и ветряной оспы (ВВЗ), SARS-CoV-2 и некоторыми другими. Мутации и появление новых вариантов давно известных вирусов, а также вспышки вирусных инфекций, вызываемых такими малоизученными вирусами, как вирусы Эбола или Зика, делают разработку новых противовирусных препаратов актуальной задачей. Более того, быстрое распространение новых вирусных инфекций по миру, продемонстрированное на примерах лихорадки Зика и пандемии COVID-19, стимулирует поиск новых соединений, обладающих широким спектром противовирусной активности. С одной стороны, это обосновано экономически, поскольку разработка специфических препаратов для лечения десятков вирусных инфекций требует

значительных ресурсов. С другой стороны, такие препараты могут быть первым вариантом выбора для противодействия новым, пока неизвестным инфекциям.

В настоящее время активно проводятся исследования по поиску противовирусных препаратов, однако существует ряд проблем. Значительная часть накопленных данных относится к семействам *Retroviridae*, *Flaviviridae*, *Orthomyxoviridae* и *Coronaviridae*, что объясняется принадлежностью к ним наиболее изученных видов вирусов: ВИЧ-1 и ВИЧ-2, вируса гепатита С, вируса гриппа А и нового вируса SARS-CoV-2. С другой стороны, информация об активности неравномерно распределена по химическим классам соединений. Как правило, наиболее изученными являются известные лекарственные препараты и их аналоги. Таким образом, требуется расширение знаний о спектрах активности известных соединений против различных вирусов, поиск новых классов химических соединений и определение их противовирусной активности, а также целенаправленный поиск противовирусных препаратов широкого спектра действия, которые могли бы быть использованы для противостояния новым вирусным угрозам.

При поиске противовирусных соединений во многих случаях фенотипический подход предпочтителен ввиду отсутствия знаний о конкретных мишенях и молекулярных особенностях развития патогенеза вирусной инфекции. Наиболее прямым способом поиска новых противовирусных соединений является фенотипический скрининг противовирусной активности в интактных клетках против инфекционного вируса по фенотипическим признакам развития вирусной инфекции, например гибель клеток или синтез вирусных белков и геномов. Этот подход даёт возможность определить эффективность ингибирования репродукции вируса в целом, без фиксации на конкретных стадиях вирусного репликативного цикла и белковых мишенях.

Для оценки применимости методики фенотипического исследования противовирусной активности необходимо сначала провести валидацию методики с использованием известных ингибиторов репродукции. Наиболее адекватным контролем для такой оценки могут стать нейтрализующие противовирусные

антитела, а уже затем соединения широкого спектра действия. Валидированную таким образом методику можно использовать для поиска новых противовирусных соединений.

Для описания активности соединения и перспективности его дальнейшего исследования чаще всего используют следующие характеристики: полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}), то есть концентрация соединения, которая оказывает целевой эффект на уровне 50% от максимального; полумаксимальная токсическая концентрация (CC_{50}), то есть концентрацию соединения, которая приводит к токсическому эффекту на уровне 50% от максимального, а также их соотношение – индекс селективности (selectivity index, SI) или терапевтический индекс, который определяется как отношение между концентрацией лекарственного средства, вызывающей терапевтический эффект, и концентрацией этого же средства, при которой наблюдается первый побочный эффект. Методики, используемые в различных лабораториях, позволяют получить значения вышеописанных характеристик для активных соединений. Однако, часто значения, полученные разными лабораториями, сильно отличаются ввиду различий в условиях проведения экспериментов. Следовательно, требуется изучение параметров используемых методов фенотипического тестирования противовирусной активности и разработка подходов к их сравнению и стандартизации.

Для наиболее полного описания активных соединений и отбора соединений-лидеров для дальнейшего доклинического исследования и возможного введения их в клиническую практику, требуется разработка последовательного процесса поиска противовирусных соединений. Такой процесс может быть основан на нескольких фенотипических методиках и должен включать следующие стадии: отбор активных соединений-хитов из большой библиотеки, определение количественных показателей их активности и изучение механизма действия, исследование соотношений структура-активность (Structure-Activity Relationship, SAR) для дизайна наиболее активных и низкотоксичных соединений – которые в итоге

должны приводить к выбору молекулы или серии лидера для дальнейшей разработки.

Степень разработанности темы

На момент начала исследований концепция фенотипического поиска лекарственных препаратов как новое отдельное научное направление только начинала разрабатываться [Eder et al., 2014; Wagner, 2016]. В последние два десятилетия активное развитие технологии позволило перевести многие вирусологические методы из разряда искусства в разряд рутинных экспериментов. В современном мире разработаны десятки подходов для определения противовирусной активности в клеточных тестах или с использованием биохимических подходов [Rumlová, Ruml, 2018]. Все они используются для количественной оценки противовирусной активности соединений многими научными коллективами во всём мире (Rega Institute, Лёвен, Бельгия; Center for Drug Design, University of Minnesota, США; Central South University, Changsha, Китай и многие другие). Однако результаты для одного и того же соединения могут принципиально различаться, что может быть связано как с ограничениями методики, так и с особенностями проведения экспериментов в разных лабораториях.

Для российской вирусологии отдельной проблемой являются невысокий экспериментальный уровень работ и использование устаревшей терминологии для описания результатов, что мешает использовать и сравнивать полученные данные о противовирусной активности.

В рамках работы над изучаемой темой простые и эффективные технологии позволили разработать сравнительно легко реализуемые тест-системы для поиска противовирусных препаратов в рамках фенотип-направленного подхода, начиная от стадии скрининга до определения механизма действия соединения-лидера, а также провести сравнение методик и выявить факторы, определяющих количественные различия при определении противовирусной активности.

Цели и задачи исследования

Цель – разработка и внедрение фенотип-направленного подхода к оценке противовирусной активности соединений *in vitro* для создания лекарственных препаратов против различных РНК-содержащих вирусов.

Задачи:

1. Разработка методик фенотипической оценки противовирусной активности *in vitro* в отношении РНК-содержащих вирусов различных типов и семейств (сем. *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Coronaviridae*, *Picornaviridae* и *Retroviridae*), применимых для скрининга, выявления механизма действия и оценки вирулицидной активности соединений;
2. Определение противовирусной активности соединений различных химических классов с помощью разработанных методик;
3. Выявление контролируемых (стандартизуемых) параметров фенотипических методик скрининга противовирусной активности соединений *in vitro*;
4. Сравнение значений активности, полученных с помощью фенотипических методик с различными способами детекции ингибирования репродукции вируса, в собственных экспериментах и с данными, полученными другими лабораториями;
5. Разработка схемы фенотипического поиска потенциальных противовирусных лекарственных препаратов *in vitro* с помощью разработанных методик с выявлением соединений-лидеров из больших серий соединений для дальнейшего исследования в доклинических и клинических испытаниях.

Выполнение данных задач позволит разработать методики фенотипической оценки противовирусной активности РНК-содержащих вирусов и подходы к их стандартизации; расширить знания об активностях известных соединений против малоизучаемых вирусов, а также расширить пространство химических соединений с известной противовирусной активностью.

Научная новизна

Впервые разработаны и валидированы методики для фенотипического скрининга ингибиторов репродукции вирусов клещевого энцефалита (ВКЭ), Повассан (ПОВ) и омской геморрагической лихорадки (БОГЛ) сем. *Flaviviridae*; вируса Чикунгунья сем. *Togaviridae* и SARS-CoV-2 сем. *Coronaviridae*.

Впервые выявлены низкомолекулярные ингибиторы переносимых клещами ортофлавивирусов (ВКЭ, ПОВ, БОГЛ) путём фенотипического скрининга противовирусной активности *in vitro*.

Впервые проведено сравнение количественных показателей противовирусной активности, полученных с использованием различных методик фенотипического скрининга *in vitro* (на примере ВКЭ сем. *Flaviviridae*; вируса Чикунгунья сем. *Togaviridae*; SARS-CoV-2 сем. *Coronaviridae*; энтеровирусов видов А, В и С сем. *Picornaviridae*).

Разработаны подходы к стандартизации параметров методик фенотипического скрининга противовирусной активности *in vitro* в отношении литических РНК-содержащих вирусов.

Теоретическая значимость работы

Выявлены параметры фенотипического определения противовирусной активности *in vitro*, влияющие на результаты исследования: метод оценки, характеристики вируса (штамм, доза) и вирусного препарата.

Проведено сравнение параметров методик фенотипической оценки противовирусной активности с разными способами оценки ингибирования репродукции вируса и показано, что количественные показатели активности, полученные в одинаковых условиях статистически достоверно не различаются:

- в реакциях ингибирования бляшкообразования и фокусообразования вируса клещевого энцефалита;
- в реакциях ингибирования энтеровирус-индуцированного ЦПД с расчётом показателя методом Кербера и по метаболизму резазурина с расчётом показателя методом аппроксимации нелинейной функцией;

- в реакциях ингибирования вирус-индуцированного ЦПД и бляшкообразования вируса Чикунгунья, при этом значения в тесте ингибирования бляшкообразования всегда ниже.

Практическая значимость работы

Разработаны, апробированы и внедрены в лабораторную практику методы фенотипического скрининга противовирусной активности соединений, начального определения механизма их действия и оценки вирулицидной активности в отношении различных возбудителей социально значимых инфекционных заболеваний (БКЭ, ПОВ и ВОГЛ сем. *Flaviviridae*; вирус Чикунгунья сем. *Togaviridae*; SARS-CoV-2 сем. *Coronaviridae*; энтеровирусов видов А, В и С сем. *Picornaviridae*; ВИЧ-1 сем. *Retroviridae*), которые могут быть использованы для разработки противовирусных профилактических и/или лекарственных препаратов. Разработанные методики позволяют выявлять молекулы с противовирусной активностью, определять количественные показатели активности и цитотоксичности, проводить анализ соотношений структура–активность (SAR) для серии активных молекул и выявлять стадию вирусного репликативного цикла, на которую действует соединение-ингибитор.

Эффективность разработанных методик фенотипической оценки противовирусной активности подтверждена выявлением новых низкомолекулярных ингибиторов репродукции представителей родов *Orthoflavivirus* (БКЭ, ПОВ, ВОГЛ), *Enterovirus* (виды ЭВ-А, ЭВ-В, ЭВ-С), *Betacoronavirus* (SARS-CoV-2), *Alphavirus* (ЧИКВ) и *Lentivirus* (ВИЧ-1).

Разработанные методики фенотипического скрининга противовирусной активности *in vitro* позволяют проанализировать от 300 до 2500 соединений в одном эксперименте без применения роботизированных технологий. А также могут стать основой для разработки автоматизированных систем для высокоэффективного скрининга.

Предложена схема поиска потенциальных лекарственных препаратов против РНК-содержащих вирусов на основе комбинации фенотипических методик

определения противовирусной активности и токсичности *in vitro* с выявлением соединений-лидеров для последующего исследования в доклинических и клинических испытаниях.

Методология и методы исследования

Основными методами, используемыми в рамках данной работы, стали:

- фенотипическая оценка противовирусной активности соединений на основе количественной оценки ингибирования репродукции вируса в культуре клеток, детектируемого различными способами: подавление образования бляшек/фокусов и проявления признаков вирус-индуцированного цитопатического действия (ЦПД), снижения накопления инфекционного вируса;
- методы титрования в культуре клеток методами бляшкообразования или цитопатического действия;
- методики определения цитотоксичности соединений на основе микроскопических изменений морфологии, снижения жизнеспособности и гибели клеток;
- секвенирование по Сэнгеру и по технологии Illumina для генетического описания новых штаммов вирусов;
- трансмиссионная электронная микроскопия для описания структуры вирионов;
- статистические методы обработки и сравнения результатов экспериментов.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в работе с литературными источниками, непосредственном проведении экспериментов (планирование, разработка протоколов экспериментов, руководство и постановка экспериментов), сборе и анализе экспериментальных данных, написании и подготовке к печати публикаций и написании диссертации.

Оценка цитотоксичности и противовирусной активности соединений проводилась при участии к.х.н. Дугево́й Е.В., к.х.н. Орлова А.А., научных сотрудников Хвато́ва Е.В., Шустовой Е.Ю., Волока В.П., студентов Золотаре́вой (Голинец) А.Д., Карповой Е.В., Черникова В.С., Колпаковой Е.С., Яковчук Е.В., Бородулиной М.О., Коручекова А.А. Исследования с незрелыми вирионами проводились к.б.н. Тучинской К.К. и Кучиной (Илларионовой) В.В. Непосредственные исполнители экспериментов указаны в главах Материалы и методы (глава 2) и Результаты и их обсуждение (глава 3).

Положения, выносимые на защиту

1. Разработаны, апробированы и внедрены в лабораторное использование методики фенотипической оценки цитотоксичности и скрининга противовирусной активности соединений, начального определения механизма их действия, а также определения вирулицидной активности *in vitro* в отношении переносимых клещами вирусов рода *Orthoflavivirus*, вирусов трёх видов рода *Enterovirus*, нового вируса SARS-CoV-2 рода *Betacoronavirus*, а также вируса Чикунгунья рода *Alphavirus* и ВИЧ-1 рода *Lentivirus*;
2. Разработанные фенотипические методики можно применять для определения противовирусной активности соединений различных химических классов, а также сложных смесей природного происхождения, таких как гуминовые субстанции и растительные экстракты, с последующей разработкой соотношений структура-активность (structure-activity relationship, SAR) для оптимизации соединения-лидера;
3. С использованием разработанных методик фенотипического скрининга противовирусной активности *in vitro* выявлены новые, в том числе «первые в своём классе», низкомолекулярные ингибиторы переносимых клещами вирусов рода *Orthoflavivirus*, вирусов трёх видов рода *Enterovirus*, нового вируса SARS-CoV-2 рода *Betacoronavirus*, а также вируса Чикунгунья рода *Alphavirus* и ВИЧ-1 рода *Lentivirus*;

4. Стандартизуемыми параметрами тест-систем фенотипического скрининга противовирусной активности *in vitro* являются: метод скрининга, характеристики вируса (штамм, доза) и вирусного препарата (например, соотношение инфекционных и неинфекционных частиц);
5. Количественные показатели противовирусной активности, полученные в одинаковых условиях в фенотипических тестах *in vitro*, статистически значимо не различаются:
 - в реакциях ингибирования бляшкообразования и фокусообразования вируса клещевого энцефалита;
 - в реакциях ингибирования энтеровирус-индуцированного ЦПД с расчётом показателя методом Кербера и по метаболизму резазурина с расчётом показателя методом аппроксимации нелинейной функцией;
 - в реакциях ингибирования вирус-индуцированного ЦПД и бляшкообразования вируса Чикунгунья, при этом значения показателя в тесте ингибирования бляшкообразования всегда ниже.
6. Схема поиска потенциальных лекарственных препаратов против РНК-содержащих вирусов, разработанная на основе комбинации методик фенотипической оценки противовирусной активности *in vitro*, позволяет выявлять соединения-лидеры для последующего исследования в доклинических и клинических испытаниях.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов определяется повторами экспериментов и большим набором экспериментальных данных, использованием статистических методов и современного программного обеспечения для обработки результатов проведённых экспериментов. Все полученные результаты воспроизводимы и статистически достоверны.

Апробация результатов

Результаты работы представлены на российских и международных конференциях, симпозиумах и совещаниях: Симпозиум биоинформатика и компьютерное конструирование лекарств, конгресс «Человек и лекарство», Москва, Россия, 12-13 апреля 2010 г.; XXII International Symposium in Medicinal Chemistry ChemMedChem, Берлин, Германия, 2-6 сентября 2012; 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry, MedChem 2015, Новосибирск, Россия, 5-10 июля 2015 г.; 4th Antivirals congress, Sitges, Barcelona, Spain, 18-21 сентября 2016 г.; XXIV Международная молодёжная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, Россия, 10-14 апреля 2017г.; 4th Russian Conference on Medicinal Chemistry with international participants, MedChem 2019, Екатеринбург, Россия, 10-14 июня 2019 г.; Markovnikov Congress on Organic Chemistry, Москва-Казань, Россия, 21-28 июня 2019 г.; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Научная поддержка противоэпидемических мер в здравоохранении: проблемы и решения», посвящённая 100-летию создания ННИЕМ, Нижний Новгород, Россия, 11-12.09.2019 г.; VIII Международная научно-практическая конференция молодых учёных биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio, Кольцово, Россия, 2021 г.; IX Международная научно-практическая конференция молодых учёных биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio, Кольцово, Россия, 2022 г.; XXIX Международная молодёжная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, Россия, 12-22 апреля 2022 г; XXXIV Международная зимняя молодёжная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, Россия, 8-11 февраля 2022 г.

Работа по поиску ингибиторов репродукции энтеровирусов была удостоена диплома 1-й степени конкурса молодых учёных Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Научная поддержка

противоэпидемических мер в здравоохранении: проблемы и решения», посвящённая 100-летию создания ННИЕМ, Нижний Новгород, Россия, 11-12.09.2019 г.

С использованием разработанных методик фенотипической оценки противовирусной активности низкомолекулярных соединений показана активность производных изоксазолов в ингибировании репродукции вирусов, относящихся к роду *Orthoflavivirus*, и получен патент №2733945 «Замещённые изоксазолы, композиции на их основе, обладающие противовирусной активностью, и способ их применения».

Последовательности геномов штаммов SARS-CoV-2 были депонированы в базы данных GISAID и VGARus.

Публикации по теме диссертации

Результаты диссертационного исследования опубликованы в 37 научных работах, из них работ, опубликованных согласно Перечню рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук (Перечень ВАК) – 37, в том числе работ в научных изданиях, индексируемых базами Scopus и/или Web of Science – 34. Получено патентов на изобретение в РФ – 1.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из основных разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы (включает из 373 ссылок). Работа включает 44 рисунка и 67 таблиц. Общий объём диссертации 294 страниц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Поиск новых лекарственных препаратов

Скрининг биологической активности химических соединений является краеугольным камнем усилий по открытию новых лекарственных препаратов в химической биологии. Как правило, скрининги разделяют на мишень- и фенотип-направленные. Мишень-направленный подход сосредоточен на конкретных молекулах (таких как белки) и часто использует биохимические и биофизические методы для идентификации модуляторов. Эта стратегия во многих случаях уместна и даже предпочтительна, но в других случаях фенотипический подход предпочтителен ввиду отсутствия знаний о конкретных мишенях. В этих случаях обнаружение мишени может быть столь же важным, как и обнаружение малых молекул. Прогресс в области создания клеточных моделей, технологий детекции и изучения механизма действия (Mechanism of Action, MoA) способствовал возрождению фенотипических стратегий поиска новых лекарственных средств.

1.1.1. Мишень-направленный поиск новых лекарственных препаратов (Target-Based Drug Discovery, TDD)

Мишень-направленный поиск лекарственных препаратов основан на анализе взаимодействия соединений с конкретной молекулой, которая определяет развитие процесса заболевания. TDD невозможен без успехов молекулярной биологии, синтетической и медицинской химии. По мере описания структуры и функций ферментов, рецепторных молекул, сигнальных путей, появления новых технологий рекомбинантных ДНК и т.д. выявлялись белки-мишени, а также создавались молекулярные тест-системы для оценки их взаимодействия с соединениями (Рисунок 1) [Zheng et al., 2013].

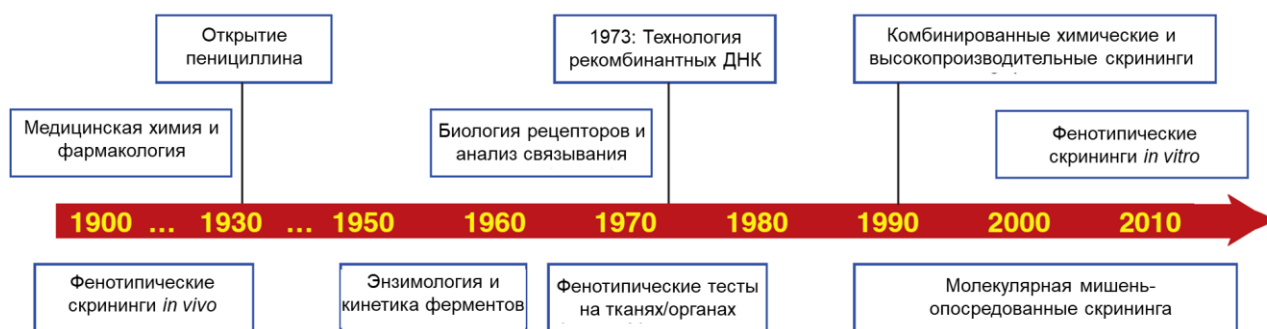


Рисунок 1 – Эволюция поиска лекарственных средств и выбора соединений-лидеров [адаптировано из Zheng et al., 2013]

Мишень-направленный подход к поиску лекарств, также называемый «обратной фармакологией» или «обратной химической биологией» [Takenaka, 2001; Darvas et al., 2004; Vogt, Lazo, 2005], начинается с идентификации белка-мишени, относящейся к интересующему заболеванию. Молекулярные мишени обычно выявляются в ходе фундаментальных исследований, которые включают эксперименты на животных моделях и клинические наблюдения. Как только подходящая мишень идентифицирована, начинается разработка и валидация молекулярного теста для оценки взаимодействия с ней соединений-ингибиторов, после чего следует высокопроизводительный скрининг (high throughput screening, HTS) библиотек химических соединений для выявления активных соединений-хитов, чаще всего, это ингибиторы ферментов или антагонисты рецепторов. Наиболее активные соединения-хиты, обычно представители одной–трёх серий, затем валидируются в других тестах, которые более физиологически связаны с заболеванием. Далее следует оптимизация структуры активного соединения-лидера путём характеристики SAR серии соединений с целью улучшения фармакокинетических и фармакодинамических характеристик. Только несколько активных соединений-лидеров с определённым механизмом действия и продемонстрированной эффективностью на моделях заболеваний могут перейти на доклиническую стадию, к токсикологическим исследованиям и, возможно, к клиническим испытаниям (Рисунок 2А) [Zheng et al., 2013].

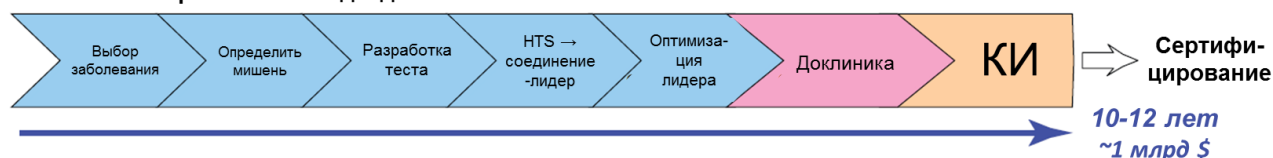
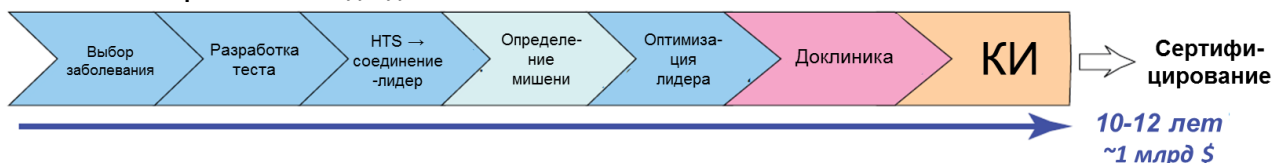
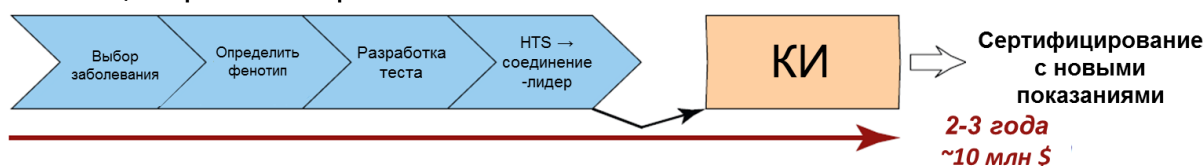
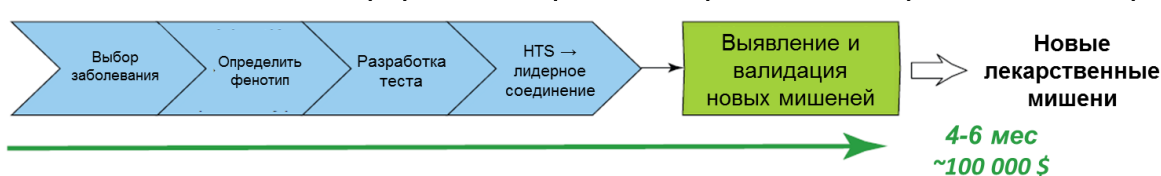
А. Мишень-направленный подход:**Б. Фенотип-направленный подход:****В. Репозиционирование лекарств:****Г. Выявление новых мишеней при репозиционировании лекарств с помощью фенотипического скрининга:**

Рисунок 2 – Сравнение мишень- и фенотип-направленного подходов при открытии и разработке лекарств. (А) Мишень-направленная разработка лекарств обычно занимает 12 лет и обходится в среднем в 1 миллиард долларов; (Б) Для фенотип-направленного исследования нет необходимости знать мишень, она может быть определена или не определена после выявления соединения-лидера; (В) Репозиционирование лекарств посредством фенотипического скрининга имеет потенциал для быстрой разработки лекарств, при которой нет необходимости в проведении длительной доклиники, что значительно экономит время и стоимость разработки; (Г) Репозиционирование лекарств также может быть использовано для идентификации новых мишеней для лечения малоизученных заболеваний [адаптировано из Zheng et al., 2013].

1.1.2. Фенотип-направленный поиск новых лекарственных препаратов (Phenotype-based drug discovery, PDD)

В разное время термин PDD понимали немного по-разному, изначально воспринимая его как любой не мишень-направленный поиск препаратов. Сейчас этот термин понимается и используется в большинстве исследовательских лабораторий как тестирование большого количества (в большинстве случаев случайно выбранных) соединений в системном подходе с использованием независимого от молекулярной мишени анализа, который отслеживает фенотипические изменения [Eder et al., 2014]. Фенотип-направленный подход к скринингу для открытия новых лекарств также называют «прямой

фармакологией», «классической фармакологией» или «прямой химической биологией» [Takenaka, 2001; Darvas et al., 2004; Vogt, Lazo, 2005]; причем молекулярный механизм и белок-мишень могут оставаться неизвестными даже после определения активности и эффективности лекарства. При этом стоит различать фенотип-направленный и «хемоцентрический» подходы к поиску активных соединений. Хемоцентрический подход обычно включает идентификацию активного компонента растительного, микробного или другого экстракта с известной фармакологической активностью или дериватизацию фармакологически активного природного вещества, часто на основе случайных открытий, сделанных за несколько десятилетий до этого [Eder et al., 2014].

Исторически сложилось так, что открытие лекарств носило фенотипический характер: новые лекарства обнаруживались либо случайно, как в случае с пенициллином, либо с помощью разработанных бактерицидных скринингов для обнаружения новых антибиотиков [Pina et al., 2009].

Для разработки современных фенотипических тестов используются клеточные характеристики, связанные с заболеванием, позволяющие различить нормальный и патологический фенотип. Под патологическим фенотипом или «фенотипом заболевания» понимают совокупность изменений нормальных клеточных процессов, происходящую при развитии патологического процесса, которую можно описать и количественно оценить: накопление амилоида нейрональными клетками как модель болезни Альцгеймера [Brownjohn et al., 2017]; гибель, снижение скорости пролиферации раковых клеток или неспособность формировать сфероиды как модель развития опухоли [Centonze et al., 2023]; определённое изменение профиля экспрессии генов (транскриптома) [Yang et al., 2020] при соматических заболеваниях; гибель клеток или накопление вирусных белков и геномов как модель вирусной инфекции и т.п. Затем проводят скрининг библиотеки соединений для выявления активных соединений-хитов, которые подавляют проявление патологического фенотипа, например, путем избирательного уничтожения раковых клеток [Yuan et al., 2012] или элиминации патогенов в культуре [Chen et al., 2012]. Далее могут быть отобраны соединения-лидеры из

первичных активных соединений-хитов со знанием мишени или без него, хотя идентификация молекулярной мишени может существенно облегчить изучение соотношений структура-активность (SAR) и проведение дальнейшей оптимизации лидера (Рисунок 2Б). Оптимизированная молекула-лидер направляется в доклинические и клинические исследования. Фенотипические тесты обычно более физиологически релевантны, поскольку используются интактные клетки и нативная клеточная среда, а также при этом могут быть выявлены активные метаболиты пролекарств.

Первичные активные соединения-хиты, выявленные при фенотипическом скрининге, потенциально могут быть нацелены на разные типы белков (рецепторы, ферменты, факторы транскрипции и т.д.) и даже на разные сигнальные пути. Фенотипический скрининг как «прямая фармакология» позволяет обнаруживать лекарства против многих заболеваний, в том числе со сложными механизмами развития, включая нейродегенеративные заболевания, такие как болезни Альцгеймера и Паркинсона, для которых конкретный белок-мишень не была идентифицирована, а в клинических испытаниях было много неудачных лекарств-кандидатов, отобранных на основе мишень-направленного скрининга [Zheng et al., 2013].

Многие из давно одобренных лекарств были открыты с использованием фенотипического подхода и одобрены регулирующими органами до того, как были определены их точные механизмы действия или белковые мишени. Самым известным примером можно считать аспирин (ацетилсалициловая кислота), для определения механизма действия и молекулярной мишени которого потребовалось почти 100 лет [Vane, Botting, 2003]. Даже сегодня регулирующие органы по всему миру одобряют новые препараты, не требуя точного механизма действия или молекулярной мишени, если препарат эффективен в лечении заболевания и безопасен для пациентов. Однако, следует отметить, что углубленная характеристика свойств лекарственного средства, включая механизм действия и молекулярные мишени, может помочь в разработке улучшенных соединений следующего поколения с меньшими побочными эффектами [Zheng et al., 2013].

Другое применение фенотип-направленных тестов заключается в выявлении новых показаний к применению известных лекарств – репозиционирование. Это может сэкономить время и ресурсы при поиске лекарств, а также снизить риск неудачи на ранних стадиях клинических испытаний [Reaume, 2011; Ashburn, Thor, 2004]. Этот подход особенно полезен при разработке потенциальных методов лечения редких и малоизученных, а также игнорируемых или мало изучаемых заболеваний, когда необходимо найти эффективное лекарство с минимально возможными затратами (Рисунок 2В) [Zheng et al., 2013]. Кроме того, фенотипический скрининг одобренных лекарств с известными фармакологическими свойствами и механизмом действия в отношении определенного фермента, рецептора или другой молекулы может продемонстрировать роль этой молекулярной мишени в развитии другого патологического процесса, моделируемого фенотипическим тестом. Информация, полученная в результате фенотипического скрининга, может быть использована для программы разработки новых лекарств после подтверждения новой мишени (Рисунок 2Г) [Zheng et al., 2013].

1.1.2.1. Фенотипические тесты in vitro (на клеточных культурах)

Благодаря достижениям в области технологий производительность фенотипического скрининга значительно увеличилась за последние десятилетия. Разработаны роботизированные платформы для скрининга и высокочувствительные системы детекции, которые позволяют уменьшить объём одной реакции и проводить быстрый скрининг больших библиотек химических соединений. В отличие от молекулярных тест-систем с использованием очищенных (рекомбинантных) белков, клеточные фенотипические тесты учитывают биологическую сложность клетки с системой взаимодействующих белков и сигнальных путей, включая также проникновение в клетку и выведение из неё, сохраняя при этом возможности HTS. Для фенотипических тестов обычно используют первичные клеточные линии человека, иммортализованные клеточные линии (первичные или генно-инженерные) или специфические типы клеток,

дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных из клеток пациента или нормальных клеток человека [Zheng et al., 2013].

Можно выделить три типа фенотипической оценки, которые обычно используются для поиска потенциальных активных соединений: анализ жизнеспособности клеток, анализ клеточных сигнальных путей и анализ патологического фенотипа. Эти тесты могут быть миниатюризованы до роботизированной платформы, обеспечивающей сравнительно высокую производительность скрининга. Они идентифицируют активные соединения, которые вызывают изменение фенотипа клеток как уничтожение патогенов или раковых клеток, активацию или ингибирование сигнального пути и нормализацию фенотипического изменения клеток, связанного с патологией. Кроме того, доступны другие типы фенотипических тестов, включая детекцию признаков клеточной смерти (аутофагия, апоптоз, некроз), стадий клеточного цикла, инфицирования клеток, подвижности клеток, секрецию макромолекул, перестройку цитоскелета, ядерный транспорт, интернализацию рецепторов, рост нейритов и другое [Zheng et al., 2013].

1.1.3. Фенотип-направленный (PDD) и мишень-направленный (TDD) поиск новых лекарственных препаратов – сравнение подходов

К началу 21 века мишень-направленный скрининг стал основным подходом к поиску лекарств. Рецепторы, связанные с G-белком, ионные каналы и ферменты являются наиболее распространенными и успешными молекулярными мишенями для открытия лекарств [Drews, 1996; Hopkins, Groom, 2002; Imming et al., 2006; Rask-Andersen et al., 2011]. Нет никаких сомнений в том, что мишень-направленный поиск имеет некоторые явные преимущества перед фенотипическими тестами (Таблица 1) [Zheng et al., 2013].

Молекулярная мишень и связанный с ней скрининговая тест-система часто имеют важное значение для последующей химической оптимизации соединений-лидеров и необходимы для полной характеристики SAR. Кроме того, знание

молекулярной мишени может помочь в проведении токсикологических исследований. Разработка биомаркеров, необходимая для оценки лекарственного эффекта на животных моделях и проведении клинических испытаний, также упрощается для препаратов с известной молекулярной мишенью [Zheng et al., 2013].

Таблица 1 – Сравнительная характеристика мишень-направленного и фенотипического *in vitro* скрининга для поиска соединений-лидеров [адаптировано из Zheng et al., 2013]

Характеристика	Мишень-направленный скрининг		Фенотипический скрининг <i>in vitro</i>	
	Преимущества	Недостатки	Преимущества	Недостатки
Молекулярная мишень	Известна	Необходимо знать	Не надо знать	Неизвестна
Эффективность скрининга и тест	Высокая; сравнительно легко разработать	Тест может быть биологически нерелевантным	Средняя или низкая; биологически релевантный	Может быть низкой; может быть дорогим
Механизм действия соединения-лидера	Известен при разработке; может ускорить доклинику	Ограниченная возможность для определения нового механизма	Разнообразные мишени могут быть задействованы, различные нативные молекулы и комплексы	Неизвестна при разработке
Метод подтверждения соединения-лидера	Тесты по прямому связыванию, кристаллография и другие биофизические методы	Необходимо подтверждение в клеточных и фенотипических тестах с нативными мишенями и комплексами	Можно быстро переходить к исследованиям <i>in vivo</i>	Может быть необходимо выявление мишени, сложное и длительное
Методы оптимизации SAR	Очень простые и доступные	–	Дополнительные тесты могут быть необходимы для разработки SAR	Возможна необходимость разработки нового мишень-направленного теста
Отношение соединения-лидера к заболеванию	Прямое, если тест релевантный	Мишень может не относиться к заболеванию, обнаружено по отсутствию эффективности на поздних стадиях клинических испытаний	Обычно релевантен по отношению к заболеванию; может быть направлен на более сложные заболевания	–
Ограничение гипотезы активности соединения-лидера	–	Ограничено гипотезой	Менее ограничено гипотезой	–

В последние годы пришлось признать, что поиск лекарств в рамках мишень-направленного скрининга имеет свои ограничения. Анализ показал, что высокие показатели отсева в клинических испытаниях II и III фазы в основном связаны с

недостаточной эффективностью препарата [Arrowsmith, 2011 a,b]. Отсутствие эффективности лекарств на поздних стадиях разработки может быть результатом множества факторов, в том числе плохой корреляции животных моделей с заболеваниями человека и неподтверждённой мишени. Несмотря на большое количество потенциальных мишеней, обнаруженных в ходе различных проектов, в том числе «Геном человека», было выявлено слишком мало мишеней, которые отвечали бы критериям релевантности к заболеванию и оценке безопасности [Berg et al., 2021]. В работах Rask-Andersen и коллег [2011] и Overington и коллег [2006] обсуждается, что количество проверенных молекулярных мишеней, доступных в настоящее время для разработки лекарств, по-видимому, более ограничено, чем считалось ранее. Таким образом, идентификация новых молекулярных мишеней для лекарств остается нерешённой задачей биомедицинских исследований.

Успех мишень-направленного скрининга в открытии новых лекарств («первых к своём классе») также недавно оказался под вопросом. Анализ новых лекарств, которые были одобрены FDA в течение 10-летнего периода с 1999 по 2008 год, показал, что из «первых в своём классе» лекарств, представляющих собой малые молекулы, 28 были обнаружены в результате фенотипического скрининга, тогда как 17 были получены в результате мишень-направленного исследования [Swinney, Anthony, 2011]. Учитывая, что начало 2000-ых, когда внимание и инвестиции были сильно смещены в сторону мишень-направленных подходов, очевидно больший успех фенотипического скрининга в открытии инновационных низкомолекулярных лекарств указывает на недостаточность накопленных знаний для мишень-направленного поиска в настоящий момент.

Однако, не следует отдавать предпочтение только фенотипическим или мишень-направленным тестам, поскольку оба подхода дополняют друг друга и должны работать параллельно [Williams, 2005]. Хотя обнаружение молекулярных мишеней или конкретных механизмов для препаратов, выявленных в ходе фенотипического скрининга, не обязательно для дальнейшей разработки лекарств, это может быть преимуществом для того, чтобы обнаружить дополнительные пути для терапевтического воздействия на основе мишеней или для открытия

последующих препаратов [Eder et al., 2014]. Сочетание комплексного фенотипического скрининга и исследований механизма действия позволяет получить знания об открытых малых молекулах, токсикологии, возможности репозиционирования препаратов по новым показаниям, фармакодинамике и полифармакологии. В конечном счете большое преимущество фенотипического подхода заключается в том, что соединения-лидеры имеют бóльшую биологическую релевантность и вероятность успеха на более поздних стадиях разработки лекарств [Wagner et al., 2016].

В последнее десятилетие подходы к поиску лекарственных препаратов включают как фенотипические, так и мишень-направленные подходы. Сочетание этих подходов может сделать открытие лекарств более успешным и способствовать лучшему пониманию механизмов действия лекарств и биологии заболеваний [Lee, Berg, 2013]. Фенотипические тесты вносят вклад в наше понимание биологии болезни двумя способами: непосредственно через выявление новых лекарств и косвенно путём идентификации мишеней для разработки тест-систем для TDD [Berg, 2017]. Конвергенция и избыточность путей и мишеней требуют более физиологически релевантных тестов, таких как первичные клеточные или тканеспецифичные модели, чтобы обеспечить необходимое внимание к соответствующему тканевому контексту. Улучшение соответствия фенотипических тестов заболеваниям и способность извлекать максимальную механистическую информацию из этих тестов повлияет на эффективность фармацевтических исследований путем улучшения нашего понимания заболеваний и предотвращения механизмов токсичности.

1.1.4. Фенотипический скрининг как новый подход к поиску новых лекарственных препаратов

Был предпринят ряд эволюционных шагов для повышения эффективности и коэффициента полезного действия (КПД) мишень-направленного поиска лекарств, и были решены некоторые первоначальные проблемы. В частности, подход к открытию кандидатов в лекарства был установлен как линейная

последовательность отдельных этапов: идентификация мишени, разработка тестов, поиск и проверка соединений-хитов, оптимизация соединений-лидеров и доклиническая разработка. При этом каждый этап оптимизировали отдельно для увеличения производительности и/или эффективности. Предполагалось, что всё большее количество высокопроизводительных скринингов повысит КПД поиска новых лекарств. Сегодня фармацевтическая промышленность в значительной степени отказалась от экстенсивного поиска поскольку он, похоже, препятствует творчеству, инновациям и, в конечном счете, производительности [Sams-Dodd, 2013]. Несмотря на все улучшения, достигнутые за последние десятилетия в направлении более эффективного поиска лекарств, проблема эффективности и КПД остается существенной, особенно в отношении открытия «первых в своём классе» препаратов. Также существует мнение, что в некоторых областях биологии заболеваний набор очевидных лекарственных мишеней уже исчерпан, и новые механизмы развития патологии должны быть открыты через наблюдения за клеточными фенотипами [Wagner, 2016]. В этом контексте фенотипический поиск может стать важным фармакологическим инструментом для изучения биологии в более быстром темпе, чем классические хемоцентрические системные подходы [Lokey, 2003; Hall, 2006; Pruss, 2010; St Obge et al., 2012]. Более того, пробелы в нашем понимании биологии заболеваний и механизмов токсичности лежат в основе многих неудач в разработке лекарств и продолжают оказывать сильное негативное влияние на производительность фармацевтической промышленности [Scannel, Bosley, 2016; Plengem, 2016].

Таким образом, фенотипический подход как тестирование большого количества (в большинстве случаев случайно выбранных) соединений в системном подходе с использованием независимого от мишени анализа, который отслеживает фенотипические изменения, является новой дисциплиной.

Как уже упоминалось выше, анализ больших массивов химико-биологических данных, полученных в фенотипических тестах, может привести к успешной идентификации механизмов действия мишеней и сигнальных путей, а также к открытию новых знаний о биологии заболеваний. Эта новая дисциплина

может открыть новые терапевтические принципы и молекулярные пути патогенеза заболеваний, которые в настоящее время не поддаются лечению [Fishman, Porter, 2005]. В последнее время появился ряд примеров потенциальных лекарств, полученных в результате фенотипического скрининга [Welch et al., 2007; Rotmann et al., 2010; Butchbach et al., 2010; Chen et al., 2009], например, ингибиторы бромодомена [Filippakopoulos et al., 2010] и ингибиторы NS5A вируса гепатита С [Gao et al., 2010; Hezode et al., 2015]. Однако большинство одобренных лекарств, открытых с помощью фенотипического скрининга, являются либо антиинфекционными (противовирусными, антибактериальными), либо антипролиферативными препаратами.

Одной из основных проблем фенотипического скрининга является отбор нескольких интересных соединений из большого списка активных хитов, который содержит тысячи молекул и в котором часто преобладают неселективные или токсичные соединения, с нежелательными механизмами действия или ложноположительными результатами. Обычно количественная величина биологической активности является единственным критерием, по которому выбираются соединения для дальнейших исследований, но этот критерий может быть непригоден для выявления оптимальных химических структур. Таким образом, для развития фенотипических исследований как новой дисциплины требуется разработка методологии и подходов для повышения успешности фенотипических тестов. Например, многие заболевания сегодня все еще трудно точно отразить в виде тестовых панелей и модельных организмов, а использование технологии стволовых клеток или скрининга на уровне организма может позволить создать более физиологичные системы анализа, которые лучше отражают реальное заболевание.

Важно признать, что фенотипический поиск – это новая дисциплина, которая нуждается в новых технологиях и методах. Фенотипический скрининг следует рассматривать не как неоклассический подход, который возвращается к якобы более успешному системному методу прошлого, а как логическое развитие текущей методологии мишень-направленного поиска лекарств [Eder et al., 2014].

Более того, фенотипический скрининг требует дальнейшего технологического прогресса, разработки новых модельных систем и методик оценки изменения фенотипа.

1.1.4.1. Разработка, оптимизация и валидация методик фенотипического скрининга для поиска лекарственных препаратов

Методы для улучшения физиологической релевантности фенотипических тестов и эффективного моделирования биологии человеческих тканей помогут не только выявлению новых лекарственных препаратов, но и принесут пользу испытаниям на безопасность. Фенотипические тесты *in vitro*, позволяющие оценить воздействия химических соединений на аспекты человеческой биологии, внедряются в качестве потенциальной альтернативы испытаниям на животных [Stephens et al., 2013].

Согласно современным рекомендациям тест-система фенотипического поиска должна подчиняться «правилу трёх» [Vincent et al., 2015; 2020]: (1) высокорелевантные заболеванию системы для анализа (тип клеток), (2) релевантный заболеванию клеточный стимул (например, не следует использовать перекись водорода для моделирования окислительного стресса), и (3) результаты анализа, близкие к клинически желаемому результату. Эти рекомендации представляют собой практический взгляд на исследования, который облегчает связь между исследованиями *in vitro* и клинически важным результатом. Методы, построенные на этих принципах, учитывают понимание биологии заболевания и механизмов токсичности и продемонстрировали клиническую значимость [Berg, 2014]. Разработан и более расширенный список принципов, охватывающий всё от целей анализа, выбора среды и клинически значимой дозировки до микрофизиологических аспектов и выбора типов клеток [Horvath et al., 2016], но он более важен для разработки препаратов против соматических заболеваний, нежели инфекционных. Для *in vitro* тест-систем существует множество характеристик для оптимизации, но для определения того, какие из них являются наиболее

критическими для соответствия заболеванию, требуется сравнение с клиническими данными.

В современной практике валидация фенотипических тестов на предмет их релевантности к заболеваниям человека определяется в основном с помощью специализированных корреляционных исследований. Корреляции устанавливаются с помощью многочисленных подходов омиксного профилирования (транскриптомика, протеомика, метаболомика, высококонтентный анализ и другие), которые, несмотря на технологический прогресс, являются сложными и дорогостоящими [Berg, 2014]. Этот подход скорее необходим и применим для анализа лекарств против соматических заболеваний. По этим причинам химическая биология является более привлекательным вариантом для проведения валидации фенотипических тестов. В настоящее время относительно стандартным для лабораторий является проверка референтной библиотеки соединений для оценки правильности и воспроизводимости результатов высокопроизводительного тестирования. Обычно это сравнительно небольшие серии соединений (500-1200 соединений), которые часто тестируются в режиме скрининга, главным образом для того, чтобы получить представление о количестве активных соединений или выявления соединений-лидеров [Seashore-Ludlow et al, 2015; Hughes et al., 2011; Paricharak et al., 2016]. Столь значительное количество соединений необходимо для всестороннего описания реакций новой тест-системы на уже известные соединения, для понимания учитываемых тестом механизмов и сигнальных путей.

В случае скрининговых методик противовирусных соединений валидация набором известных химических соединений с определёнными мишенями кажется наиболее релевантной и достаточной.

1.1.4.2. Фенотипические тесты для первичного скрининга

Целью первичного скрининга при фенотип-направленном поиске лекарств является обнаружение химических соединений, которые будут модулировать соответствующую биологию заболевания. Это может быть сложной задачей, если

биология заболевания недостаточно хорошо изучена, поэтому характеристики теста, которые моделируют клинический ответ или исход очень важны. Также важно, чтобы методика первичного скрининга была хорошо охарактеризована референтными соединениями. Многие системы фенотип-направленного поиска лекарств не готовы к количеству и разнообразию механизмов, которые могут быть задействованы в фенотипическом скрининге [Berg, 2021]. Предварительная идентификация потенциальных механизмов и понимание того, какие сигнальные пути и механизмы могут быть задействованы в первичном скрининге, являются важным первым шагом для разработки, и позволяют уменьшить задержки в процессе исследований [Swinney, Lee, 2020].

1.1.4.3. Фенотипические тесты для поиска механизма действия

Надежные фенотипические платформы очень привлекательны благодаря широкому охвату механизмов, в том числе ещё неизвестных, которые позволяют идентифицировать активные соединения в PDD.

Фенотипические подходы, доступные для классификации механизма действия, имеют свои преимущества и могут различаться по своему охвату биологии моделируемого процесса [Vincent et al., 2015; Moffat et al., 2017]. Фенотипические платформы, которые успешно использовались для классификации соединений на основе механизма их действия, включают подходы, основанные на многопараметровом анализе клеток, профиле транскрипции и белковых биомаркерах. Более того, уровни экспрессии генов и белковых маркеров, полученные на основе профилей транскрипции или трансляции, могут быть непосредственно применены при переходе в клинику как количественные показатели для оценки лечебного эффекта. Возможно, для определения механизма действия потребуется рассмотреть один или несколько подходов, в зависимости от количества исследуемых соединений и биологических аспектов заболевания, смоделированных в первичном скрининге [Berg, 2021].

1.1.4.4. Применение фенотипических тестов для выбора одного или серии соединений-лидеров

В зависимости от количества активных соединений-хитов в первичном скрининге, их активности и доказательств соотношения структура-активность (SAR) может потребоваться некоторое расширение серии соединений для выбора соединения или серии лидера. Фенотипические тесты, применяемые на этом этапе процесса разработки лекарств, могут дополнить или заменить традиционные исследования на животных.

Фенотипический подход к оценке токсичности и безопасности может включать тесты, разработанные для моделирования специфических функций органов, такие как платформы на основе кардиомиоцитов для выявления кардиотоксичности (Pang et al., 2019) и тесты на основе гепатоцитов для выявления гепатотоксичности (Baudy et al., 2020; Godoy et al., 2013).

Объединение результатов фенотипических тестов с более высокой производительностью с результатами более сложных платформ с более низкой производительностью, использующих системы принятия решений, такие как AOP (Adverse Outcome Pathway) для оценки рисков безопасности [Ankley et al., 2010]) и DPOP (Discovery Program Outcome Pathway), которая поддерживает оценку клинической эффективности [Berg et al., 2020], поможет укрепить доверие к фенотипическим платформам и вызвать интерес к их дальнейшему развитию.

1.2. Поиск новых лекарственных препаратов против РНК-содержащих вирусов

1.2.1. Проблемы в существующем поиске противовирусных препаратов

На настоящий момент классификация вирусов включает 11273 вида [ICTV Taxonomy, 2022], из них менее тысячи составляют вирусы, патогенные для человека, и 223 – РНК-содержащие вирусы, инфицирующие человека [Zhang et al., 2022]. Однако только для пары десятков вирусных инфекций, вызванных, в основном, ВИЧ, герпесвирусами, вирусами гриппа и вирусами гепатитов В, С и

дельта, существуют лекарственные препараты для специфического лечения и профилактики. За последние 60 лет более 100 противовирусных препаратов или их комбинаций были разрешены для клинического применения [Li et al., 2021]. Около 90 из них, разработанных на основе 70 низкомолекулярных соединений, были разрешены к клиническому применению к 2016 году [De Clerq, Li, 2016]. И в последние годы, несмотря на всплеск исследований по поиску препаратов ввиду пандемии COVID-19, ситуация не сильно изменилась. К этому списку добавились ещё порядка трёх (Remdesivir, Ritonavir/Nirmatrelvir (Paxlovid), Molnupiravir) низкомолекулярных препаратов для специфического лечения SARS-CoV-2 инфекции [COVID Treatment]. Тем не менее, в базах данных собраны данные о противовирусной активности для десятков тысяч соединений.

Анализ базы данных ChEMBL выявил некоторые особенности распределения данных о противовирусной активности, которые могут ограничивать дальнейшие исследования. Большинство соединений тестировали только против одного вирусного семейства (часто одного вируса): *Retroviridae* (ВИЧ-1, -2), *Flaviviridae* (БГС), *Herpesviridae* (БПГ-1, -2, ВВ3) and *Orthomyxoviridae* (вирус гриппа А), а также *Filoviridae* (Marburg marburgvirus), *Arenaviridae* (Lassa mammaarenavirus), *Poxviridae* (Vaccinia virus), *Hepadnaviridae* (БГВ), *Pneumoviridae* (PCV) и *Picornaviridae* (энтеровирусы). В последние годы к списку семейств вирусов, против которых активно ищут лекарства, можно добавить *Coronaviridae* (SARS-CoV-2). Остальные вирусы составили порядка 20% всех исследований. Более того, большинство соединений тестировали против одного вида вирусов: более 98% соединений в базе данных содержит менее 10 записей о тестировании. Наиболее изученными соединениями, как правило, являются известные лекарственные препараты и их аналоги [Nikitina et al., 2019].

Таким образом, необходимо, с одной стороны, расширять список мишеней для известных соединений и, с другой стороны, искать новые хемотипы противовирусных соединений.

1.2.2. Фенотипические тесты *in vitro* как способ поиска новых противовирусных препаратов

Фенотипические клеточные тесты для оценки действия противовирусных препаратов можно разделить по инфекционности: с использованием инфекционного вируса и неинфекционные системы – и по типу анализа: анализ выживаемости клеток в присутствии вируса и анализ эффективности инфицирования клеток (Рисунок 3) [Behnam et al., 2016].

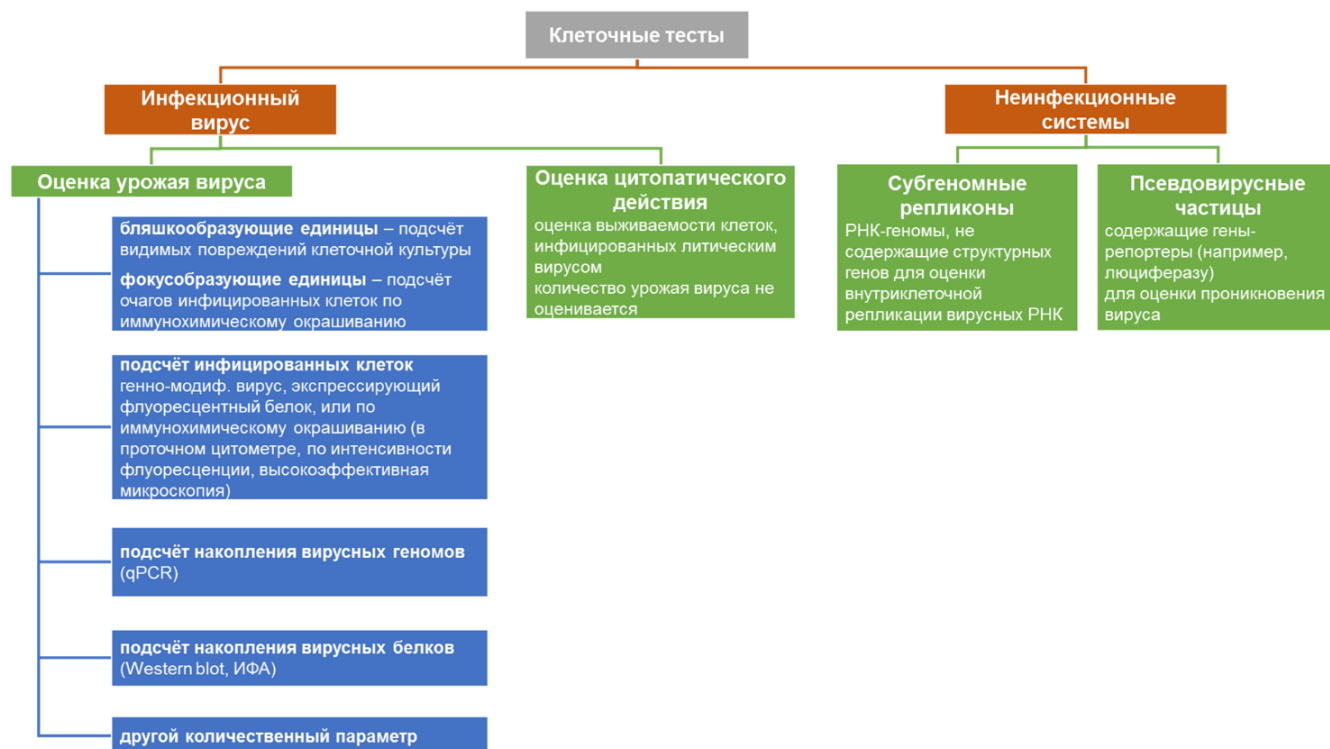


Рисунок 3 – Схематическая классификация наиболее часто используемых фенотипических тестов для оценки противовирусной активности химических соединений [адаптировано из Behnam et al., 2016]

Системы, основанные на работе с инфекционным вирусом, зависят от способности вируса размножаться в культуре клеток, но при этом не обязательно требуют способности вируса убивать их, то есть вызвать признаки вирус-индуцированного цитопатического действия (ЦПД). В случае литических вирусов возможна детекция ЦПД по снижению выживаемости клеток, т.е. по снижению количества жизнеспособных клеток. Эта детекция легко осуществляется современными методами и легко масштабируется. Литическое действие вируса можно также детектировать по эффективности инфицирования клеток,

оцениваемой как урожай вируса, определяемого по количеству бляшкообразующих единиц (БОЕ) или другими доступными способами.

В случае неспособности вируса вызывать гибель клеток можно оценивать урожай вируса по различным параметрам: количество фокусобразующих единиц (ФОЕ) – очагов заражённых клеток, окрашенных иммунохимически; количество заражённых клеток, окрашенных иммунохимически, напрямую методами проточной цитометрии и эффективной микроскопии или опосредованно по интенсивности флуоресценции; по концентрации вирусных белков (могут быть любые, структурные или неструктурные, в зависимости от задач исследования) и по количеству вирусных геномов (или мРНК, в зависимости от задачи исследования) и другими количественными методами, основанными на детекции вируса в клетках. Также возможно использование генетически модифицированного вируса, несущего в геноме ген флуоресцентного белка, который экспрессируется в инфицированных клетках. Таким образом, заражённые клетки можно детектировать как иммунохимически окрашенные, но без совершения дополнительных манипуляций на окрашивание.

Независимо от способности нативного инфекционного вируса размножаться в клеточной культуре, современные методы генной инженерии позволяют создавать неинфекционные системы для моделирования репродукции вируса в клетках. Это могут быть псевдовиральные частицы, несущие капсидные белки вируса и репортерный ген внутри, который реализуется клеточной машиной для экспрессии белка в случае срабатывания системы вирусной доставки его в клетку; или вирусные репликоны, способные моделировать процесс репликации и часто реализации генома вируса в клетке, которые в свою очередь можно детектировать по накоплению вирусной РНК или белков.

Преимущество тестов с инфекционным вирусом в том, что они позволяют смоделировать всю сложную систему целиком, с вовлечением всех клеточных белков и сигнальных путей, в то время как неинфекционные системы моделируют часть стадий репликативного цикла вируса.

1.3. Методы оценки ингибирующей активности соединений на репродукцию инфекционного вируса в культуре клеток как вариант фенотипического теста

В основном, методы определения противовирусной активности соединений основаны на методах оценки наличия инфекционного вируса, вирусной РНК или белков в клетках или культуральной жидкости. У всех из них есть свои особенности и предпосылки к масштабированию и автоматизации. Ниже описаны основные используемые методы и проведён анализ их преимуществ и недостатков для применения в качестве фенотипического скрининга.

1.3.1. Параметры и валидация фенотипического скрининга на основе оценки ингибирующей активности соединений на репродукцию инфекционного вируса в культуре клеток

При проведении фенотипической оценки противовирусной активности соединений является целевой параметр выражается как процент ингибирования репродукции вируса в первичном скрининге и, далее, как полумаксимальная эффективная (EC_{50}) концентрация, то есть концентрация соединения, которая оказывает целевой эффект на уровне 50% от максимального [Зефирова и др., 2019]. Эта величина позволяет сравнивать активность соединения с данными других экспериментов и других лабораторий.

Для определения перспективности дальнейшего исследования соединения необходимо отделить желаемый противовирусный эффект от побочного влияния (токсичности) соединения на клетки в конкретной фенотипической методике. Цитотоксичность соединения обычно выражают как полумаксимальную токсическую (CC_{50}) концентрацию, то есть концентрацию соединения, которая приводит к токсическому эффекту на уровне 50% от максимального [Зефирова и др., 2019].

Наличие значений активности и цитотоксичности позволяет рассчитать индекс селективности (selectivity index, SI) или терапевтический индекс, который определяется как соотношение между дозой или концентрацией лекарственного

средства, вызывающей терапевтический эффект, и дозой или концентрацией этого же средства, при которой наблюдается какой-либо побочный эффект [Зефирова и др., 2019; Ершов и др., 2012], то есть отношение CC_{50} к EC_{50} . Чем SI больше, тем больше разница между эффективной и токсичной концентрациями, тем безопаснее соединение и тем перспективнее оно для дальнейшей разработки. Соединения с SI не менее 8 считаются перспективными для дальнейших исследований на животных [Ершов и др., 2012].

Для валидации методики фенотипического скрининга противовирусной активности необходимо сначала оценить способность выявлять ингибиторы репродукции с известной активностью и, по возможности, с известным механизмом действия. Наиболее адекватным контролем для такой оценки могут стать нейтрализующие противовирусные антитела [Marsden et al., 2014], а уже затем низкомолекулярные соединения широкого спектра действия, чаще всего нуклеозидной природы ввиду их широкого спектра действия и применения для лечения различных вирусных инфекций.

1.3.2. Методы с оценкой вирус-индуцированной гибели (ЦПД) клеток

Исторически оценка признаков ЦПД проводилась визуально с использованием микроскопа. Такой подход не позволяет определить точное количество оставшихся живыми клеток, но были разработаны способы для расчёта минимальной активной концентрации и EC_{50} : формулы Кербера [Karber, 1931] и Рида и Менча [Reed, Meunch, 1938] – которые требовали увеличенного количества репликатов в одном эксперименте и уменьшения шага титрования для получения результатов с достаточной точностью.

Несомненным преимуществом данного метода является его простота для реализации и отсутствие дополнительных стадий и затрат на окрашивание клеток и детекцию репортера. Также ингибирование вызванных вирусом изменений морфологии клеток определяется на основе прямых измерений, которые, благодаря технологическим инновациям в робототехнике, визуализации и автоматизированном анализе изображений [Bernatchez et al., 2018], можно

осуществлять автоматизировано. Более того, новые методы оставляют возможность визуально проверять микроскопические изображения после автоматизированного анализа изображений для дополнительного контроля качества в процессе скрининга противовирусной активности. Таким образом, несмотря на свою простоту, методики фенотипического скрининга с определением результата по ингибированию вирус-индуцированного ЦПД продолжают считаться наиболее релевантными.

1.3.3. Методы с оценкой количества жизнеспособных клеток

Очевидным продолжением детекции ЦПД является детекция гибели клеток как самого просто определяемого проявления ЦПД по оценке количества жизнеспособных клеток.

Анализ жизнеспособности клеток является одним из наиболее распространенных методов фенотипической оценки и имеет несколько форматов теста. Принципы оценки жизнеспособности клеток в различных тестах включают оценку митохондриальной активности, клеточного метаболизма или активности ферментов, связанных с жизнеспособными или мертвыми клетками. Флуоресцентный резазуриновый тест используется в различных типах клеток млекопитающих, бактерий, дрожжей и простейших [Rampersad, 2012] и включает проницаемый для клеток профлуоресцентный краситель (резазурин), который восстанавливается до флуоресцентного продукта (резорурфин) в митохондриях жизнеспособных клеток. Колориметрический анализ с бромидом 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) также зависит от митохондриальной активности в жизнеспособных клетках, в которых это соединение восстанавливается до продукта фиолетового цвета [Mosmann, 1983]. Кроме того, жизнеспособность клеток также можно оценить по высвобождению в культуральную среду внутриклеточных ферментов после гибели клеток, например, с помощью анализа лактатдегидрогеназной или протеазной активности [Titus et al., 2012; Xia et al., 2008], или путем количественного определения флуоресцентных красителей, интеркалированных в ДНК, таких как витальный краситель Hoechst и краситель мёртвых клеток йодид пропидия [Riccardi, Nicoletti, 2006]. Анализ

содержания АТФ в живых клетках является более надёжным методом с лучшим соотношением сигнал-шум для HTS по сравнению с тестами по восстановлению МТТ и резазурина или окрашиванием ДНК [Cho et al., 2008].

Ещё одним подходом к определению живых клеток может быть использование генно-модифицированных линий клеток, конститутивно экспрессирующих флуоресцентный белок (например, GFP). Тогда вирус-индуцированная гибель клеток будет приводить к снижению флуоресцентного сигнала пропорционально доле погибших клеток [Zaliani et al., 2022].

Преимуществами подхода оценки количества жизнеспособных клеток является возможность довольно точно определить относительную плотность клеток для построения кривых ингибирования, анализ которых методами аппроксимации позволит рассчитать параметры процесса, такие как EC_{50} . А также такие методики хорошо масштабируются и автоматизируются. Недостатком можно назвать невозможность визуально оценить признаки ЦПД для отделения токсичности соединений от вирус-индуцированной гибели клеток, что, в общем, не очень принципиально для оценки перспективности соединения, но может быть важно для проведения SAR.

1.3.4. Методы оценки уровня репродукции (урожая) инфекционного вируса (бляшки, фокусы)

Для многих вирусов признаки цитопатического действия в монослое клеток медленно развиваются при низкой множественности заражения, при этом часто бывает сложно зафиксировать убывание клеток в монослое. Тогда для локального увеличения множественности используются полужидкие или твёрдые среды, уменьшающие конвекцию над монослоем клеток. Таким образом дочерние вирусные частицы заражают клетки, находящиеся рядом с первично заражённой клеткой, вызывая образование либо очага гибели клеток (бляшки), либо очага заражённых клеток, который можно визуализировать с использованием иммунохимического окрашивания (фокус). При этом количество таких очагов

соответствует количеству инфекционных вирионов, добавленных к клеточному монослою.

Для реализации методики необходимы адгезионные линии клеток или иммобилизация суспензионных клеток для окрашивания. Как, например, для размножения ВИЧ используют лимфоцитарные линии, которые в подавляющем большинстве случаев суспензионные [Nakane, Kawai, 1992].

Преимуществом метода является очевидный способ количественной оценки остаточного вируса, что удобно для расчёта процента ингибирования, построения кривых зависимости выраженности эффекта от концентрации соединения и расчёта EC_{50} . Однако, процесс постановки более трудоёмкий, чем методы оценки по ЦПД (гибели клеток), и автоматизация детекции результатов требует применения оптических технологий и последующего анализа изображений. Так же иногда как учёному-специалисту, так и компьютерной программе, сложно провести различие бляшек/фокусов друг от друга и от повреждений монослоя клеток (токсическое выпадение клеток, неровное зарастание и повреждение монослоя клеток в процессе окраски и др.).

1.3.5. Методы оценки уровня репродукции (урожая) и доли заражённых клеток по флуоресценции

Наиболее удобным представляется использование инфекционного вируса, несущего в своём геноме последовательность флуоресцентного белка, например, mCherry, который экспрессируется в заражённых клетках и может быть детектирован. Использование такого вируса позволяет определять долю инфицированных клеток, и имеет множество применений, в том числе для тестирования нейтрализующих антител и противовирусных ингибиторов [Haviernik et al., 2021].

Методы противовирусного скрининга на основе иммунофлуоресценции обычно основаны на использовании специфических антител для визуализации и количественного определения инфицированных вирусом клеток. Как правило, белки, которые экспрессируются на протяжении всего цикла репликации вируса и

надежно отражают статус инфекции, являются белками выбора для обнаружения с помощью иммунохимического окрашивания. Хотя различные вирусные белки могут экспрессироваться в разной степени в течение всего цикла репликации, вирусные структурные и нуклеокапсидные белки часто выбирают для выявления заражённых клеток, например, белок оболочки вируса Зика, структурный белок VP40 вируса Эбола и нуклеокапсидный белок SARS-CoV-2 [Bernatchez et al., 2018; Postnikova et al., 2018; Zhu et al., 2017; Riva et al., 2020].

С другой стороны, можно детектировать факт слияния вириона и мембраны клетки по появлению флуоресценции неспецифических липофильных красителей, таких как DiD (1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'- тетраметилиндодикарбоцианин). При достаточно высокой поверхностной плотности DiD в вирусной оболочке происходит тушение флуоресценции DiD. При эндоцитозе индуцируются процессы слияния, проникновения и/или раздевания вирионов и происходит разгорание флуоресценции при разведении молекул красителя после слияния клеточной и вирусной мембран, что приводит к установлению DiD-сигнала. Эта процедура введения DiD-метки в вирионы была успешной для оболочечных вирусов и не повлияла на их инфекционность [Lakadamyali et al., 2003; van der Schaar et al., 2008; Collier et al., 2009].

Ещё одним возможным способом является использование модифицированных клеточных линий, синтезирующих мРНК, кодирующие ген флуоресцентного белка (GFP, люциферазы) под вирусным промотором, которые реализуются только в присутствии вирусной RdRp, или кодирующие белок, который даёт флуоресцентный сигнал только после разрезания вирусной протеазой. Соответственно, в отсутствие инфекционного вируса система не работает, и флуоресцентного сигнала нет, а если происходит инфекция и синтез вирусных белков, то появляется детектируемый сигнал. При этом, активность сигнала пропорциональна числу инфицированных клеток [Peng, 2010]. Преимуществами подхода является специфическая оценка не только доли остаточного вируса, но и его функциональность: инфекционность, способность проникать в клетку и вызывать эффективный цикл вирусной репликации.

Данные методики позволяют определить количество остаточного вируса и инфицированных клеток для построения кривых ингибирования, анализ которых методами аппроксимации позволяет рассчитать EC_{50} . Эти методики хорошо масштабируются и автоматизируются.

Данные методики зависят от жизнеспособности клеток и эффективности флуоресценции репортерной системы, поэтому если соединение неспецифически ингибирует клеточный метаболизм или реализацию репортера (например, флуоресцентные соединения), то это может исказить результаты эксперимента.

1.3.6. Другие методы оценки уровня репродукции (урожая) вируса и доли заражённых клеток

Оценку урожая, долю заражённых клеток и остаточного инфекционного вируса можно также определить проведением дополнительных исследований с суспензиями клеток после постановки непосредственно реакции с тестируемыми соединениями. Самыми очевидными являются:

- определение инфекционного вируса титрованием различными методами (по бляшкам/фокусам или ЦПД в культуре клеток [Rojas-Luna et al., 2023; Yao et al., 2018], по реакции гемагглютинации эритроцитов в присутствии вируса [Wang et al., 2018] и др.);
- определение вирусных РНК (геномных или всех, в зависимости от используемой тест-системы) с помощью количественной ОТ-ПЦР с детекцией в реальном времени [Xu et al., 2017; Zhu et al., 2023];
- определение синтеза конкретных вирусных белков в Western blot [Zhu et al., 2023] и других подобных реакциях.

Такие определения чаще всего проводятся дополнительно уже после непосредственной постановки реакции ингибирования, что усложняет процедуру исследования. Однако позволяет измерить конкретный параметр — инфекционность вируса, синтез мРНК, синтез конкретного вирусного белка и т.п. Эти факты, взятые вместе, делают подход с оценкой остаточного вируса сложно масштабируемым и мало подходящим для скрининговых методик, а более

применимым для анализа механизма действия соединений, когда производительность эксперимента менее важна.

1.4. Характеристика используемых в работе вирусов

По классификации Балтимора вирусы разделяются по структуре генома, пакуемого в вирионы и способу синтеза мРНК, с другой стороны, многие особенности первых стадий репликативного цикла вируса определяет структура его вириона. В работе рассматривали вирусы с геномом, представленным одноцепочечной молекулой РНК положительной полярности (+оцРНК), оболочечные и безоболочечные, с различными схемами синтеза мРНК и реализации генома: синтез и нарезание полипротеина, синтез субгеномных РНК, синтез ДНК провируса и встраивание его в геном клетки. В этой главе приведена краткая характеристика использованных в работе вирусов.

1.4.1. Характеристика вирусов рода Orthoflavivirus семейства Flaviviridae

Род *Orthoflavivirus* относится к семейству *Flaviviridae*, в которое ещё входят 3 рода *Pestivirus*, *Hepacivirus* и *Pegivirus* [ICTV Taxonomy, 2022]. Многие представители рода *Orthoflavivirus* вызывают тяжёлые заболевания человека: поражения ЦНС в виде энцефалитов, полиомиелитов, радикулопатий и т.п. (вирус клещевого энцефалита, вирус японского энцефалита, вирус Повассан), а также лихорадки с поражением суставов (вирус Зика, вирус Западного Нила), печени (вирус жёлтой лихорадки) и, часто, с геморрагическим синдромом (вирус Денге, вирус омской геморрагической лихорадки) и другие инфекции. Многие вирусы являются арбовирусами и, в основном, переносятся клещами и комарами [King et al., 2012].

Классификация рода *Orthoflavivirus* (представлены только вирусы, используемые в работе, и типичные представители) [ICTV Taxonomy, 2022; Calisher and Gould, 2003; Grard et al., 2007]:

Вирусы, переносимые клещами:

Комплекс вирусов млекопитающих, переносимых клещами (Mammalian tick-borne virus complex)

Orthoflavivirus omskense, *Omsk hemorrhagic fever virus* (Вирус омской геморрагической лихорадки, ВОГЛ)

Orthoflavivirus powassanense, *Powassan virus* (Вирус Повассан, ПОВ)

Orthoflavivirus encephalitis, *Tick-borne encephalitis virus* (Вирус клещевого энцефалита, ВКЭ)

European subtype (Европейский подтип)

Far-Eastern subtype (Дальневосточный подтип)

Siberian subtype (Сибирский подтип)

Вирусы, переносимые комарами:

Комплекс вируса Денге (Dengue virus complex)

Orthoflavivirus dengue, *Dengue virus* (Вирус Денге, ДЕНВ)

Dengue virus type 1 (ДЕНВ-1)

Dengue virus type 2 (ДЕНВ-2)

Dengue virus type 3 (ДЕНВ-3)

Dengue virus type 4 (ДЕНВ-4)

Комплекс вируса японского энцефалита (Japanese encephalitis virus complex)

Orthoflavivirus japonicum, *Japanese encephalitis virus* (Вирус японского энцефалита, ВЯЭ)

Orthoflavivirus nilense, *West Nile virus* (Вирус Западного Нила, ВЗН)

Комплекс вируса жёлтой лихорадки (Yellow fever virus complex)

Orthoflavivirus flavi, *Yellow fever virus* (Вирус жёлтой лихорадки, ВЖЛ)

Вирионы *Orthoflavivirus* (Рисунок 4) представляют собой небольшие сферические оболочечные частицы (~ 40-50 нм) с ТЗ-подобной симметрией, содержащие нуклеокапсид (~ 30 нм) [Flint et al., 2015; Lindenbach et al., 2020]. Нуклеокапсид состоит из множества копий капсидного белка С и молекулы РНК и окружён липидной мембраной, в которую встроены два вирусных

трансмембранных белка: мембранный белок М и белок оболочки Е. При этом только растворимый домен sE белка Е образует поверхность вирусной частицы. Белок Е опосредует первые стадии взаимодействия вириона с клеткой: связывание с рецептором и доставку вирусной РНК в цитоплазму. Незрелые вирусные частицы содержат предшественник мембранного белка ргМ (белок-шаперон белка Е), который путём разрезания клеточным фурином или сходной протеазой во время созревания вируса превращается в белок М зрелой вирусной частицы [Lindenbach et al., 2020].

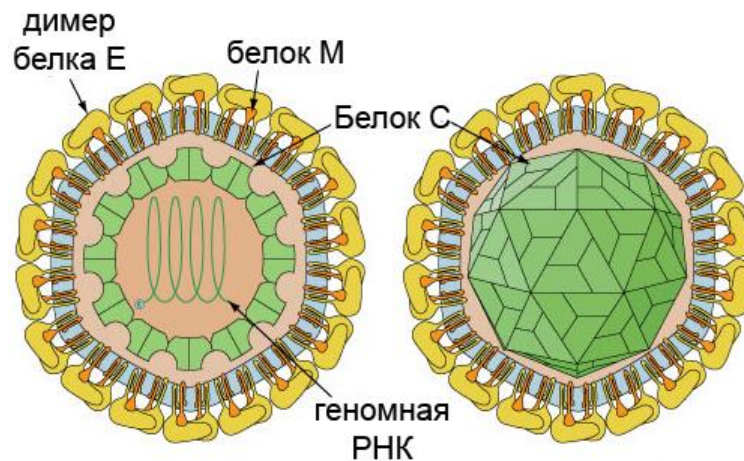


Рисунок 4 – Схема строения вириона представителей рода *Orthoflavivirus* (адаптирована из [ViralZone, интернет-ресурс SIB Swiss Institute of Bioinformatics])

Вирусный геном (Рисунок 5) представляет собой несегментированную одноцепочечную молекулу РНК положительной полярности (+оцРНК), длиной около 11000 нуклеотидов (нт), имеющую на 5'-конце кэп I (клеточного) типа (m7G5'ppp5'A) и на 3'-конце вторичную структуру без полиадениловой последовательности [Pletnev et al., 1990; Mandl et al., 1998]. РНК содержит одну основную открытую рамку считывания (ОРС), окружённую двумя некодирующими регионами (нетранслируемыми областями, НТО): 5'-НТО включает около 100 нт и 3'-НТО – 400-700 нт. Эти районы содержат консервативные последовательности и специализированные вторичные РНК-структуры, которые служат как *cis*-активирующие элементы в процессах

репликации, трансляции и упаковки генома. 3'-НТО содержит промотор для синтеза комплементарной цепи РНК (–оцРНК). В ОРС ближе к 5'-концу закодированы структурные белки, С, рrМ и Е, ближе к 3'-концу – неструктурные белки NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b и NS5 [Lindenbach et al., 2020].

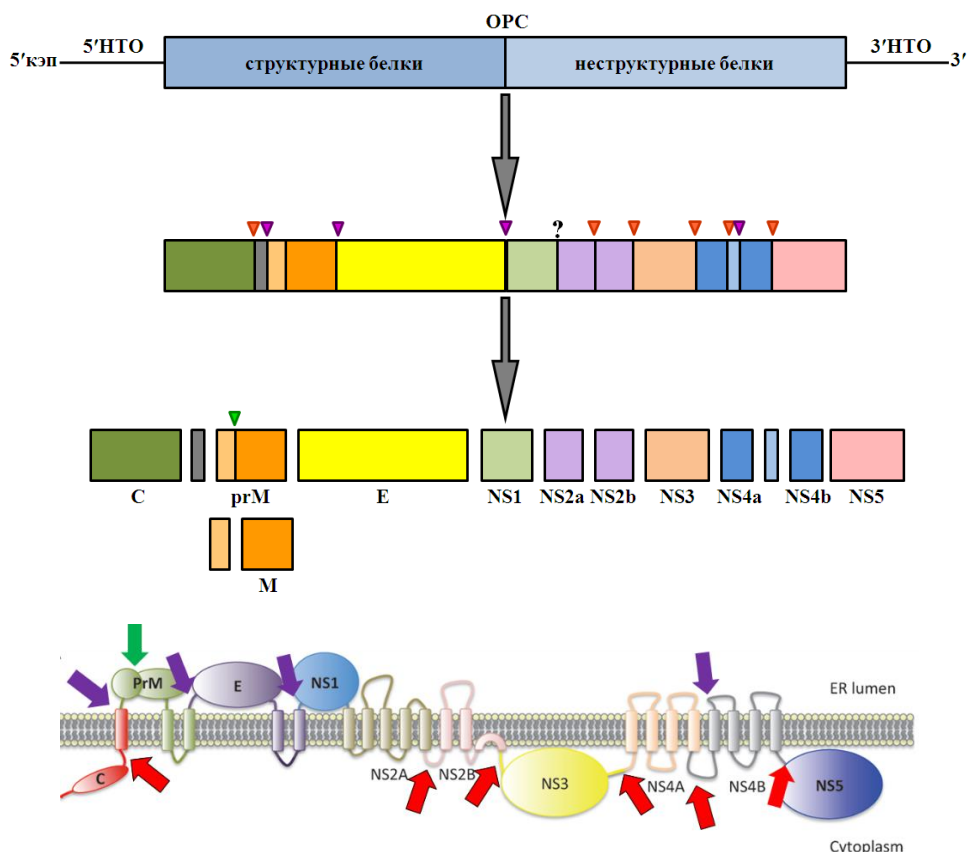


Рисунок 5 – Структура генома представителей рода *Orthoflavivirus*, трансляция и процессинг вирусного полипротеина. Сайты разрезания ▼ – клеточной сигнализацией; ▼ – вирусной сериновой протеазой NS3; ▼ – фурином или другой клеточной протеазой, локализованной в аппарате Гольджи; ? – неизвестной протеазой. НТО – нетранслируемая область, ОРС – открытая рамка считывания [адаптировано из Mairiang et al., 2013].

Жизненный цикл ортофлавивирусов (Рисунок 6) начинается с проникновения вириона в клетку после взаимодействия белка оболочки Е с рецепторными молекулами на клеточной плазматической мембране (гликозамногликаны, интегрины, ламинин-связывающий белок, ICAM-1 и другие); затем происходит эндоцитоз, слияние вирусной и клеточной мембран запускается снижением рН в эндосоме, что приводит к протонированию гистидинов в белке Е, изменению его конформации и экспонированию пептида слияния, который атакует

мембрану везикулы с образованием поры, через образовавшуюся пору вирусная РНК высвобождается в цитоплазму [Lindenbach et al., 2020].

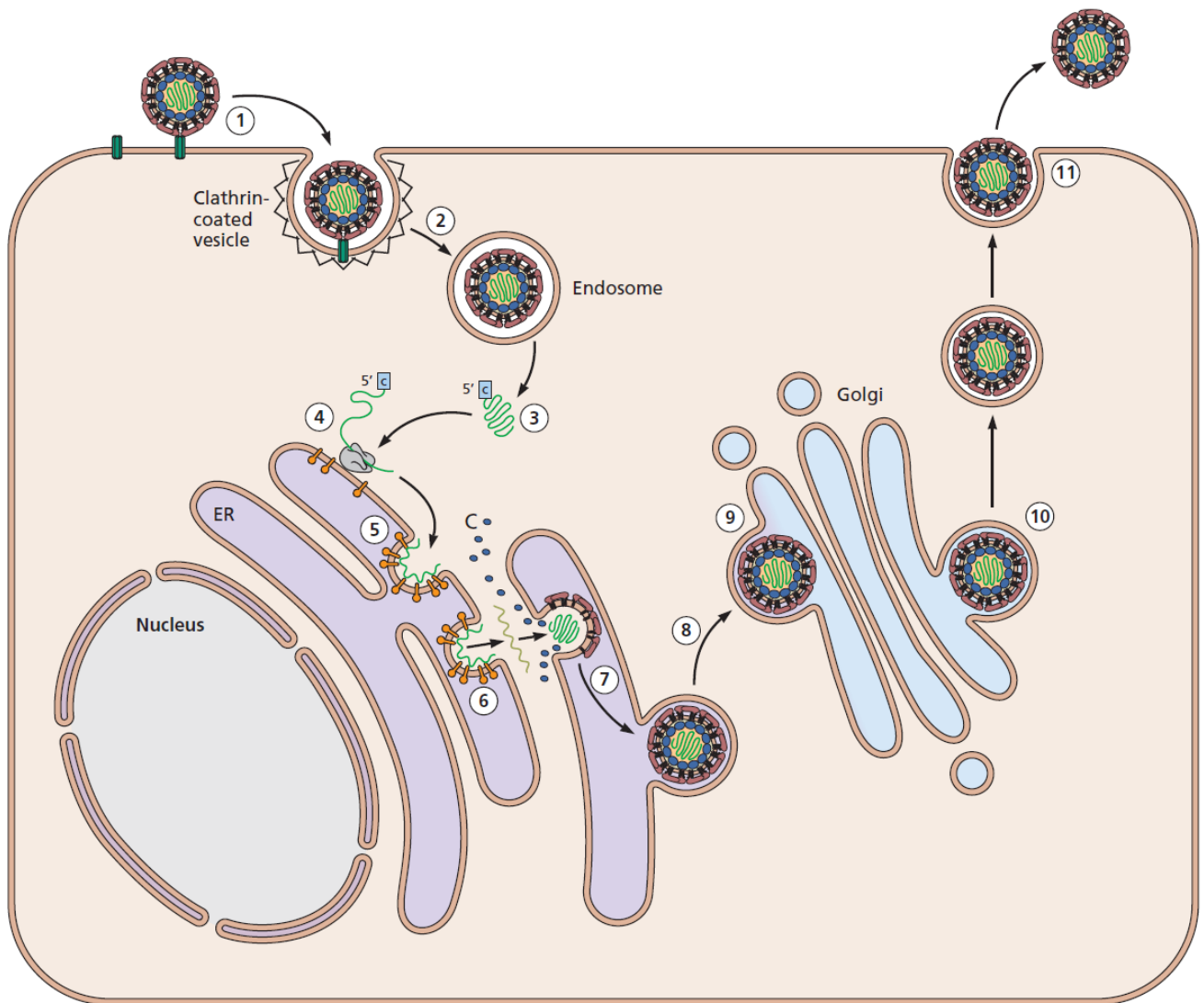


Рисунок 6 – Репликативный цикл представителей рода *Orthoflavivirus* [Flint et al., 2015]: 1) связывание с рецепторами на клеточной поверхности; 2) рецептор-опосредованный клатрин-зависимый эндоцитоз; 3) слияние мембран эндосомы и вириона с высвобождением генома в цитоплазму; 4) синтез вирусных белков клеточными рибосомами с вирусной геномной РНК; 5) транслокация и протеолитическое расщепление вирусных белков в ЭПР и образование везикул репликации; 6) репликация вирусных геномов; 7) образование вирионов на мембранах ЭПР; 8) транспорт вирионов в АГ; 9-10) созревание гликопротеинов и вириона в АГ; 11) экзоцитоз вирионов с плазматической мембраны клетки.

В цитоплазме вирусная геномная РНК распознаётся рибосомами и запускается синтез вирусного полипротеина длиной более 3000 аминокислот (а.к.), который котрансляционно транслируется в мембрану эндоплазматического ретикула (ЭПР) и затем подвергается протеолитическому расщеплению под

действием вирусной NS3 и клеточных протеаз (в т.ч. сигнальной пептидазы) (Рисунок 5). Ряд неструктурных белков затем принимает участие в репликации вирусной геномной РНК. Неструктурные белки NS1, NS2a-b, NS4a-b формируют мембраны ЭПР в везикулярные структуры в перинуклеарном пространстве, внутри которых происходит репликация РНК, основным белком которой является РНК-зависимая РНК полимераза NS5, обладающая также метилтрансферазной активностью для создания кэп-структуры. В процессе репликации сначала синтезируется комплементарная геномной –оцРНК, которая затем используется как матрица для синтеза множества копий геномной +оцРНК, часть копий после этого используется для трансляции вирусного полиопротеина, а часть пакуется с капсидным белком С, далее вирусная частица образуется при инвагинации мембраны ЭПР со встроенными в неё вирусными белками ргМ и Е вокруг капсида в люмен ЭПР. Вирусные гликопротеины М и Е созревают, находясь в составе вирионов, при этом белок ргМ защищает белок Е при прохождении компартментов аппарата Гольджи (АГ) и как белок-шаперон помогает формированию его правильной конформации. Выход вирусных частиц осуществляется путем экзоцитоза и происходит через 8–24 часа после начала инфекции (в зависимости от типа клеток и вида вируса) [Lindenbach et al., 2020].

1.4.2. Характеристика вирусов рода *Alphavirus* семейства *Togaviridae*

Род *Alphavirus* – единственный род семейства *Togaviridae*. В основном, заболевания, вызываемые представителями рода *Alphavirus*, протекают по одному из двух сценариев: после укуса членистоногого попадают в клетки Лангерганса, которые доставляют их в ближайший лимфатический узел, откуда они попадают через кровоток в ЦНС, вызывая энцефалиты и энцефаломиелиты (вирусы энцефалитов лошадей, вирус лесов Семлики); или после укуса вирус попадает в мышечную ткань, а затем через кровоток в кожу и суставы, вызывая поражения данных органов – сыпь, воспаление, артриты и т.п. (вирус Синдбис, вирус Чикунгунья). Многие альфавирусы являются арбовирусами и, в основном, переносятся комарами [King et al., 2012; Griffin, Weaver, 2020].

Классификация рода *Alphavirus* (представлены только вирусы, используемые в работе, и типичные представители) [King et al., 2012]:

род *Alphavirus*

Sindbis Virus (вирус Синдбис, СИНВ)

Semliki Forest virus complex

Chikungunya Virus (вирус Чикунгунья, ЧИКВ)

Semliki Forest Virus (вирус леса Семлики)

Вирионы *Alphavirus* (Рисунок 7) представляют собой сферические оболочечные частицы (~ 65-70 нм), содержащие икосаэдрический нуклеокапсид с Т4-симметрией. Нуклеокапсид состоит из множества копий капсидного белка СР и молекулы РНК. Он окружён липидной мембраной, в которую встроены 80 тримеров гетеродимеров вирусных трансмембранных гликопротеинов Е1 и Е2 [Kuhn, 2020].

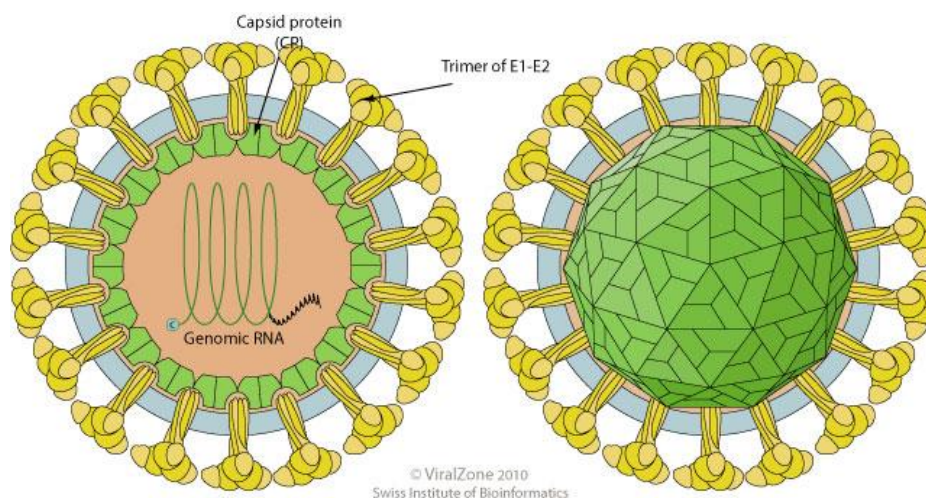


Рисунок 7 – Схема строения вириона представителей рода *Alphavirus* [ViralZone, интернет-ресурс SIB Swiss Institute of Bioinformatics]

Вирусный геном (Рисунок 8) представляет собой несегментированную одноцепочечную молекулу РНК положительной полярности, длиной 9700-11800 нт, имеющую на 5'-конце специальный кэп (m⁷GpppN) и на 3'-конце – полиадениловую последовательность. РНК содержит 2 ОРС: первая (ближе 5'-концу) кодирует неструктурные белки nsP1-4, вторая (ближе к 3'-концу) – структурные белки СР, Е1-Е3, 6к. В первой ОРС находится слабый «подтекающий»

стоп-кодон, разделяющий белки nsP3 и nsP4, что необходимо для осуществления тонкой регуляции стадий репликативного цикла по времени. Вторая ОРС реализуется путём образования субгеномной РНК (сгРНК). Наличие двух ОРС позволяет накапливать большое количество структурных белков независимо от реализации неструктурных. В сгРНК образуется особая вторичная РНК-шпилька (Downstream Hairpin Loop, DLP), которая позволяет избежать клеточного ответа через протеинкиназу R (PKR), который происходит на поздних стадиях инфекции, таким образом позволяя вирусу продолжать накапливать структурные белки и собирать вирионы [Kuhn, 2020].

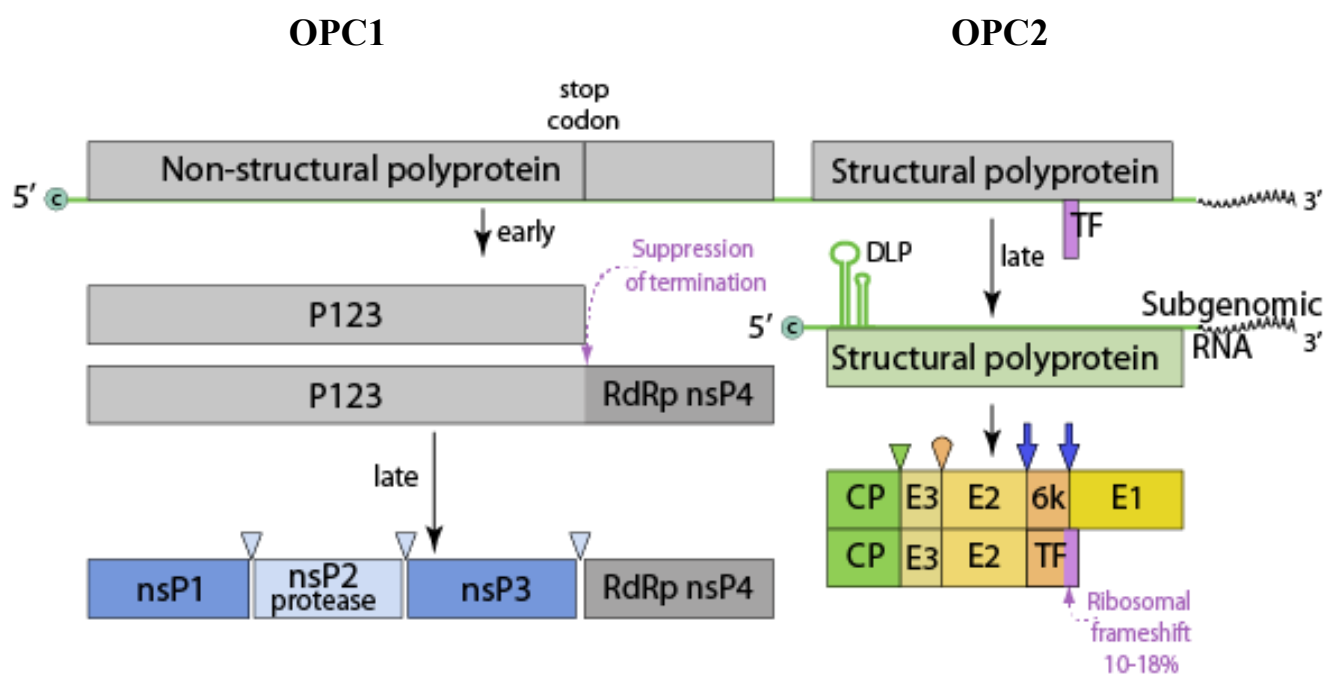


Рисунок 8 – Структура генома представителей рода *Alphavirus*, трансляция и процессинг полипротеина [ViralZone, интернет-ресурс SIB Swiss Institute of Bioinformatics]. Сайты разрезания ▼ – вирусной протеазой nsP23; ▼ – вирусным белком капсида CP; ▼ – клеточной протеазой фурином; ↓ – клеточной сигнальной пептидазой. ОРС – открытая рамка считывания.

Жизненный цикл альфавирусов (Рисунок 9) начинается со взаимодействия белка оболочки E2 с рецепторными молекулами на клеточной плазматической мембране (гликозаминогликаны, ламинин-связывающий белок, DC-SIGN, L-SIGN и другие); затем происходит клатрин-опосредованный эндоцитоз, слияние вирусной и клеточной мембран запускается снижением pH в эндосоме, что приводит к диссоциации белка E1 от белка E2 и пересборку E1 в гомотримерные

комплексы с экспонированным пептидом слияния, который атакует мембрану эндосомы с образованием поры, через которую вирусный капсид высвобождается в цитоплазму. Сразу начинается трансляция геномной РНК, при этом 60S субъединица рибосомы взаимодействует с капсидным белком СР, помогая раздеванию генома [Leung et al., 2011]. Сначала транслируется только ОРС1 с образованием двух полипротеинов, содержащих nsP1-2-3 и nsP1-2-3-4 за счёт супрессии терминации, при этом РНК-зависимая РНК полимераз nsP4 синтезируется только в 10% случаев. Полипротеины постепенно расщепляются вирусной протеазой nsP2 параллельно с протеканием репликации вирусного генома. Синтез комплементарной –оцРНК осуществляет частично расщеплённый комплекс nsP1-2-3/4. Дальнейший протеолиз приводит к формированию полностью расщеплённого зрелого комплекса nsP1/2/3/4, который может синтезировать только +оцРНК, как геномную, так и субгеномную. Таким образом осуществляется временное разделение синтеза вирусных РНК: –оцРНК, которая используется как матрица для синтеза новых геномов, на поздних стадиях репликативного цикла уже не синтезируется. С укороченной сгРНК, кодируемой в ОРС2, транслируется полипротеин, содержащий структурные белки. Этот полипротеин контрансляционно транслоцируется в мембраны ЭПР и затем нарезается автокаталитически (белок СР имеет домен сериновой протеазы) и клеточными протеазами (сигнальная пептидаза и фурин) на отдельные белки, так, что капсидный белок СР остаётся в цитоплазме и собирается в капсиды с вирусной РНК, а трансмембранные белки E1 и E2 в составе экзоцитозных везикул направляются на поверхность по секреторному пути для встраивания в плазматическую мембрану через АГ, где происходит их гликозилирование, пальмитоилизация и разрезание E1/E2. Готовые капсиды транспортируются к плазматической мембране, в которую уже встроены тримеры E1/E2, где происходит отпочковывание вирионов, которое запускают как сам белок СР, так и гликопротеины оболочки. Весь репликативный цикл занимает около 4 часов (в зависимости от типа клеток и вида вируса) [Kuhn et al., 2020; Skidmore, Bradfute, 2023].

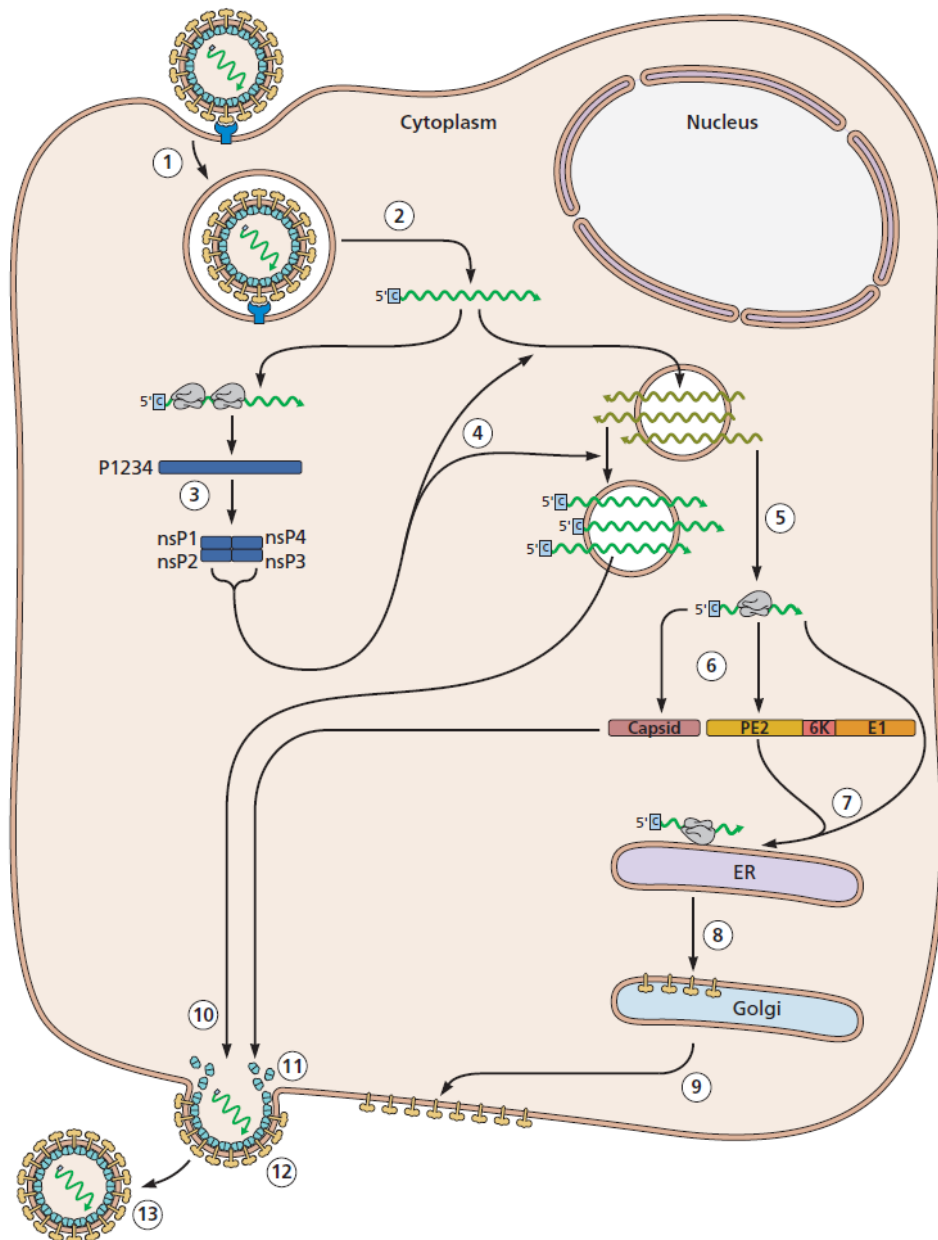


Рисунок 9 – Репликативный цикл представителей рода *Alphavirus* [Flint et al., 2015]: 1) связывание с рецепторами на клеточной поверхности и рецептор-опосредованный клатрин-зависимый эндоцитоз; 2) слияние мембран эндосомы и вириона с высвобождением генома в цитоплазму; 3) синтез вирусных неструктурных белков клеточными рибосомами с ORC1 вирусной геномной РНК; 4-5) синтез комплементарной –оцРНК и на ней синтез матричных +оцРНК: геномной и субгеномной с ORC2; 6) синтез структурных белков с сгРНК, несущей ORC2; 7) транспорт капсидного белка СР к плазматической мембране и транслокация структурных вирусных белков E1 и E2 в ЭПР; 8-9) транспорт и созревание белков E1 и E2 через АГ к плазматической мембране; 10-11) сборка капида и выпоковывание вириона с поверхности плазматической мембраны.

1.4.3. Характеристика вирусов рода *Betacoronavirus* семейства *Coronaviridae*

Род *Betacoronavirus* – один из родов подсемейства *Orthocoronavirinae* семейства *Coronaviridae*, способных вызывать патологию человека, животных и птиц. Помимо бетакоронавирусов, к подсемейству относятся роды *Alpha*-, *Gamma*- и *Deltacoronavirus*. В основном, представители рода *Betacoronavirus* заражают эпителиальные клетки респираторного и кишечного тракта, вызывая острые респираторные заболевания, проявления которых могут варьировать от лёгких инфекций до тяжёлых пневмоний, с острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС), заканчивающихся летальным исходом. Также бетакоронавирусы способны размножаться в нервной ткани, вызывая различные поражения нервной системы. Вирусы распространены повсеместно. Обычно регистрируется сезонная коронавирусная инфекция с аэрозольным путём передачи, с симптомами которой человек сталкивается каждые 3-5 лет жизни [King et al., 2012; Perlman, Masters, 2020].

Классификация подсемейства *Orthocoronavirinae* (представлены только вирусы, используемые в работе, и типичные представители) [ICTV Taxonomy, 2022]:

подсемейство *Orthocoronavirinae*

род *Alphacoronavirus*

род *Betacoronavirus*

подрод *Embecovirus*

подрод *Hibecovirus*

подрод *Merbecovirus*

подрод *Nobecovirus*

подрод *Sarbecovirus*

Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-CoV-1, -2)

род *Gammacoronavirus*

род *Deltacoronavirus*

Вирионы *Betacoronavirus* (Рисунок 10) представляют собой сферические оболочечные частицы (~ 120 нм), содержащие филаментообразный нуклеокапсид

со спиральной симметрией. Нуклеокапсид состоит из множества копий нуклеокапсидного белка N и молекулы РНК. Он окружён липидной мембраной, в которую встроены гомотримеры (шипики, спайки) вирусного трансмембранного гликопротеина S длиной 16-21 нм, образующие «корону» вирусной частицы. Также в мембрану встроено множество копий мембранного белка M и небольшое количество копий малого оболочечного белка E [King et al., 2012; Flint et al., 2015; Perlman, Masters, 2020].

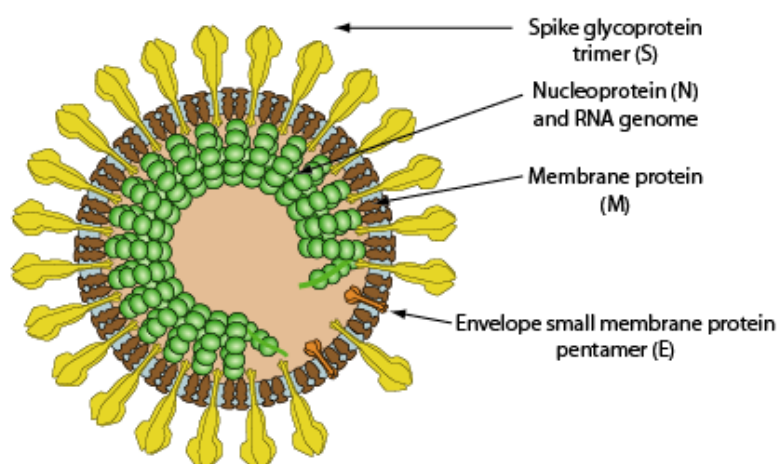


Рисунок 10 – Схема строения вириона представителей рода *Betacoronavirus* [ViralZone, интернет-ресурс SIB Swiss Institute of Bioinformatics]

Вирусный геном (Рисунок 11) представляет собой несегментированную одноцепочечную молекулу РНК положительной полярности, длиной 27000-32000 нт, имеющую на 5'-конце специальный кэп (m⁷GpppNm) и на 3'-конце – полиадениловую последовательность. РНК содержит порядка 14 ОРС: первая и вторая (ближе 5'-концу) ОРС1a и ОРС1b кодируют неструктурные белки nsр1-16, которые включают папаин-подобную протеазу PLpro (nsр3), главную химотрипсин-подобную протеазу Mpro (nsр5), РНК-зависимую РНК полимеразу (nsр12), хеликазу (nsр14) и другие белки репликазно-транскриптазного комплекса. Далее следуют остальные ОРС, кодирующие каждая отдельно структурные белки и белки для взаимодействия с клеткой. ОРС1b реализуется путём рибосомального сдвига рамки (frameshift), а остальные ОРС – путём образования субгеномных РНК (сгРНК). Небольшая последовательность лидерной РНК (65-89 нт) присутствует

около 5'-конца генома и в начале каждой OPC 2-14 и необходима для синтеза субгеномных РНК [King et al., 2012; Flint et al., 2015; Perlman, Masters, 2020].

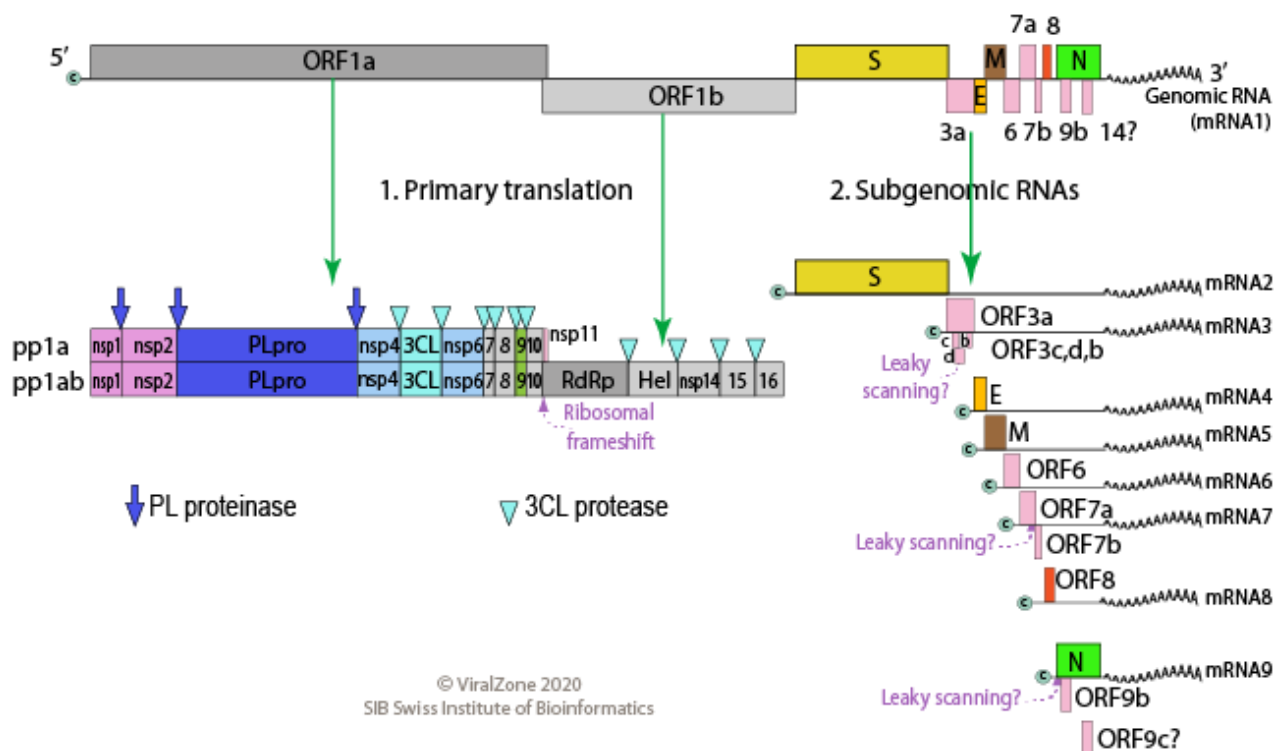


Рисунок 11 – Структура генома представителей рода *Betacoronavirus* (SARS-CoV-2), трансляция и процессинг полипротеина [ViralZone, интернет-ресурс SIB Swiss Institute of Bioinformatics]. Сайты разрезания: ▼ – вирусной протеазой 3CL; ↓ – вирусной протеазой PL. ORF (OPC) – открытая рамка считывания.

Жизненный цикл бетакоронавирусов (Рисунок 12) начинается со взаимодействия рецептор-связывающего домена (RBD) субъединицы S1 белка оболочки S, являющегося белком слияния I класса, с рецепторными молекулами на клеточной плазматической мембране (ангиотензин-превращающий фермент 2 – ACE2, сиаловые кислоты и другие); затем происходит разрезание белка S на отдельные субъединицы S1 и S2 клеточной протеазой фурином, после чего происходит следующее расщепление субъединицы S2 по сайту S2' также клеточными протеазами TMPRSS2 (transmembrane protease serine 2, трансмембранная сериновая протеаза 2) на поверхности плазматической мембраны или катепсином L внутри эндосом (в случае активации эндосомального пути). Это расщепление запускает перестройку субъединицы S2, экспонирование пептида слияния и слияние вирусной и клеточной мембран с образованием поры, через которую вирусный капсид высвобождается в цитоплазму. Сразу начинается

трансляция геномной РНК. Сначала транслируются частично перекрывающиеся ORC1a и ORC1b с образованием двух полипротеинов, содержащих nsP1-11 и nsP1-16 за счёт рибосомального сдвига рамки с эффективностью 45-70%. Полипротеины котрансляционно транслоцируются в мембраны ЭПР и постепенно расщепляются вирусными цистеиновыми протеазами nsP3 (PL) и nsP5 (3CL) с образованием отдельных функциональных белков репликазно-транскриптазного комплекса: белки nsP4 и nsP6 организуют мембраны в двумембранные пузырьки; белки nsP8-nsP16 необходимы для транскрипции и репликации вирусной РНК. Субгеномные РНК образуются путём постепенной транскрипции: РНК полимеразный комплекс синтезирует комплементарную –оцРНК до последовательности лидера (в одной из ОРС), происходит ранняя терминация синтеза, после чего частично синтезированная последовательность переносится на 5'-конец геномной РНК, и лидер синтезируется до конца (Рисунок 13); с этой комплементарной сгРНК синтезируются матричные сгРНК, а с неё уже транслируется белок с ближайшей к 5'-концу ОРС. Таким образом, в заражённой клетке в процессе репликативного цикла бетакоронавирусов синтезируется набор удлиняющихся сгРНК с лидером на 5'-конце, содержащих 1, 2, 3 и так далее до 12 ОРС, из которых реализуется только 5'-концевая. Структурные белки транслируются с сгРНК и котрансляционно транслоцируются в мембраны ЭПР (ERGIC). Помимо комплементарных сгРНК синтезируются и полногеномные –оцРНК, которые служат матрицей для синтеза новых вирусных геномных РНК. Особенностью репликазно-транскриптазного комплекса коронавирусов является наличие экзонуклеазной активности и способности к проверке и вырезанию последнего неверно встроенного нуклеотида (proofread), что значительно повышает точность репликации и транскрипции такого длинного генома. Новые геномные РНК одеваются белком N и транспортируются к мембранам ЭПР (ERGIC). Нуклеокапсиды образуют вирион, одеваясь в мембраны ERGIC с встроенными в них белками оболочки, и новые вирионы транспортируются по секреторному пути к плазматической мембране. В процессе транспорта белки оболочки гликозилируются в АГ и проходят все

необходимые перестройки [Flint et al., 2015; Perlman, Masters, 2020; V'kovski et al., 2021].

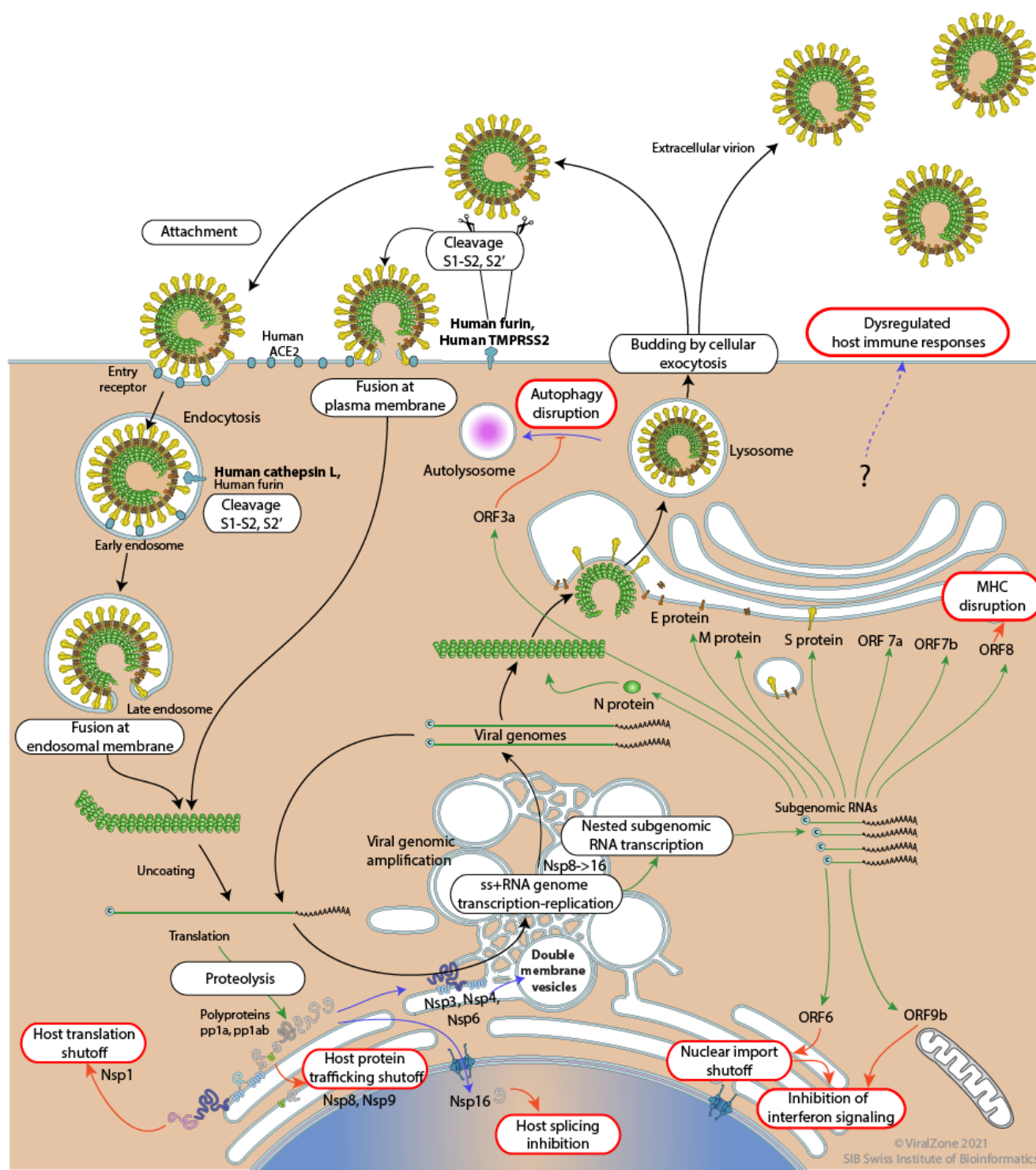


Рисунок 12 – Репликативный цикл представителей рода *Betacoronavirus* [ViralZone, интернет-ресурс SIB Swiss Institute of Bioinformatics]

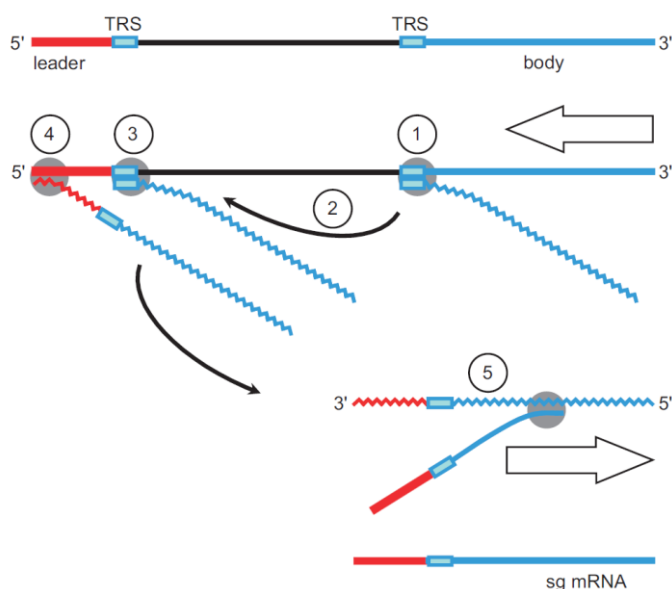


Рисунок 13 – Схема синтеза субгеномных РНК представителей рода *Betacoronavirus* [ViralZone, интернет-ресурс SIB Swiss Institute of Bioinformatics]

1.4.4. Характеристика вирусов рода *Lentivirus* семейства *Retroviridae*

Род *Lentivirus* – наиболее известный род подсемейства *Orthoretrovirinae* семейства *Retroviridae*, представители которого вирусы иммунодефицита человека типов 1 и 2 (ВИЧ-1, -2) заражают CD4⁺ Т лимфоциты человека, вызывая персистентную инфекцию, которая, в конечном итоге, приводит к массовой гибели этих клеток и развитию синдрома приобретённого иммунодефицита (СПИД). Помимо лентивирусов, к данному подсемейству относятся роды *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Delta-* и *Epsilonretrovirus*, также вызывающие персистентные инфекции иммунных клеток позвоночных, включая приматов и человека. Однако, некоторые особенности жизненного цикла лентивирусов резко отличают его от других ретровирусов [King et al., 2012]. Лентивирусы распространены повсеместно и передаются с заражёнными клетками через кровь, сексуальные контакты, от матери к плоду и при кормлении грудью [King et al., 2012; Flint et al., 2015].

Классификация подсемейства *Orthoretrovirinae* (представлены только вирусы, используемые в работе, и типичные представители) [ICTV Taxonomy, 2022]:

п/сем. *Orthoretrovirinae*

род *Alpharetrovirus*

род *Betaretrovirus*

род *Gammaretrovirus*

род *Deltaretrovirus*

род *Epsilonretrovirus*

род *Lentivirus*

ВИЧ-1

ВИЧ-2

Simian immunodeficiency virus (SIV)

Equine infectious anemia virus

Зрелые вирионы *Lentivirus* (Рисунок 14) представляют собой сферические оболочечные частицы (80-100 нм), содержащие нуклеокапсид, окружающий диплоидный геном, представленный двумя одинаковыми молекулами РНК, каждая из которых ассоциирована с вирусными интегразой (IN) и обратной транскриптазой (RT, ОТ), а также клеточной тРНК. Нуклеокапсид состоит из 1572 копий капсидного белка CA. Он окружён липидной мембраной, в которую встроены комплексы поверхностных гликопротеинов gp120 (SU) и gp41 (TM). Мембрана поддерживается внутри вириона структурами матриксного белка MA. Помимо этого, в мембрану встроены клеточные белки адгезии ICAM-1, а внутри вириона находятся неструктурные вирусные (vpr, протеаза PRO) и клеточные (CypA) белки [King et al., 2012; Flint et al., 2015].

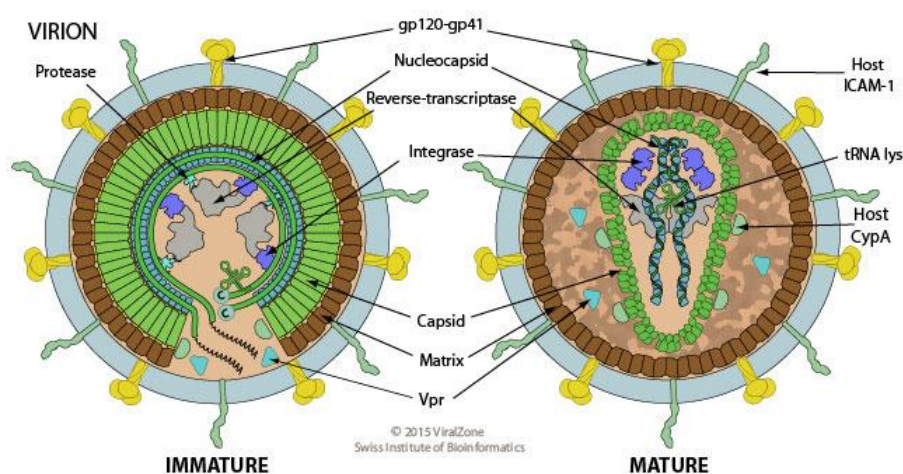


Рисунок 14 – Схема строения незрелого и зрелого вирионов представителей рода *Lentivirus* [ViralZone, интернет-ресурс SIB Swiss Institute of Bioinformatics]

Вирусный геном (Рисунок 15) представляет собой несегментированную одноцепочечную молекулу РНК положительной полярности, длиной 9750 нт, имеющую на 5'-конце кэп клеточного типа (m7GpppA) и на 3'-конце – полиадениловую последовательность. На концах генома находятся комплементарные длинные концевые повторы (long terminal repeat, LTR) длиной порядка 600 нт, состоящие из специфических областей U3, R и U5. Также ближе к 3'-концу находится сайт связывания праймера (primer binding site, PBS) и полипуриновый тракт (polypurine tract, PPT), необходимые для обратной транскрипции. Кодирование белков внутри генома осуществляется таким образом, чтобы после встраивания ДНК-копии генома в геном клетки гены вируса реализовывались клеточной машиной [King et al., 2012; Flint et al., 2015].

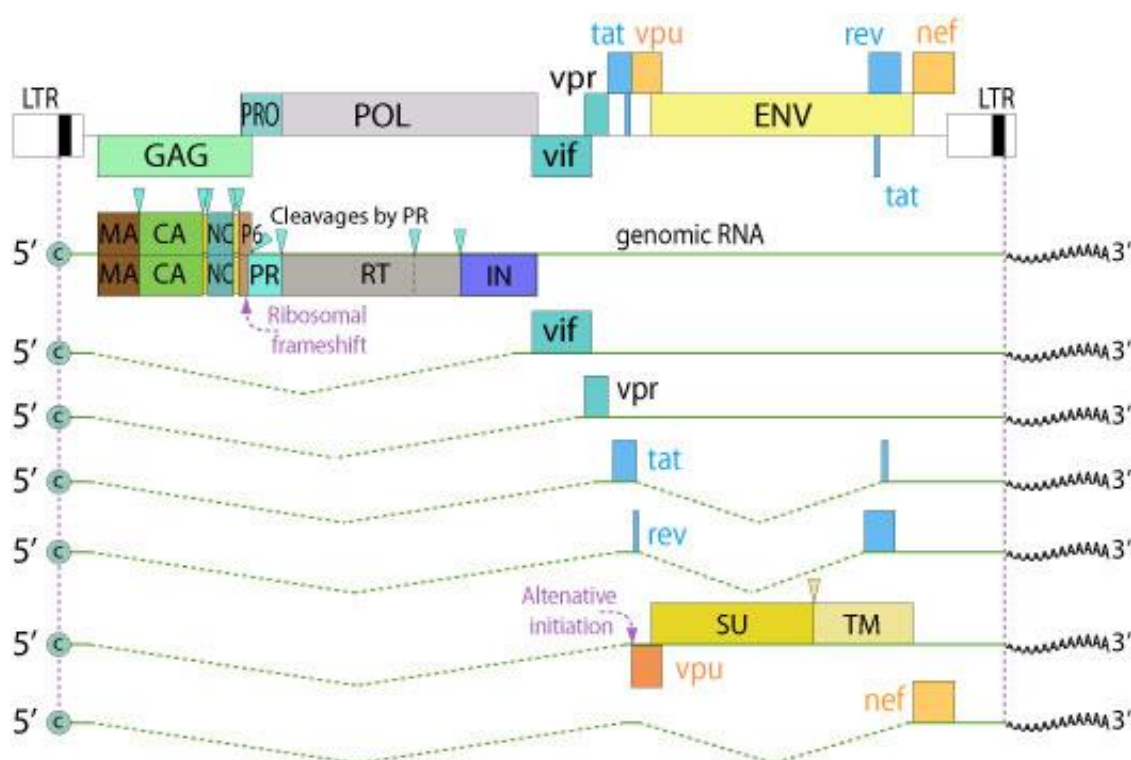
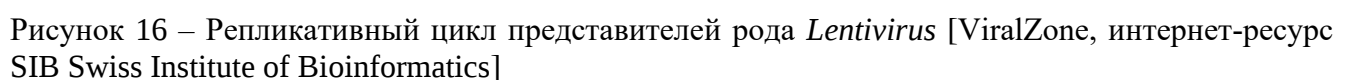


Рисунок 15 – Структура генома представителей рода *Lentivirus* и реализация генетической информации со встроенного провируса через альтернативный сплайсинг мРНК. Сайты разрезания: ▼ – вирусной протеазой PRO [ViralZone, интернет-ресурс SIB Swiss Institute of Bioinformatics]

Жизненный цикл лентивирусов (Рисунок 16) начинается со взаимодействия гликопротеина SU (gp120) с CD4 на поверхности лимфоцита с последующим связыванием хемокинового ко-рецептора CCR5 или CXCR4. Эти взаимодействия

приводят к изменению конформации белка ТМ (gp41), который опосредует слияние вирусной и клеточной мембран с образованием поры, через которую нуклеокапсид высвобождается в цитоплазму. Нуклеокапсид транспортируется по микротрубочкам к ядру, постепенно дестабилизируясь так, что внутрь капсида могут проникать нуклеотид-трифосфаты, тРНК и т.п. При этом активируется ОТ и происходит тРНК-праймированный синтез дцДНК на молекуле геномной оцРНК, с разрушением последней. По доставке полуразобранного капсида к комплексу ядерной поры, дцДНК провируса проникает в ядро, где с помощью интегразы IN встраивается в хромосому клетки. Встроенный в клеточный геном провирус довольно долго может быть неактивным, передаваясь из клетки в клетку при её делении [King et al., 2012; Flint et al., 2015].

В случае доступности ДНК провируса клеточная РНК полимераза II транскрибирует его с образованием несплайсированных мРНК, часть из которых может быть сплайсирована с образованием различных альтернативных мРНК. Сплайсированные и несплайсированные РНК клеточным транспортом экспортируются из ядра в цитоплазму, где транслируются с образованием вирусных белков. Трансляция сплайсированных мРНК приводит к синтезу минорных неструктурных белков *tat*, *rev*, *nef*. При этом белок *rev* активирует ядерный экспорт не полностью сплайсированных вирусных мРНК. Трансляция несплайсированных РНК приводит к синтезу полипротеинов *Env*, *Gag* и *Gag-Pol*, последние реализуются с одной мРНК за счёт сдвига рамки при трансляции (ribosomal frameshift). Полипротеины *Gag* и *Gag-Pol* расщепляются на отдельные функциональные белки вирусной протеазой PRO. При этом, белки, входящие в состав нуклеокапсида (CA, NC, MA), транспортируются к плазматической мембране. С мРНК *Env*, помимо полипротеина *Env*, синтезируются также дополнительные белки взаимодействия с клеткой *vif*, *vpr* и *vpr*. Полипротеин *Env* (gp160) котрансляционно транслоцируется в мембрану ЭПР и по клеточному секреторному пути доставляется на плазматическую мембрану, при этом при прохождении АГ он гликозилируется и разрезается на gp120 и gp41 клеточной протеазой фурином. Полностью несплайсированные мРНК – вирусные геномные



1.4.5. Характеристика вирусов рода *Enterovirus* семейства *Picornaviridae*

Род *Enterovirus* относится к семейству *Picornaviridae*. Энтеновирусы являются одними из самых распространенных вирусов, ежегодно заражающих около миллиарда человек по всему миру. Клинические проявления инфекции полиморфны: поражения кожи и слизистых в виде везикулярного стоматита, герпангины, ящуроподобного синдрома; поражения ЦНС в виде серозного менингита, полиомиелита, энцефалита; сепсис-подобные заболевания новорождённых и другие. При этом один энтеровирус может вызывать различные клинические проявления, и разные энтеровирусы могут вызвать сходные симптомы. Тем не менее, более 90% инфицирований протекают бессимптомно. Человек сталкивается с энтеровирусами множество раз за свою жизнь, развивая иммунитет к ним. Поэтому дети составляют 70-90% всех лиц с энтеровирусными инфекциями [King et al., 2012].

Классификация рода *Enterovirus* (представлены только вирусы, патогенные для человека и рассматриваемые в данной работе)[King et al., 2012; Rosenfeld, Racaniello, 2020; Coyne et al., 2020]:

род *Enterovirus*

Enterovirus A (25 серотипов: CVA 2-8, 10, 12, 16, ЭВ-А71 и др.)

Enterovirus B (63 серотипа: CVB1-6, Е 1-9, 11-21, 24-27, 29-33 и др.)

Enterovirus C (20 серотипов: ПВ-1,-2,-3, CVA 1, 11, 13, 17, 19, 20-22, 24)

Enterovirus D (5 серотипов: ЭВ-Д68, ЭВ-Д70)

Вирионы *Enterovirus* (Рисунок 17) представляют собой сферические безоболочечные маленькие частицы (~ 30 нм) с псевдоТ3 симметрией. Поверхность капсида образуют 60 протомеров белков VP1, VP2 и VP3; белок VP4 подлежит эти белки и необходим для проникновения генома в клетку. Внутри капсида находится вирусная геномная РНК, ассоциированная с белком Vpg. Вирион энтеровирусов отличается высокой устойчивостью к химическому воздействию органических растворителей и долго сохраняется во внешней среде [King et al., 2012; Rosenfeld, Racaniello, 2020; Coyne et al., 2020].

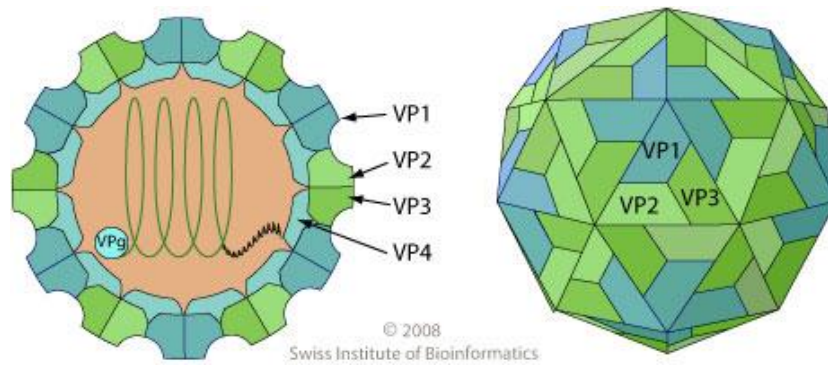


Рисунок 17 – Схема строения вириона представителей рода *Enterovirus* [ViralZone, интернет-ресурс SIB Swiss Institute of Bioinformatics]

Вирусный геном (Рисунок 18) представляет собой несегментированную одноцепочечную молекулу РНК положительной полярности, длиной 7200-8500 нт, имеющую на 5'-конце вирусный белок, ассоциированный с геномом, Vpg (virus protein genome linked), и на 3'-конце – полиадениловую последовательность. 5'-НТО содержит сложную вторичную РНК структуру – сайт посадки рибосомы IRES IV типа. РНК содержит порядка двух ОРС: основная кодирует структурные и неструктурные вирусные белки и 5'-концевая небольшая uORF (upstream ORF). Основная ОРС разделена на области P1 кодирует капсидные белки (VP4, VP2, VP3, VP1); P2 – белки 2A, 2B и 2C; P3 – белки 3A, 3B (Vpg), 3CPro (протеаза) и 3D RdRp (РНК-зависимая РНК полимераз). В средней части последовательности генома находится РНК структура *cre*-элемента, необходимая для репликации генома [Flint et al., 2015; Rosenfeld, Racaniello, 2020].

Жизненный цикл энтеровирусов (Рисунок 19) начинается со взаимодействия с рецепторами на поверхности клетки: CVA9, E1,8,9 – интегрины; CVA13,18,21, CVA16, ЭВ-A71 – PSGL-1; CVA21, CVB1-6, E3,6,7,11-13,20,21,24,29,30,33,70 – CD55; CVA24, ЭВ-Д70, ЭВ-Д68 – сиаловые кислоты; CVB1-6 – CXADR; ПВ1-3 – CD155 или PVR. Взаимодействие с рецептором запускает перестройку капсидных белков: белки VP1-3 расходятся, а белок VP4 образует канал, который пронизывает мембрану клетки. Это может происходить как в эндосоме, так и на поверхности клетки. После доставки геномной РНК в цитоплазму начинается её трансляция, при этом белок Vpg удаляется с РНК, и сборка рибосомы запускается связыванием факторов инициации трансляции непосредственно с IRES. С основной ОРС

транслируется один большой полипротеин, который далее нарезается вирусной химотрипсин-подобной цистеиновой протеазой 3C на функциональные комплексы белков и отдельные белки, кроме белка 2A, который вырезает себя автокаталитически. Репликация генома происходит в двумембранных везикулах, организованных неструктурными белками из мембран ЭПР. Белок Vpg является праймером для синтеза как комплементарных –оцРНК, так и геномных +оцРНК: сначала к остатку тирозина присоединяются 2 урацила с использованием цис-действующего элемента *cpe* как матрицы и 3D полимеразы; затем используя конструкцию VpgpUpU_{OH} как праймер полимеразы реплицирует геном. При этом часть молекул РНК отправляются обратно в трансляцию, но с накоплением капсидных белков новосинтезированные геномные РНК быстро упаковываются в прокапсиды с неразрезанными белками VP2-VP4, которые разрезаются с образованием зрелого капсида. Зрелые вирионы выходят из клеток, в основном, при лизисе клеток [Flint et al., 2015; Rosenfeld, Racaniello, 2020].

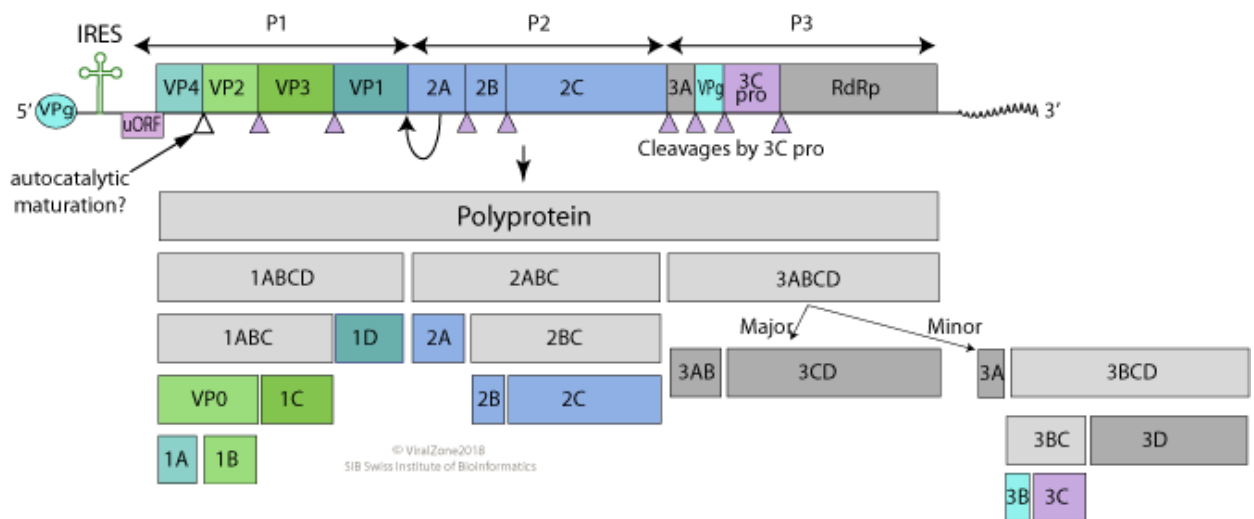


Рисунок 18 – Структура генома представителей рода *Enterovirus*, трансляция и процессинг полипротеина. Сайты разрезания: ▼ – вирусной протеазой 3C; ↑ – автокаталитически [ViralZone, интернет-ресурс SIB Swiss Institute of Bioinformatics]

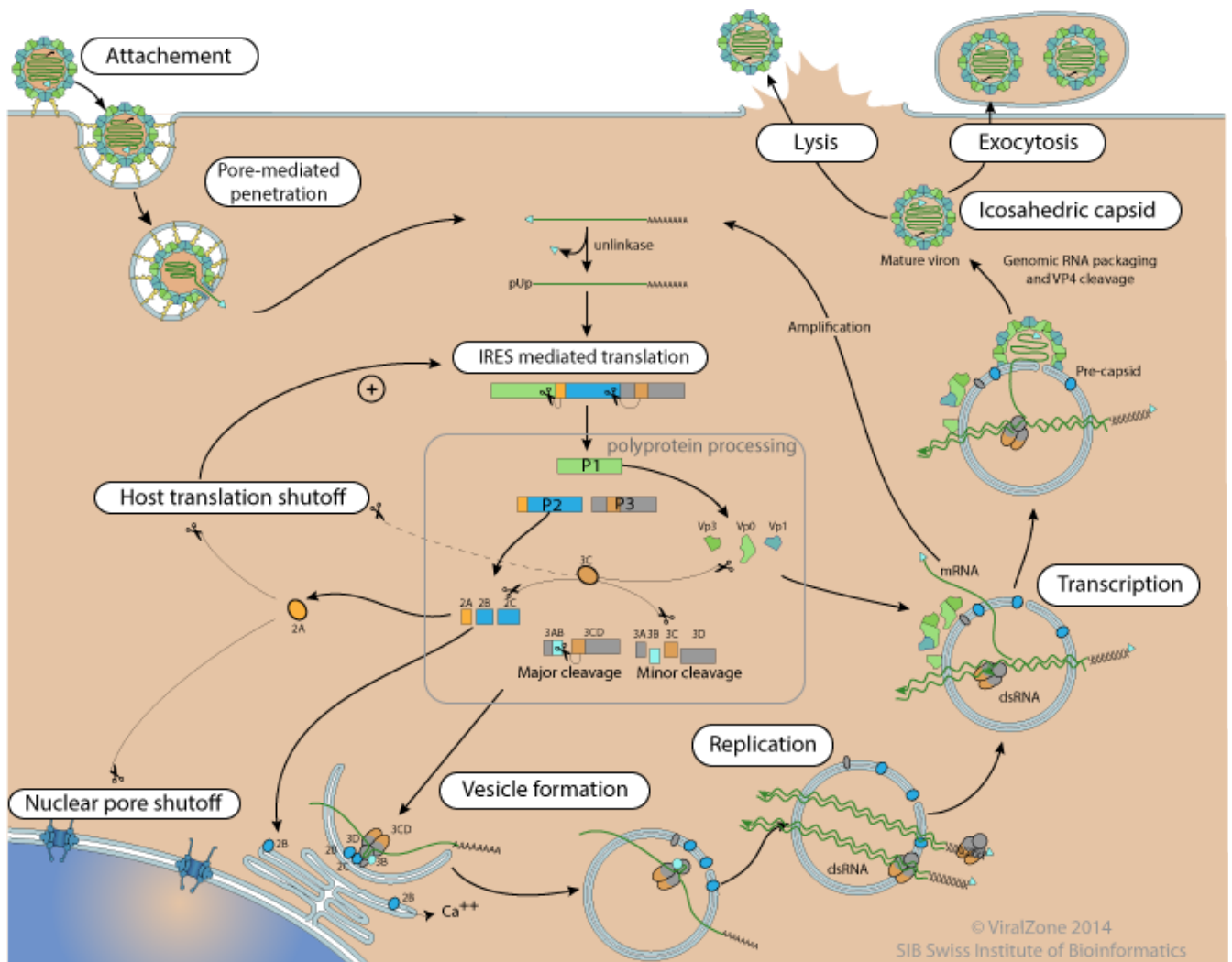


Рисунок 19 – Репликативный цикл представителей рода *Enterovirus* [ViralZone, интернет-ресурс SIB Swiss Institute of Bioinformatics]

1.5. Лекарственные препараты против используемых в работе РНК-содержащих вирусов

Вирусы – облигатные клеточные паразиты, т.е. их репродукция возможна только в живой, метаболически активной клетке. После выхода из клеток вирусная частица сохраняется в окружающей среде до следующего попадания на поверхность живой клетки.

Репликативный цикл РНК-содержащего вируса (Рисунок 20) начинается со связывания вириона с рецептором(-ами), что запускает изменение конформации белков вириона и/или сигнальный путь внутрь клетки с запуском эндоцитоза

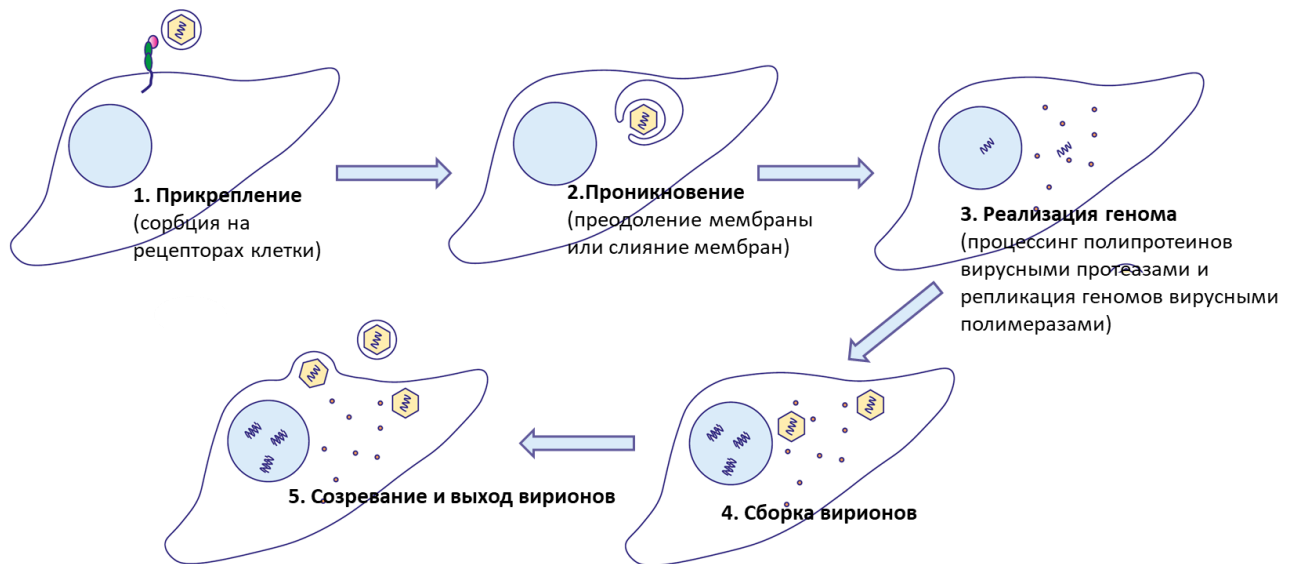


Рисунок 20 – Общая схема репликативного цикла РНК-содержащего вируса

вириона. Далее в эндосоме или на поверхности клетки происходят реакции, приводящие к доставке вирусного генома в цитоплазму клетки: в случае безоболочечного капсида это образование поры, пермеабилзация или лизис мембраны вирусными белками; в случае оболочечного вириона – слияние мембраны вирусной частицы и клетки, опосредованное только вирусными белками или с участием клеточных протеаз. После доставки генома в цитоплазму происходит синтез вирусной мРНК: для –оцРНК через транскрипцию вирионной РНК-зависимой РНК полимеразой, для +оцРНК – она сама является мРНК, у вирусов с ОТ – происходит ОТ с помощью вирионной ревертазы с последующей доставкой в ядро и встраиванием в геном клетки вирионной интегразой, а уже встроенный провирус транскрибируется клеточной РНК полимеразой II. Вирусная мРНК используется для синтеза вирусных белков, в виде отдельных белков, одного или нескольких полипротеинов, которые затем процессируются вирусной(-ыми) протеазами. С накоплением белков начинается стадия репликации генома (кроме вирусов с ОТ, у которых полногеномная мРНК и упаковывается дальше в вирионы), осуществляемая вирусной RdRp в комплексе с другими неструктурными вирусными и клеточными белками. С накоплением белков вириона и дочерних вирусных геномов происходит сборка вирионов с последующим созреванием (протеолитическое расщепление белков вирусными и клеточными протеазами,

гликозилирование белков вириона и т.д.) и выходом из клетки путём экзоцитоза или лизиса клеток [Flint et al., 2015].

Блокирование любой из стадий репликативного цикла вируса приведёт к ингибированию репродукции вируса. Далее будут рассмотрены ингибиторы некоторых стадий репродукции рассматриваемых в работе РНК-содержащих вирусов и их конкретные молекулярные мишени.

1.5.1. Ингибирование связывания вириона с рецептором

Блокирование начальных стадий репликативного цикла вируса – связывания с рецептором и проникновения – кажутся наиболее перспективными для создания лекарственных препаратов. Во-первых, клетка ещё не инфицирована, она не будет уничтожена в результате программируемой клеточной смерти или атаки иммунной системы и может продолжить выполнять свои функции. Во-вторых, отсутствие необходимости проникать в клетку накладывает меньше требований на саму молекулу ингибитора. Более того, естественный процесс нейтрализации вируса антителами иммунной системы хозяина, чаще всего, основан на остановке его взаимодействия с рецептором.

Для ВИЧ блокирование связывания с рецептором CD4 или ко-рецептором CCR5 ингибирует вирусную инфекцию. С помощью высокоэффективных скринингов были выявлены аналоги NBD (N-фенил-N-пиперидин-4-ил-оксаламид), которые связываются с gp120, мешая связыванию с CD4, и ингибируют проникновение вируса в клетку [Zhao et al., 2005; Curelli et al., 2015], а фостемавир стал первым ингибитором связывания, разрешённым к применению у пациентов с мультирезистентными формами ВИЧ-инфекции [Hanna et al., 2011; Nowicka-Sans et al., 2012; Kozal et al., 2020]. Множественные антагонисты ко-рецептора CCR5, такие как аплавирок, маравирок, ТАК-779 и викривирок, были разработаны для блокирования проникновения ВИЧ-1 [Qi et al., 2020; Baba et al., 1999; Maeda et al., 2004; Strizki et al., 2005; Dorr et al., 2005; Tagat et al., 2004]. Ингибиторы связывания с ко-рецептором CXCR4, такие как AMD3100, AMD3465 и AMD070, также

демонстрируют наномолярную ингибирующую активность в отношении ВИЧ [Donzella et al., 1998; Hatse et al., 2005; Skerlj et al., 2010; Zhang et al., 2020].

Растворимый рекомбинантный человеческий ACE2 (rhACE2) ингибирует связывание SARS-CoV-2 с клетками, экспрессирующими ACE2 [Wang et al., 2020], и защищает легкие от тяжёлых поражений во время острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС) [Khan et al., 2017; Monteil et al., 2020]. Несколько исследовательских групп показали, что белки, имитирующие протяжённые участки эктодомена ACE2, способны ингибировать SARS-CoV-2 инфекцию в культуре клеток [Curelli et al., 2020], однако ингибирование короткими пептидами оказалось неэффективным. Для повышения активности более коротких миметиков ACE2 их объединили в домены анкириновыми повторами (DARPin) в качестве каркасов. Такая конструкция ингибировала репродукцию SARS-CoV-2 *in vitro* [Stumpp et al., 2020].

1.5.2. Ингибирование проникновения вируса в клетку

Репликативный цикл оболочечных вирусов содержит стадию слияния мембран, необходимую для доставки нуклеокапсида/генома вируса в цитоплазму клетки. Белки слияния являются удобной мишенью для ингибирования проникновения вирусов.

Ингибиторы слияния ВИЧ с клеткой обычно нацелены на взаимодействие с белком слияния gp41. Как и у других белков слияния I класса, в составе gp41 есть гептадные повторы HR-1 и HR-2, необходимые для осуществления конформационной перестройки в процессе слияния мембран. Было предложено несколько малых молекул, связывающихся с этими повторами и ингибирующими вирусную инфекцию и распространение вируса из клетки в клетку *in vitro* в микромолярных концентрациях: ADS-J1 для HR-1 [Yu et al., 2014] и 5M038 для HR-2 [Frey et al., 2006]. Также ингибиторами слияния ВИЧ являются молекулы, связывающиеся с консервативным доменом MPER белка gp41, обнаруженного посредством мэппинга нейтрализующими антителами. Декалинийум и его производные действуют по такому механизму и ингибируют инфекцию,

вызванную широким набором штаммов ВИЧ-1, ВИЧ-2 и SIV с EC_{50} 2-20 мкМ [Xiao et al., 2020].

Гептадные повторы белка шипа S SARS-CoV-2 также стали мишенью для противовирусных средств. Так миметики гептадного повтора HR2 могут блокировать слияние мембраны вириона и клетки, предотвращая взаимодействие между повторами HR1 и HR2 внутри белка S и ингибируя слияние мембран [Zhu et al., 2020].

Безоболочечные вирусы используют разные механизмы для проникновения в клетку и доставки генома в цитоплазму: образование поры и разные варианты лизиса мембраны. В этом случае, конкретный белок и специфический механизм становятся мишенями для противовирусных ингибиторов.

Плеконарил был разработан уже более 20 лет назад как пероральный, биодоступный и системно действующий низкомолекулярный ингибитор (Рисунок 21) широкого спектра энтеровирусов и риновирусов. Это соединение действует через связывание с белками капсида, которое мешает осуществлению конформационных перестроек, необходимых для доставки вирусной РНК в цитоплазму клетки [Revear et al., 1999]. Показано, что плеконарил способен ингибировать инфекцию разных штаммов ЭВ-А71 *in vitro* и *in vivo* [Zhang et al., 2012].

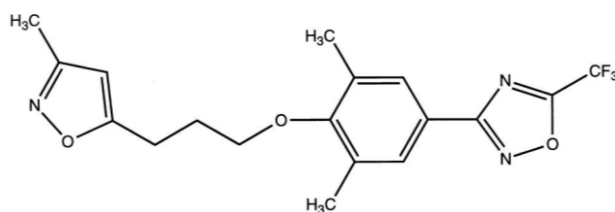


Рисунок 21 – Структура плеконарила

1.5.3. Ингибирование работы вирусных полимераз

Используемые РНК-содержащими вирусами полимеразы могут иметь разную активность и специфичность: РНК-зависимые РНК полимеразы (RdRp) и РНК-зависимые ДНК полимеразы или обратные транскриптазы (ОТ). Оба этих

белка несвойственны нормальной соматической клетке, что делает их очень привлекательными мишенями для противовирусных средств.

Нуклеозиды широко используются и широко изучаются в качестве противовирусных соединений [De Clercq, 2011, 2013]. Многочисленные терапевтические средства на основе нуклеозидов были разработаны и применяются для лечения инфекций, вызванных ВИЧ, ВГС и ВПГ-1 [De Clercq, 2013; Jordheim et al., 2013]. Рассматривался ряд механизмов действия этих соединений, но в целом большинство из них нарушают механизм репликации вирусного генома, конкурируя с нативными нуклеотидами.

Для ингибирования репликации генома ВИЧ были успешно разработаны нуклеозидные ингибиторы ОТ (НИОТ) и ненуклеозидные ингибиторы ОТ (ННИОТ), нацеленные на ингибирование стадии обратной транскрипции. С одной стороны, 5'-трифосфаты НИОТ действуют как терминаторы цепи, так как в них отсутствует 3'ОН-группа, и включение НИОТ во вновь синтезируемую двухцепочечную ДНК прекращает удлинение, тем самым блокируя обратную транскрипцию ВИЧ [Das, Arnold, 2013]. С другой стороны, ННИОТ являются аллостерическими ингибиторами, связывание ННИОТ с гидрофобным карманом около каталитического сайта ОТ ВИЧ-1 [Sluis-Cremer, Tachedjian, 2008] вызывает изменения конформации последнего, тем самым прерывая синтез вирусной двухцепочечной ДНК [De Clercq, Li, 2016].

Нуклеозидные аналоги 7-деаза-2'-С-метиладенозин, 2'-С-метиладенозин и 2'-С-метилцитидин ингибировали репродукцию различных представителей семейства *Flaviviridae*: ВГС [Sofia et al., 2012] и ДЕНВ [Chen et al., 2015] и ВКЭ (шт. Neudorfl и Huynh). Примечательно, что известный противовирусный препарат широкого спектра действия рибавирин оказался неэффективен в качестве ингибитора репродукции ВКЭ *in vitro* [Eyer et al., 2015, 2016].

Однако, рибавирин эффективно увеличивал жизнеспособность инфицированных ЭВ-А71 клеток, но не защищал инфицированных мышей [Zhang et al., 2012].

Для ингибирования репликации генома SARS-CoV-2 в клинической практике применяется ремдесивир. Препарат представляет собой аналог рибонуклеотида (Рисунок 22). Ремдесивир действует как терминатор цепи, препятствуя полимеразной активности вирусной РНК полимеразы и избегая проверки вирусной экзорибонуклеазой [Eastman et al., 2020].

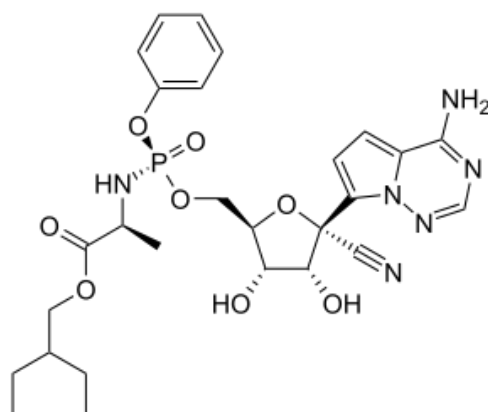


Рисунок 22 – Структура ремдесевира

Другим ингибитором РНК полимеразы SARS-CoV-2 является молнупиравир – пролекарство N-гидроксицитидина (NHC), аналога цитидина, действующего по механизму летального мутагенеза. NHC ингибирует репликацию широкого спектра РНК-содержащих вирусов с различными типами генома и циклами репликации: вирусы с +оцРНК геномом ВГС и ЧИКВ [Stuyver et al., 2003] и с –оцРНК геномом вирус Эбола [Reynard et al., 2015].

1.5.4. Ингибирование работы вирусных протеаз

Вирусные протеазы относятся к разным классам: сериновые, цистеиновые и т.п. Многие из них отличаются от внутриклеточных протеаз, что позволяет их ингибировать специфически, не затрагивая работу клеточных систем и снижая токсичность лечения.

Существует несколько одобренных к применению ингибиторов протеазы ВИЧ, которые мимикрируют взаимодействие белка с субстратом, например, amprenavir, atazanavir, indinavir, loprinavir, nelfinavir, ritonavir и saquinavir [Weber et

al., 2021]. Все эти соединения являются пептидомиметиками. Единственный непептидный ингибитор – типранавир [Doyon et al., 2005] (Рисунок 23).

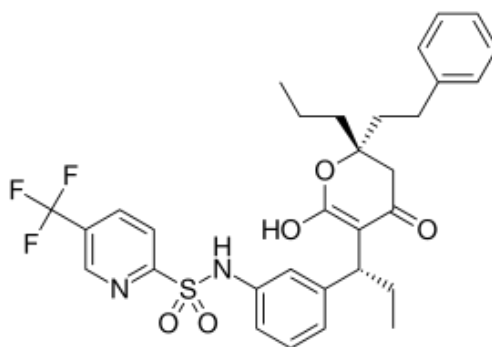


Рисунок 23 – Структура типранавира

Коронавирусы кодируют две протеазы: химотрипсиноподобную цистеиновую протеазу (3CLpro или Mpro; nsp5) и папаиноподобную сериновую протеазу (PLpro; nsp3). Кандидатных ингибиторов Mpro больше, чем ингибиторов PLpro, из-за сходства этого фермента с протеазами других видов вирусов, а также потому, что Mpro меньше, проще по структуре, и её легче экспрессировать в больших количествах в рекомбинантных системах [Cannalire et al., 2022]. Скрининги противовирусной активности, нацеленные на Mpro SARS-CoV-2, выявили множество соединений, которые ингибируют SARS-CoV и SARS-CoV-2 в биохимических и клеточных тестах с EC_{50} в диапазоне от 0,01 до 1 мкМ. Эти соединения принадлежат к нескольким семействам обратимо и ковалентно связывающихся пептидомиметиков [Hoffman et al., 2020; Jin et al., 2020; Hattori et al., 2021]. PF-00835231 является одним из наиболее перспективных исследуемых ингибиторов Mpro с заявленной активностью EC_{50} ингибирования фермента 0,0003 мкМ [Hoffman et al., 2020] и EC_{50} в клеточной культуре (с добавлением блокатора транспорта) 0,2 мкМ [de Vries et al., 2021]. Он прошел несколько клинических испытаний (NCT04535167, NCT04756531).

Эбселен – синтетический селеноорганический препарат с противовоспалительными и антиоксидантными свойствами, который, ингибирует Mpro с EC_{50} в биохимических и *in vitro* тестах со значениями EC_{50} около 1 мкМ [Jin et al., 2020]. По-видимому, он аллостерически ингибирует Mpro [Menendez et al.,

2020], а также PLpro [Weglarz-Tomczak et al., 2021]. Изучается возможность применения эбселена как перорального противовирусного препарата в двух небольших плацебо-контролируемых исследованиях II фазы (NCT04484025, NCT04483973).

Сообщалось о многих ингибиторах ортофлавивирусной протеазы NS2b-NS3, но ни один из них не достиг клинической стадии [van den Elsen et al., 2023]. Одно из этих соединений 4-(NH₂CH₂)-Ph проявляло активность против протеаз сразу нескольких переносимых комарами ортофлавивирусов: ЗИКВ, ДЕНВ 2 и 3 типов и ВЗН. Его активность связана со способностью «запирать» NS3 в открытой конформации, блокируя её связывание с кофактором NS2B или субстратом, что необходимо для выполнения протеазной функции. Было показано, что соединение обладает высокой противовирусной активностью против вышеупомянутых вирусов в экспериментах *in vitro*, ингибируя репликацию вируса без значительной цитотоксичности. Соединение проявило активность со значением EC₅₀ 120 нМ. Эксперименты на мышинной модели ЗИКВ инфекции показали хорошую переносимость препарата и значительное повышение выживаемости животных [Yao et al., 2019].

1.5.5. Ингибирование интегразы ВИЧ

Ингибиторы интегразы подавляют развитие ВИЧ инфекции, блокируя стадию переноса цепи при интеграции ДНК провируса в геном клетки. Эти препараты являются активными и селективными антиретровирусными препаратами с суб- и низкой наномолярной активностью *in vitro*. В отношении клинических изолятов ВИЧ-1 EC₅₀ *in vitro* составляют примерно 0,1 нг/мл для каботегавира, 0,2 нг/мл для биктегавира и долутегавира; и колеблются от 0,04–0,6 нг/мл для элвитегавира и 2,2–5,3 нг/мл для ралтегавира [Scarsi et al., 2020].

1.5.6. Клеточные белки как мишени для противовирусных препаратов

Ингибирование активности клеточных белков часто связано с высокой токсичностью ингибиторов на животных моделях, ввиду участия белков-мишеней

в нормальных клеточных процессах. Поэтому использование клеточных белков как мишеней для противовирусных препаратов сопряжено со сложностями.

Клеточные протеазы необходимы для созревания или активации вирусных оболочечных белков. SARS-CoV-2 использует для проникновения протеазы TMPRSS2 на поверхности клеток или катепсин L в эндосомах. Для ингибирования TMPRSS2 исследовали камостат мезилат, однако он оказался неэффективен для лечения госпитализированных пациентов с COVID-19 [Gunst et al., 2021]. Ингибиторы катепсина L, галлинамид и телочибуфаргин, были предложены для совместного применения с ремдесевиром или молнупиравиром, соответственно, для повышения эффективности противовирусной терапии [Aiello et al., 2022].

Вирусы используют клеточный везикулярный транспорт как для проникновения в клетку, так и для созревания вирусных белков, сборки и выхода вирионов. Неспецифические ингибиторы везикулярного (эндосомального) транспорта хлорохин и гидроксихлорохин проявляют невысокую активность *in vitro* в отношении SARS-CoV-2 инфекции, однако оказались неэффективными для профилактики и лечения COVID-19 [Recovery collaborative group et al., 2020; Axfors et al., 2021; Mitja et al., 2021], скорее всего из-за одновременного использования различных путей проникновения вирусом SARS-CoV-2 и невозможности создать достаточную концентрацию соединения в тканях лёгких.

Апилимод, противораковый препарат, ингибирует внутриклеточный транспорт нескольких вирусов, включая SARS-CoV, MERS-COV и SARS-CoV-2, на ранних стадиях репликации вируса. Он ингибирует фосфатидилинозитол-3-фосфат-5-киназу, участвующую в формировании эндосомальной мембраны, необходимой для формирования везикулы и проникновения вириона [Kang et al., 2020].

Существует множество различных путей и мишеней для ингибирования репродукции вирусов. При этом, не всегда зная химическую структуру соединения можно предсказать возможный механизм действия ингибитора, особенно при анализе «первых в своём классе» соединений. При разработке фенотипических

методик, особенно скрининговых, следует использовать тест-системы, включающие как можно больше стадий репликативного цикла вирусов и клеточных путей в нём задействованных, для наиболее полного моделирования протекания вирусной инфекции в клеточном тесте.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Культуры клеток

В работе использовали перевиваемые линии клеток различного происхождения из коллекции ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита):

- почки эмбриона свиньи СПЭВ;
- почки зелёной мартышки Vero (WHO Biologicals);
- рабдомиосаркомы человека RD (NIBSC);
- Т-лимфоциты, инфицированные вирусом Т-клеточного лейкоза приматов 1 типа (PTLV-1) MT-4 (NIH AIDS, ARP-120).

Клетки пассировали на среде, подходящей конкретной линии клеток: для клеток СПЭВ – 199 на солях Эрла и Хэнкса (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)) с 5% FBS (Gibco) и пенициллином, стрептомицином; для клеток Vero – ДМЕМ (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)) с 5% FBS (Gibco) и пенициллином, стрептомицином; для клеток RD Игла MEM с двойным набором аминокислот и витаминов (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)) с 5% FBS (Gibco) и пенициллином, стрептомицином; для клеток MT-4 – RPMI-1640 (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)) с 10% FBS (Gibco) и гентамицином. Пассированием линий клеток занимались сотрудники ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита): к.б.н. Мустафина А.Н., Рогова Ю.В., Шустова Е.Ю., Антонова И.П., Яковчук Е.В. и автор данной работы.

2.1.2. Вирусы

В работе были использованы следующие вирусы и их штаммы:

- ВКЭ шт. Абсеттаров (GenBank ID KU885457), 256 (GenBank ID AF091014), 205КГГ (GenBank ID GU121964), ДВ936к (GenBank ID GU125722), Васильченко (GenBank ID L40361), ЭК-328 (GenBank ID DQ486861), Лесопарк11 (GenBank ID KJ701416), TB08-T2546 (GenBank ID KU052690);
- ПОВ шт. Пов24 (GenBank ID KU160627);
- ВОГЛ шт. Никитина (GenBank ID GU290187);
- SARS-CoV-2 шт. ПИК35 (Pango lineage B.1.1, GISAID EPI_ISL_428852), 4724d варианта Дельта (GISAID EPI_ISL_8799478) и 7995o варианта Омикрон (Pango lineage BA.1, GISAID EPI_ISL_9613539)
- ЧИКВ шт. Nic (GenBank ID MN271691-2);
- энтеровирусы шт. 46973 (GenBank ID KJ645808) и шт. BrCr (GenBank ID U22521) энтеровируса A71 (ЭВ-A71), шт. 49360 вируса Коксаки A16 (CVA16) (GenBank ID MK704491) энтеровирусов вида А; шт. 48461 эховируса 30 (E30) (GenBank ID MK704489) и шт. 57088 эховируса 13 (E13) (GenBank ID MK704490) энтеровирусов вида В; вакцинный шт. Sabin1 полиовируса типа 1 (PV1) (GenBank ID AY184219) и шт. 48793 вируса Коксаки A21 (CVA21) (GenBank ID MK704492) энтеровирусов вида С;
- ВИЧ-1 шт. NL4-3, полученный путем трансфекции клеток плазмидой pNL4-3 (ARP2006, NIBSC, Великобритания).

Штаммы SARS-CoV-2 были выделены и охарактеризованы автором в ходе данной работы. Часть штаммов энтеровирусов и часть штаммов ВКЭ также были охарактеризованы автором в данной работе.

Вирусы хранили в виде суспензии заражённых клеток при -70°C.

2.1.3. Соединения

Соединения и препараты для проведения исследований были получены и любезно предоставлены:

- к.х.н. Араловым А.В., д.х.н. В.А. Коршуном, к.х.н. А.В. Устиновым, А.А. Чистовым и другими сотрудниками Группы молекулярных

инструментов для исследования живых систем и Лаборатории молекулярного дизайна и синтеза ИБХ РАН;

- к.х.н. В.Е. Ословским, М.С. Дреничевым, проф. С.Н. Михайловым, к.х.н. Е.С. Матюгиной, к.х.н. А.Л. Хандажинской, к.х.н. Л.А. Александровой и другими сотрудниками лабораторий ИМБ РАН;
- к.х.н. Е.Б. Авериной, к.х.н. К.Н. Седенковой, к.х.н. Василенко Д.А., проф., д.х.н. Перминовой И.В., к.х.н. Жеребкером А.Я. и другими сотрудниками химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова;
- к.фарм.н. Д.О. Шаталовым МИТХТ им. М. В. Ломоносова, МИРЭА РТУ;
- к.х.н. А.М. Варижук ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России;
- д.х.н., доцентом В.В. Доценко ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет».

Соединения предоставлялись в сухом виде. Для приготовления растворов соединение взвешивали на аналитических весах (сотрудник ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) Хватов Е.В. или автор данной работы) и разводили в 100% ДМСО (Sigma) до концентрации 5 мМ (иногда 1 мМ в случае плохой растворимости соединения или 10 мМ в случае низкой активности соединения).

2.2. Методы выделения и титрования вируса в культуре клеток

2.2.1. Выделение изолятов вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero

Для выделения вируса использовали мазки из носоглотки (сухие ватные тампоны) пациентов с первичным диагнозом COVID-19, поступающим в московские больницы (ГКБ ДЗМ №40, ИКБ №1 ДЗМ). Этические заключения на исследования были получены в больницах для каждого конкретного проекта, в рамках которого собирался биоматериал.

Ватный тампон вортиксировали в 500 мкл физиологического раствора или среды ДМЕМ (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт

полиомиелита), Россия) с 5-кратным набором антибиотиков (пенициллин/стрептомицин, ПанЭко, Россия). Суспензию (250 мкл) добавляли к 24-72-часовым конфлюэнтным монослоям клеток Vero на пробирках (5 см²) с 2 мл среды ДМЕМ с 5-кратным набором антибиотиков. Клетки инкубировали при 37°C и ежедневно наблюдали за признаками ЦПД. В случае отсутствия или слабых признаков ЦПД через 7 дней делали 2-й пассаж. Пробирки 1 пассажа замораживали/оттаивали для высвобождения вирионов из лизированных клеток. 1 мл суспензии переносили в пробирку (5 см²) со свежим 24-72-часовым конфлюэнтным монослоем клеток Vero и 1 мл среды ДМЕМ с 5-кратным набором антибиотиков. Клетки инкубировали при 37°C и ежедневно наблюдали за признаками ЦПД. Через 7 дней в случае отсутствия признаков ЦПД пробирку уничтожали; в случае детекции признаков ЦПД проводили замораживание/оттаивание, полученную суспензию исследовали на наличие вирусной РНК с помощью ПОЛИВИР SARS-CoV-2 (Литех, Россия). Далее изолят вируса хранили на -70°C и использовали для получения последовательности генома вируса, наработки вирусного стока и проведения экспериментов [Kozlovskaya et al., 2020].

2.2.2. Выделение изолятов энтеровирусов в культуре клеток RD

Для выделения вируса использовали пробы фекалий, сточных вод, мазков из ротоглотки и цереброспинальной жидкости пациентов с первичным диагнозом ОВП или ЭВИ, детей из групп риска и др. Пробы были взяты в рамках осуществления Национальных программ надзора за полиомиелитом и энтеровирусной инфекцией в РФ и некоторых странах СНГ и получены в референс-лаборатории ВОЗ по надзору за полиомиелитом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). Этическое заключение на исследование получено в больницах для каждого конкретного проекта, в рамках которого собирался биоматериал.

Первичные пробы суспензировали, обрабатывали хлороформом для удаления загрязнителей и использовали для заражения культуры клеток.

Суспензию (500-800 мкл) добавляли к 48-72-часовым конфлюэнтным монослоям клеток RD на флаконах (25 см²) с 8 мл среды 2×EMEM (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия). Клетки инкубировали при 37°C и ежедневно наблюдали за признаками ЦПД. Через 5 дней флакон с клетками замораживали/оттаивали и делали 2-й пассаж. 300 мкл суспензии 1-го пассажа переносили в пробирку (5 см²) со свежим 48-72-часовым конфлюэнтным монослоем клеток RD и с 2 мл среды 2×EMEM. Клетки инкубировали при 37°C и ежедневно наблюдали за признаками ЦПД. Через 5 дней в случае отсутствия признаков ЦПД пробирку уничтожали; в случае детекции признаков ЦПД проводили замораживание/оттаивание, полученную суспензию исследовали на наличие вирусной РНК с помощью ОТ-ПЦР (CDC, США). Далее изолят вируса хранили на -70°C и использовали для получения последовательности генома вируса, наработки вирусного стока и проведения необходимых экспериментов [WHO, 2004].

2.2.3. Титрование вируса по цитопатическому действию (ЦПД) в культуре клеток Vero

Готовили 10-кратные разведения вирусосодержащей суспензии (от 4 до 8 последовательных разведений), объёмом 1 мл. Разведения добавляли к слившимся монослоям клеток на 72 часа после посадки в 96-луночных планшетах по 100 мкл в 8 повторах. После 5-дневной инкубации при 37°C признаки ЦПД визуально оценивали в световой микроскоп.

Титр вируса рассчитывали в lg количества 50% цитотоксических доз (ТЦД₅₀) по методу Кербера [Karber, 1931] в 100 мкл или 1 мл вирусосодержащего материала. По результатам 2-3 титрований рассчитывали средний геометрический титр вируса. Стандартное отклонение между разными экспериментами составляло не более 0,5 lg.

2.2.4. Титрование энтеровирусов по цитопатическому действию (ЦПД) в культуре клеток RD

Готовили 10-кратные разведения вирусосодержащей суспензии (от 4 до 8 последовательных разведений), объёмом 1 мл. Разведения разливали в 96-луночные планшеты по 25 мкл минимум в 8 повторах и вносили 100 мкл суспензии клеток RD (примерно 1×10^5 клеток на лунку) в 2×ЕМЕМ (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия), содержащей 5% FBS (Invitrogen, South America). После 5-дневной инкубации при 37°C признаки ЦПД визуально оценивали в световой микроскоп [WHO, 2004].

Титр вируса рассчитывали в lg количества 50% цитотоксических доз (ЦТД₅₀) по методу Кербера [Karber, 1931] в 100 мкл или 1 мл вирусосодержащего материала. По результатам 2-3 титрований рассчитывали средний геометрический титр вируса. Стандартное отклонение в разных экспериментах составляло не более 0,5 lg [WHO, 2004].

2.2.5. Титрование вируса по бляшкообразующим единицам (БОЕ) в культуре клеток СПЭВ под агаровым покрытием

Титрование инфекционного вируса проводили методом бляшек под агаровым покрытием в культуре клеток СПЭВ по ранее описанной методике [Romanova et al., 2007] на пластиковых 6-луночных планшетах. К конфлюэнтным монослоям клеток на 72 часа после посадки добавляли 400 мкл 10-кратных разведений вирусосодержащего материала в среде 199 на растворе Эрла (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия), проводили сорбцию в течение 1 часа при 37°C, затем добавляли 5 мл 1% агарового покрытия, содержащее 5% FBS (Invitrogen, South America) и 0,015 % нейтрального красного. В каждый опыт включали титрование вируса с известным титром и контроль незаражённых клеток. Бляшки учитывали на 7 день, но наблюдали появление новых бляшек до 14 дня.

Титр вируса выражали в lg количества БОЕ в 1 мл вирусосодержащего материала. По 2-3 титрованиями рассчитывали средний геометрический титр

вируса. Стандартное отклонение в одном эксперименте составляло 0,2 lg, а в разных экспериментах – 0,3 lg.

Для окраски бляшек на 7-10 день пластины с агаровым покрытием фиксировали 5% раствором трихлоруксусной кислоты в течение 40 мин. После чего агар удаляли, поверхность промывали водой и окрашивали 0,4% водно-спиртовым (10% этанола) раствором генциан виолета в течение нескольких минут. Затем краску удаляли, пластину промывали водой и сушили на воздухе. Бляшки учитывали визуально [Osolodkin et al., 2013].

2.2.6. Титрование вируса по бляшкообразующим единицам (БОЕ) в культуре клеток СПЭВ под метилцеллюлозным покрытием

Титрование инфекционного вируса проводили методом бляшек под метилцеллюлозным покрытием в культуре клеток СПЭВ на пластиковых 24-луночных планшетах. К конфлюэнтным монослоям клеток на 72 часа после посадки добавляли 100 мкл десятикратных разведений вируссодержащего материала в среде 199 на растворе Эрла (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия), проводили сорбцию в течение 1 часа при 37°C, затем добавляли 1 мл 1,26% метилцеллюлозного покрытия на среде 199 на растворах Хэнкса и Эрла (2:1) (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия) с 2% FBS (Invitrogen, South America). В каждый опыт включали титрование вируса с известным титром и контроль незаражённых клеток.

Окрашивание бляшек проводили на 4 день. Для этого удаляли покрытие из лунок, клетки промывали PBS (Sigma, USA) или средой 199 (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия) 2 раза. Затем клетки фиксировали 1 мл 96% этанола и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Зафиксированные клетки промывали водой, окрашивали 0,6% водно-спиртовым (10% этанола) раствором кристалл виолета. Затем краску собирали, окрашенные клетки промывали водой и сушили на воздухе. Бляшки учитывали визуально.

Титр вируса выражали в lg количества БОЕ в 1 мл вирусосодержащего материала. По 2-3 титрованиям рассчитывали средний геометрический титр вируса. Стандартное отклонение в одном эксперименте составляло 0,2 lg, а в разных экспериментах – 0,3 lg.

2.2.7. Титрование вируса по фокусобразующим единицам (ФОЕ) в культуре клеток СПЭВ под метилцеллюлозным покрытием

Титрование инфекционного вируса проводили методом бляшек под метилцеллюлозным покрытием в культуре клеток СПЭВ на пластиковых 24-луночных планшетах. К конфлюэнтным монослоям клеток на 72 часа после посадки добавляли 100 мкл десятикратных разведений вирусосодержащего материала в среде 199 на растворе Эрла (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия), проводили сорбцию в течение 1 часа при 37°C, затем добавляли 1 мл 1,26% метилцеллюлозного покрытия на среде 199 на растворах Хэнкса и Эрла (2:1) (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия) с 2% FBS (Invitrogen, South America). В каждый опыт включали титрование вируса с известным титром и контроль незаражённых клеток.

Иммуноокрашивание фокусов (очагов заражённых клеток) проводили на 3 день. Для этого удаляли покрытие из лунок, клетки промывали PBS (Sigma, USA) 2 раза. Затем клетки заливали 1 мл 96% этанола и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Зафиксированные клетки промывали PBS, добавляли первичные антитела: кроличью сыворотку к вакцине (Rabbit anti-FSME serum, AP3554, NIH, USA, 1:100) и инкубировали 2 ч на 37°C в CO₂-инкубаторе или ночь при 4°C. Клетки промывали PBS 3 раза и добавляли вторичные антитела: антикроличьи, меченые пероксидазой хрена (anti-rabbit Ab, Thermo Scientific, USA, 1:2500), и инкубировали 2 ч при 37°C. Затем клетки промывали PBS 3 раза и добавляли раствор красителя: 5 мг DAB, 50 мкл 3% H₂O₂ в 10 мл PBS. После 30 мин инкубации фокусы учитывали визуально.

Титр вируса выражали в lg количества ФОЕ в 1 мл вируссодержащего материала. По 2-3 титрованиям рассчитывали средний геометрический титр вируса. Стандартное отклонение в одном эксперименте составляло 0,2 lg, а в разных экспериментах – 0,3 lg.

2.3. Методы оценки токсического действия соединений в культуре клеток

2.3.1. Анализ токсического действия соединений по гибели клеток, детектируемой визуально методом световой микроскопии, для линий клеток СПЭВ, Vero, RD и MT-4

Готовили восемь двукратных разведений растворов соединений (обычно 5 мМ в ДМСО) и ДМСО (Sigma, USA) в качестве отрицательного контроля в культуральной среде, соответствующей выбранной культуре клеток: 199 на Эрле для СПЭВ, DMEM для Vero, 2×EMEM для RD и RPMI-1640 для MT-4 (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия). Разведения соединений добавляли к монослоям клеток Vero или СПЭВ в 2 повторах, или суспензию клеток RD или MT-4 добавляли к разведениям соединений. Конечная серия концентраций из восьми разведений начиналась с 1:50. После инкубации при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 3-10 дней в зависимости от линии клеток, гибель клеток и морфологические изменения фиксировали визуально в световой микроскоп. Рассчитывали CC₅₀ по формуле Кербера [Karber, 1931]. Методики были опубликованы для разных линий клеток отдельно [Kozlovskaya et al., 2018; 2021; Osolodkin et al., 2013; Ryazantsev et al., 2021].

2.3.2. Анализ токсического действия соединений по снижению доли жизнеспособных клеток по окраске резазурином для линий клеток СПЭВ, Vero и RD

Готовили восемь двукратных разведений растворов соединений (5 мМ в ДМСО) и ДМСО (Sigma, USA) в качестве отрицательного контроля в

культуральной среде, соответствующей выбранной культуре клеток: 199 на Эрле для СПЭВ, ДМЕМ для Vero, 2×ЕМЕМ для RD (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия). Разведения соединений добавляли к монослоям клеток Vero или СПЭВ в 2 повторях, или суспензию клеток RD добавляли к разведениям соединений. Конечная серия концентраций из восьми разведений начиналась с 1:50. После инкубации при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 3-7 дней (в зависимости от линии клеток) культуральную среду заменяли раствором резазурина (Sigma, USA, 0,15 мг/мл). Клетки инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 4 часов. Затем добавляли 20 мкл 10% SDS для остановки реакции. Флуоресценцию измеряли с помощью Fluoroskan (ThermoFisher Scientific, США) при λ_{ex} = 544 нм и λ_{em} = 590 нм. Статистический анализ проводили и кривые флуоресценции строили с помощью Microsoft Excel 2013 и рассчитывали CC₅₀. Методика для клеток Vero опубликована [Rubekina et al., 2022].

2.4. Методы оценки противовирусной активности соединений в культуре клеток

2.4.1. Оценка противовирусной активности соединений по ингибированию ЦПД (SARS-CoV-2, ЧИКВ)

Восемь двукратных разведений растворов соединений (5 mM или 100 мкМ в ДМСО) готовили в среде ДМЕМ (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия). Разведённые растворы соединений, начиная с концентрации 1:25, смешивали с равными объёмами вирусной суспензии, содержащей 200-400 50% цитотоксических доз (ТЦД₅₀). После 1 ч инкубации при 37°C смеси вируса и соединения, ее добавляли к монослоям клеток Vero в 2 повторях. Контрольные клетки обрабатывали теми же последовательными концентрациями ДМСО, что и в разведениях соединений (отрицательный контроль), или N-гидроксицитидином (ННС) (положительный контроль). После 5-дневной инкубации при 37°C визуально в световой микроскоп оценивали признаки

ЦПД. Значения EC_{50} рассчитывали по методу Кербера [Karber, 1931]. Каждый эксперимент включал титрование дозы вируса для обеспечения приемлемого диапазона доз. Эксперимент повторяли не менее 2 раз для каждого соединения и рассчитывали среднее значение EC_{50} и стандартное отклонение [Kozlovskaya et al., 2021b].

2.4.2. Оценка противовирусной активности соединений по ингибированию ЦПД (ВИЧ-1)

Восемь двукратных разведений растворов соединений (5мМ в ДМСО) в RPMI-1640 (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия) готовили в двух повторах. Разведённые растворы соединений смешивали с равными объемами вирусной суспензии, содержащей 200-400 ТЦД₅₀. Контрольные клетки обрабатывали теми же последовательными концентрациями ДМСО, что и в растворах соединений (отрицательный контроль), или AZT (положительный контроль). Затем к экспериментальным смесям добавляли суспензию клеток МТ-4 (примерно 1×10^5 клеток на лунку) в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS (Invitrogen, Южная Америка). Конечная серия концентраций соединений начиналась с 50 мкМ. Каждый эксперимент включал титрование дозы вируса в инокуляте для обеспечения приемлемого диапазона доз. После 10-дневной инкубации (5% CO₂, 37°C) визуально оценивали ЦПД под микроскопом. Значения EC_{50} рассчитывали по методу Кербера [Karber, 1931]. Все экспериментальные процедуры проводили в двух повторах и повторяли не менее двух раз [Ryazantsev et al., 2021].

2.4.3. Оценка противовирусной активности соединений по ингибированию ЦПД (энтеровирусы)

Восемь двукратных разведений 5 мМ исходных растворов соединений в 2×ЕМЕМ (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия) готовили в двух повторах для получения конечной серии концентраций, начиная со 100 мкМ. Разведённые растворы соединений смешивали

с равными объемами суспензии энтеровируса, содержащей 100-400 ТЦД₅₀. Контрольные клетки обрабатывали теми же последовательными концентрациями ДМСО, что и в разведённых растворах соединений (отрицательный контроль), или N-гидроксицитидином (NHC) (положительный контроль). После 1 ч инкубации при 36,5°C смеси соединения и вируса, к ней добавляли суспензию клеток RD (примерно 1×10^5 клеток на лунку) в 2×EMEM, содержащей 5% FBS (Invitrogen, Южная Америка). Каждый эксперимент включал титрование дозы вируса в инокуляте для обеспечения приемлемого диапазона доз. После 5-дневной инкубации при 37°C признаки ЦПД визуально оценивали под микроскопом. Значения EC₅₀ рассчитывали по методу Кербера [Karber, 1931; Kozlovskaya et al., 2018].

2.4.4. Оценка противовирусной активности соединений по ингибированию ЦПД, определяемого по выживаемости клеток в резазуриновом тесте (энтеровирусы)

Эксперимент проводили аналогично методике, описанной в разделе 2.4.3. После 5-дневной инкубации при 37 °C культуральную среду заменяли раствором резазурина (Sigma, США, 0,15 мг/мл). Клетки инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 4 часов. Затем добавляли 20 мкл 10% SDS для остановки реакции. Флуоресценцию измеряли с помощью Fluoroskan (ThermoFisher Scientific, США) при λ_{ex} = 544 нм и λ_{em} = 590 нм. Кривые флуоресценции строили и рассчитывали 50% эффективную концентрацию (EC₅₀) с помощью Microsoft Excel 2013.

2.4.5. Оценка противовирусной активности соединений по ингибированию бляшкообразования (SARS-CoV-2, ЧИКВ)

Двукратные разведения исследуемых соединений и ДМСО в качестве контроля готовили в среде для культивирования клеток ДМЕМ (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия) и добавляли к вирусу (30-100 БОЕ/лунку) в серии конечных концентраций, начиная

с 1:50 (4 или 50 мкМ), и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Затем к монослоям клеток Vero добавляли смеси соединения и вируса и инкубировали при 37°C в течение 1 ч для адсорбции инфекционного вируса. Затем на каждую лунку наносили 1 мл 1,26% метилцеллюлозы (Sigma, США), содержащей 2% FBS (Invitrogen, Южная Америка). После инкубации при 37°C в течение 3-4 (ЧИКВ) или 5 (SARS-CoV-2) дней клетки фиксировали 96%-ным этанолом. Бляшки окрашивали 0,4% кристаллическим фиолетовым и подсчитывали. ЕС₅₀ рассчитывали по методу Рида и Менча [Reed, Muench, 1938]. Эксперимент повторяли не менее двух раз.

2.4.6. Оценка противовирусной активности соединений по ингибированию бляшкообразования (ортофлавирусы)

Двукратные разведения исследуемых соединений с концентрацией от 50 мкМ готовили на среде 199 на растворе Эрла (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия). К разведению соединения добавляли равный объёмы вирусной суспензии, содержащей 40-100 БОЕ. Контрольный вирус добавляли к тем же последовательным концентрациям ДМСО (Sigma, США), что и в разведениях соединений. Смеси вирус-соединение инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 1 часа, а затем добавляли к 48-72 ч конфлюэнтным монослоям клеток СПЭВ на 24-луночных планшетах в двух повторях и инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 1 часа для адсорбции инфекционного вируса. Затем клетки покрывали 1,26% метилцеллюлозой и инкубировали в течение 4 дней, а бляшки фиксировали и окрашивали как описано в разделе 2.2.6. Значения ЕС₅₀ рассчитывали по методу Рида и Менча [Reed, Muench, 1938]. Для определения активности каждого соединения эксперимент проводили не менее двух раз [Orlov et al., 2016].

2.4.7. Оценка противовирусной активности соединений по ингибированию фокусообразования (ортофлавивирусы)

Двукратные разведения исследуемых соединений с концентрацией от 50 мкМ готовили на среде 199 на растворе Эрла (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), Россия). К разведению соединения добавляли равный объёмы вирусной суспензии, содержащей 40-100 БОЕ. Контрольный вирус добавляли к тем же последовательным концентрациям ДМСО (Sigma, США), что и в разведениях соединений. Смеси вирус-соединение инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 1 часа, а затем добавляли к 48-72 ч конфлюэнтным монослоям клеток СПЭВ на 24-луночных планшетах в двух повторах и инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 1 часа для адсорбции инфекционного вируса. Затем клетки покрывали 1,26% метилцеллюлозой и инкубировали в течение 3 дней, а клетки фиксировали и окрашивали, как описано в разделе 2.2.7. Значения EC₅₀ рассчитывали по методу Риды и Менча [Reed, Muench, 1938]. Для определения активности каждого соединения эксперимент проводили не менее двух раз [Sedenkova et al., 2015].

2.4.8. Оценка противовирусной активности соединений по снижению урожая вируса (ортофлавивирусы, энтеровирусы, SARS-CoV-2)

Клетки инфицировали исследуемым вирусом (MOI 0,0001-0,1 БОЕ/клетку) и обрабатывали добавлением соединения или раствора ДМСО (отрицательный контроль) по одной из схем:

- 1) Клетки инкубировали с раствором соединения/ДМСО, промывали и затем инфицировали вирусом;
- 2) Вирус инкубировали с раствором соединения/ДМСО до заражения клеток;
- 3) К клеткам добавляли раствор соединения/ДМСО через различные временные отрезки после инфицирования (п.и.);

Во всех схемах вирус оставляли в клетках на 1-2 ч для сорбции и проникновения, а затем монослой клеток отмывали от несорбированного вируса. Каждая экспериментальная схема была выполнена в 2-3 повторах. Супернатанты

инфицированных клеток собирали через 1 репликативный цикл (7 ч для энтеровирусов, 16 ч для ВКЭ, 20 ч для SARS-CoV-2, определённые в отдельных экспериментах). Урожай вируса определяли методом титрования по бляшкам под метилцеллюлозным покрытием (раздел 2.2.6) или по ЦПД (разделы 2.2.3-4) и выражали в виде lg БОЕ или ТЦД₅₀. А также для SARS-CoV-2 в ОТ-ПЦР с помощью набора ПОЛИВИР SARS-CoV-2 (Литех, Россия) согласно инструкции производителя, с определением Ct (пороговый цикл флуоресценции). Ингибирование репродукции вируса оценивали, как разницу между контрольными клетками, обработанными ДМСО, и клетками, обработанными соединением, для каждой схемы.

Детали схем представлены в соответствующих разделах главы 3.

2.4.9. Оценка вирулицидной активности соединений против высоких доз вируса (SARS-CoV-2)

Исследуемые препараты добавляли к вирусосодержащей суспензии (10^3 ТЦД₅₀) для достижения серии из четырёх 10-кратных разведений препаратов, начиная с 1:10. Полученные разведения инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После чего полученные смеси титровали по ЦПД в культуре клеток Vero. В каждом эксперименте параллельно ставили среду как отрицательный контроль. Противовирусный эффект определялся по снижению титра вируса в пробах с препаратами по сравнению с пробами отрицательного контроля.

Расчёт EC₅₀ проводили методом аппроксимации нелинейной функцией в OriginLab Corp. OriginPro 8 [Shatalov et al., 2021].

2.5. Другие методы

2.5.1. ИФА для количественного определения белка Е ВКЭ

Содержание белка Е в образцах вируса определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческого набора

VectorTBE-антиген (D1154, Вектор-Бест, Россия) согласно инструкции производителя.

Для оценки количества белка Е в образце вируса строили стандартную кривую для очищенного стандартного антигена, приготовленного из штамма Софьин ВКЭ [Тучинская и др., 2018; Ляпустин, Ворович, 2010]. Для этого готовили двукратные разведения бычьего сывороточного альбумина (БСА, Комбитек) с диапазоном масс от 1 до 0,01 мг смешивали с 3×буфером для образцов (SDS-меркаптоэтанол) и разделяли в 12% SDS-ПААГ в ячейке MiniPROTEAN (Bio-Rad, США). Гель фиксировали в водном растворе, содержащем 10% уксусной кислоты и 50% этанола, окрашивали Кумасси синим и сканировали. Оптическую плотность белковых полос оценивали в программе OneDscan (DSP Inc., США). Калибровочную кривую оптической плотности полос от концентрации белка строили на основе разведений БСА и использовали для определения количества общего содержания белка Е в стандартном образце. Процедуру повторяли 3 раза.

Для получения стандартной калибровочной кривой концентрации белка Е готовили двукратные разведения стандартного антигена и измеряли в ИФА VectorTBE-Антиген («Вектор-Бест», Россия) согласно инструкции производителя, после чего строили кривую ОП от концентрации белка Е в разведении.

2.5.2. Количественная ОТ-ПЦР для ВКЭ

Процедура ОТ-ПЦР была описана ранее [Романова и др., 2006; Romanova et al., 2007]. Штамм Sabin1 полиовируса типа 1 использовали в качестве внутреннего контроля и добавляли к образцам перед выделением РНК. Обратную транскрипцию проводили обратной транскриптазой М-MLV (Promega, США) по протоколу производителя с праймерами Row-TBE-3': 5'-AGCGGGTGT TTTTCCGAGTC-3' для ВКЭ и PVR1: 5'-CGAACGTGATCCTGAGTGTT-3' для полиовируса. Полимеразную цепную реакцию проводили с праймерами для ВКЭ R-TBE: 5'-ACACATCACCTCCTTGTCAGACT-3', F-TBE: 5'-GGGCGGTTCTTGTTCTCC-3' и зондом TBE: 5'-(FAM)-TGAGCCACCATCACCCAGACACA-(BHQ1) -3' для 3'-

конца генома ВКЭ и с использованием стандартов с известной концентрацией РНК ВКЭ. Количественную ПЦР в реальном времени проводили на анализаторе DNA Engine (BioRad) с использованием набора для ОТ-ПЦР (Синтол, Россия). Для внутреннего контроля ОТ-ПЦР использовали PVR1, PVL1: 5'-GGCAGACGAGAAATACCCAT-3' и зонд PVP: 5'-(R6G)-TTGATTTCATGAATTTTCSTTCATTGGCA-(BHQ1)-3'.

Стандартную кривую рассчитывали на основе стандартов, приготовленных следующим образом: ВКЭ-специфический ПЦР-продукт, содержащий промотор РНК-полимеразы SP6, амплифицировали, затем очищали в геле и использовали в качестве матрицы во время реакции транскрипции *in vitro*. Полученную смесь обрабатывали ДНКазой для разрушения матричной ДНК. Транскрипты РНК очищали центрифугированием в градиенте сахарозы. Измеряли концентрацию РНК, рассчитывали молярность и использовали 10-кратные разведения в качестве стандартов для количественной ОТ-ПЦР [Romanova et al., 2007].

2.5.3. Концентрирование вирионов ВКЭ методом ультрацентрифугирования

Супернатант заражённых клеток СПЭВ очищали от дебриса центрифугированием в роторе Beckman Coulter (Германия) Optima L-90K SW-28 в течение 30 мин при 10000 об/мин. Затем вирус осаждали ультрацентрифугированием в течение 3 ч при 25000 об/мин. Осадок ресуспендировали в среде 199 на Эрле (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия). Все этапы процедуры концентрирования проводили при 4°C [Tuchynskaya et al., 2021].

2.5.4. Трансмиссионная электронная микроскопия

Концентрированные образцы вируса адсорбировали на пленку Formvar на никелевых ЭМ сетках 200, и контрастировали 2% уранилацетата. Сетки подвергали воздействию ультрафиолетового света в течение 1 ч для инактивации вирусов, сушили на воздухе и исследовали с помощью просвечивающего электронного

микроскопа JEOL JEM-1400 (JEOL, Япония) при напряжении 80 кВ. Изображения были получены цифровой камерой Olympus Quemesa с использованием программного обеспечения iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Германия) [Nikitin et al., 2015].

Исследования структуры инактивированных вирионов SARS-CoV-2 проводились в МГУ им. М.В. Ломоносова [Bagrov et al., 2022].

2.5.5. Высокопроизводительное секвенирование и анализ данных

100 мкл суспензии инфицированных клеток использовали для выделения тотальной РНК с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия). Затем РНК фрагментировали с использованием модуля фрагментации РНК (NEB, США) и использовали для подготовки библиотеки с помощью набора для подготовки библиотеки РНК NEBNext UltraII для Illumina (NEB, США). Секвенирование проводили на HiSeq1500 (Illumina, США), в результате чего было получено более 10 миллионов считываний по 250 нуклеотидов. Прочтения Illumina были обрезаны и картированы на референсную последовательность (GenBank ID NC_045512.2) с помощью Bowtie2 [Langmead and Salzberg, 2012], SNV отбирали с использованием SAMTools [Li et al., 2009]. Секвенирование выполнено ООО «Геноаналитика» (<https://genoanalytica.ru/>) [Kozlovskaya et al., 2020].

2.6. Статистическая обработка

Результаты определения значений определяемых величин из нескольких экспериментов представляли, как среднее (M) и стандартное отклонение (SD) или ошибку среднего (SEM). Сравнение значений противовирусной активности для разных соединений или в разных экспериментальных системах проводили с использованием двухвыборочного критерия Стьюдента.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Методика определения токсичности соединений для клеток по визуальным показателям – морфология и выживаемость клеток

Наиболее очевидным проявлением токсичности соединения является гибель клеток при инкубации с соединением определённое время после однократного добавления. При этом самый простой способ детекции гибели клеток, не требующий дополнительных реактивов и оборудования, – это визуальная детекция изменений морфологии, открепления погибших клеток адгезивных линий от подложки с нарушением целостности монослоя, т.е. детекция ЦПД, методом световой микроскопии. Такой подход требует знания нормальной морфологии клеток используемой линии; не позволяет точно определить долю поражённых клеток, однако расчёт CC_{50} возможен с помощью формулы Кербера. С другой стороны, световая микроскопия позволяет не только определить целевой параметр (гибель клеток), но и отметить изменения в морфологии клеток: изменение формы, появление включений, образование синцитиев и т.п., не влияющие на жизнеспособность клеток, но являющиеся последствием действия соединения.

3.1.1. Отработка методики определения цитотоксичности соединений с визуальной оценкой гибели клеток методом световой микроскопии

При оценке противовирусной активности соединения токсичность является вторичным параметром, но её определение необходимо для оценки перспективности дальнейшего изучения соединения через расчёт индекса селективности (SI).

Для оценки цитотоксичности подбирали условия, аналогичные условиям постановки реакции оценки противовирусной активности: те же клеточные линии, те же сроки после посадки клеток (24 ч после посадки, 2-3 суток после посадки или

свежая суспензия растущих клеток), те же сроки инкубации после однократного внесения соединения.

Методику определения отрабатывали в культуре клеток СПЭВ на соединениях классов 1,4-дигидропиридинов и пиридотиадиазинов, которые затем тестировали против переносимых клещами ортофлавивирусов (ВКЭ, ПОВ и ВОГЛ, раздел 3.3.1) по ингибированию бляшкообразования.

Рассматривали острую (24 ч) и хроническую (7 дней) токсичность для описания свойств соединений в целом, но для расчёта SI использовали значение, полученное на 7-ой день, что соответствовало сроку фиксации бляшек ВКЭ (конечной точки эксперимента по определению противовирусной активности).

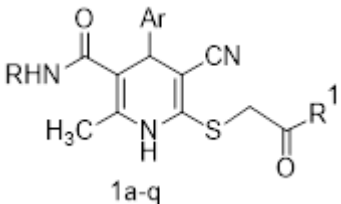
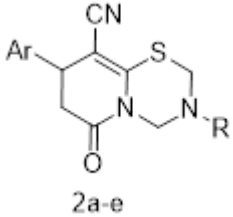
Максимальную концентрацию соединения выбирали с учётом максимально допустимой концентрации ДМСО 1-2% для клеток, и при использовании 5-15мМ растворов соединений в ДМСО она составляла 100-300 мкМ (1:50).

Для применимости формулы Кербера на каждое разведение соединения использовали 2 тест-объекта (лунки с клетками).

Таким образом, соединения титровали в культуральной среде (199 на растворе Эрла), начиная с 1:50, делали 8 разведений с шагом 2 (для увеличения точности определения CC_{50}), вносили к 2-3 дневному конфлюэнтному монослою клеток СПЭВ (2 лунки) и инкубировали в CO_2 -инкубаторе при 37°C. На 24 ч и на 7 дней плашки просматривали в микроскоп, отмечали гибель клеток, изменения морфологии и т.п. По гибели клеток рассчитывали CC_{50} по формуле Кербера (Таблица 2).

Большинство соединений 1,4-дигидропиридинов и пиридотиадиазинов не проявляли токсичности через 24 ч после добавления ($CC_{50} > 250$ мкМ), однако к 7 суткам токсический эффект накапливался, и появилась выраженная гибель клеток в монослое. Значения CC_{50} на 7-ой день для большинства соединений составили 20-50 мкМ. Что, однако, позволило в дальнейшем проводить оценку активности, в которой раститровка соединений начиналась с 10 мкМ [Kozlovskaya et al., 2013].

Таблица 2 – Острая и хроническая токсичность 1,4-дигидропиридинов (1a-q) и пиридоадиазинов (2a-e) для клеток СПЭВ (визуально, в микроскоп)

 1a-q  2a-e					
Соед.	Ar	R	R ¹	CC ₅₀ , мкМ	
				24 ч	7 д
1a	2-furyl	4-EtOC ₆ H ₄	4-nBuC ₆ H ₄ NH	64	14
1b	2-furyl	4-H ₂ NSO ₂ C ₆ H ₄	4-EtC ₆ H ₄ NH	> 250	153
1e	2-furyl	2-MeC ₆ H ₄	2-naphthyl-NH	> 250	> 250
1f	2-furyl	Ph	3,4-Me ₂ C ₆ H ₃	> 250	19
1g	2-furyl	2,6-Me ₂ C ₆ H ₃	2-benzothiazolyl-NH	> 250	7
1h	2-furyl	2-benzothiazolyl	2-benzothiazolyl-NH	> 250	52
1i	2-furyl	2-benzothiazolyl	4-iPrC ₆ H ₄ NH	> 250	29
1j	5-Me-2-furyl	2-MeOC ₆ H ₄	4-BrC ₆ H ₄ NH	248	34
1l	2-thienyl	2-MeOC ₆ H ₄	4-MeC ₆ H ₄ NH	> 250	97
1m	Ph	4-ClC ₆ H ₄	3-MeC ₆ H ₄ NH	> 250	41
1n	Ph	4-ClC ₆ H ₄	4-PhOC ₆ H ₄ NH	> 250	38
1p	2-FC ₆ H ₄	2-MeC ₆ H ₄	4-MeOC ₆ H ₄ NH	> 250	89
1q	4-OH-3-MeOC ₆ H ₃	Ph	4-EtC ₆ H ₄ NH	114	31
2a	4-(4-ClC ₆ H ₄ CH ₂ O)C ₆ H ₄	2,4-(MeO) ₂ C ₆ H ₃	—	109	39
2b	3-BnOC ₆ H ₄	2-EtOC ₆ H ₄	—	> 250	116
2d	4-BnOC ₆ H ₄	4-nBuC ₆ H ₄	—	> 250	35
2e	4-BnO-3-MeOC ₆ H ₃	4-MeOC ₆ H ₄	—	> 250	53

Таким образом, была разработана методика оценки цитотоксичности соединений с получением CC₅₀ с оценкой по наличию признаков ЦПД методом световой микроскопии.

3.1.2. Применение методики определения цитотоксичности соединений с визуальной оценкой методом световой микроскопии

Данная методика с некоторыми изменениями была использована для оценки цитотоксичности соединений, которые описаны ниже в главе 3, в различных культурах клеток со сроками детекции, соответствующими методикам оценки активности.

3.2. Методика определения цитотоксичности соединений по снижению доли жизнеспособных клеток в резазуриновом тесте

Визуальный учёт и расчёт CC_{50} по формуле Кербера накладывают определённые рамки на проведение эксперимента: необходимо не менее 2-х лунок с клетками в эксперименте и не менее 2-х повторов эксперимента для набора статистики. Определение количества жизнеспособных клеток по уровню их метаболизма позволяет сократить повторы внутри одного эксперимента (репликаты) до 1 лунки и точнее рассчитывать CC_{50} для каждого отдельного эксперимента. Что, в случае биологического эксперимента, не всегда важно ввиду часто больших разбросов между экспериментами. Главной проблемой визуального учёта, несомненно, является сложность формализации и необходимость наличия опыта у оператора при фиксации результатов эксперимента. Поэтому современные методы учёта гибели клеток по снижению жизнеспособности имеют свои преимущества.

Для наших исследований мы выбрали резазуриновый тест для оценки жизнеспособности клеток. Резазурин – это окислительно-восстановительный краситель, который в метаболически живых клетках восстанавливается до резорурфина и дигидрорезорурфина (Рисунок 24).

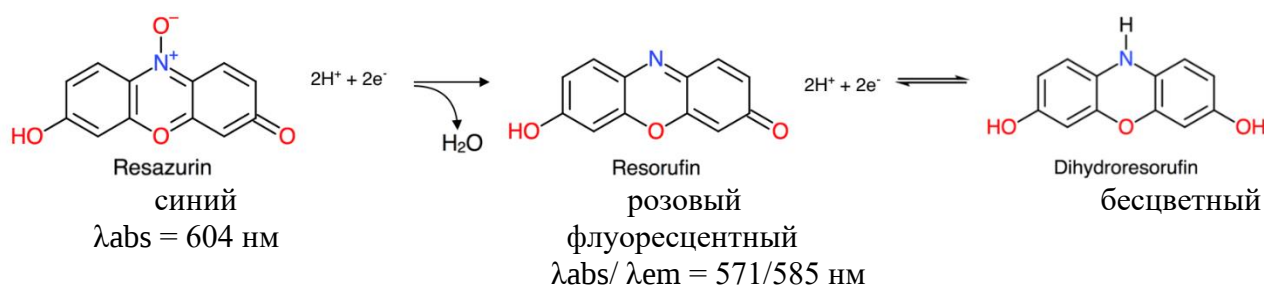


Рисунок 24 – Метаболизм и свойства резазурина и его производных

Этот переход внутриклеточный [O'Brien et al., 2000], осуществляется в присутствии митохондриальных, микросомальных и цитоплазматических оксидоредуктаз [Gonzalez et al., 2001]. Получаемый в процессе реакции резорурфин можно детектировать колориметрически и флуориметрически. Резазурин

нетоксичен для клеток и стабилен в культуральной среде, что позволяет использовать его для прижизненных длительных измерений кинетики или в конечной точке [Zhang et al., 2004]. При этом, количество резорубина пропорционально активности клеток и их количеству [Anoopkumar-Dukie et al., 2005; Rezende et al., 2019].

У резазуринового теста есть ряд преимуществ по отношению к другим красителям: резазурин и резорубин хорошо растворимы в культуральной среде, сам краситель сравнительно дешёвый и доступный, измерение флуоресценции обычно чувствительнее, чем измерение оптической плотности в культуральной среде. Однако использование красителей, в том числе флуоресцентных, накладывает дополнительные рамки, например:

- проверка на совпадение спектров поглощения и испускания и дополнительные контроли для флуоресцентных соединений;
- слежение за растворимостью соединений, так как осадок может давать шум при учёте флуоресцентного сигнала.

3.2.1. Отработка методики определения доли жизнеспособных клеток в резазуриновом тесте

За основу для методики был взята стандартная методика [Rezende et al., 2019]: первые стадии теста были как описано в разделе 3.1.1; по достижении окончания инкубации с соединениями, культуральная среда заменялась средой с раствором резазурина (0,15 мг/мл; 5×раствор готовили заранее в среде с 10% этанола и хранили замороженным). Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе, а затем флуоресценцию резорубина измеряли при $\lambda_{ex} = 544$ нм и $\lambda_{em} = 590$ нм.

Для отработки методики и выбора оптимального времени инкубации с клетками, мы рассадил клетки Vero и RD с разной исходной плотностью, инкубировали их порядка 24 ч в CO₂-инкубаторе в отсутствие и в присутствии 2% ДМСО, затем заменили культуральную среду средой с раствором. Клетки инкубировали от 30 мин до 4 ч в CO₂-инкубаторе и затем проводили измерение флуоресценции (Рисунок 25).

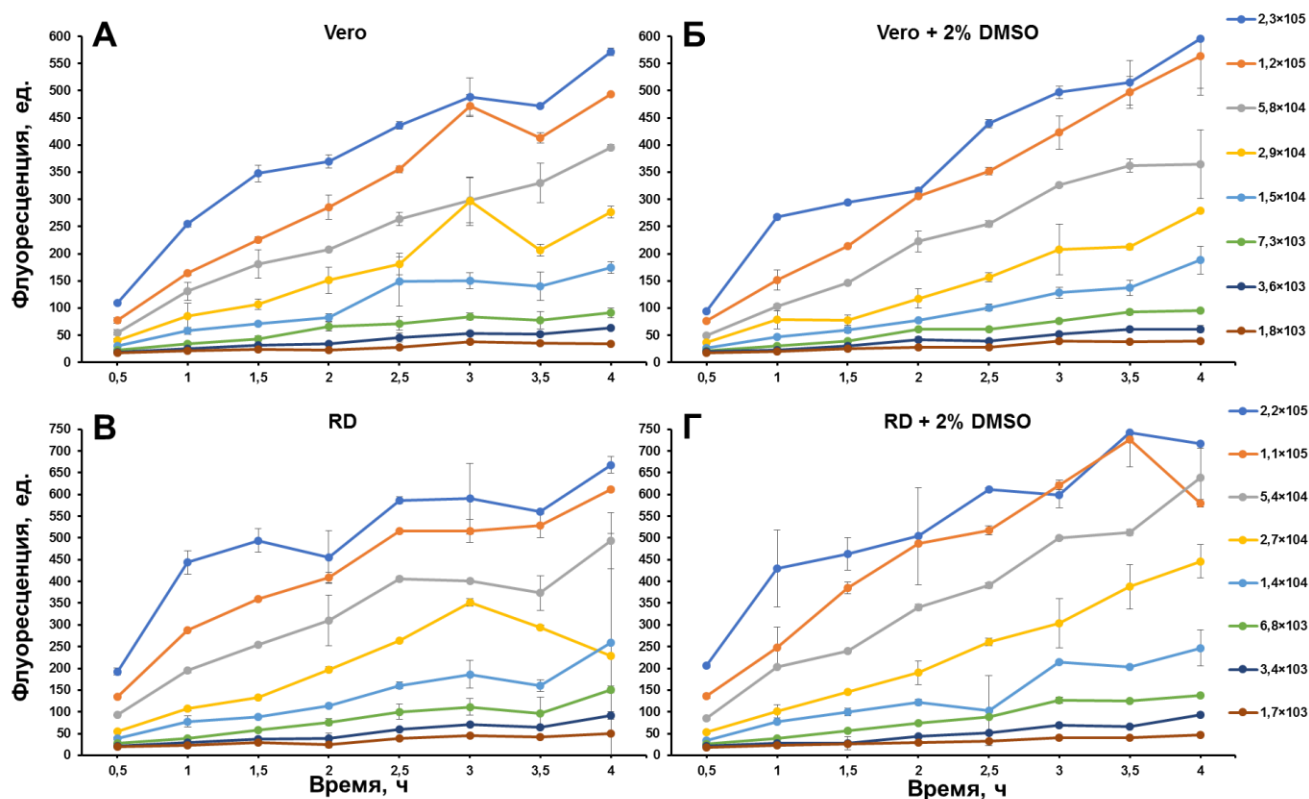


Рисунок 25 – Кривые зависимости активности флуоресценции от времени инкубации и количества клеток Vero и RD при окраске резазурином: (А) клетки Vero; (Б) клетки Vero с добавлением 2% ДМСО; (В) клетки RD; (Г) клетки RD с добавлением 2% ДМСО. Разные кривые соответствуют разному количеству клеток на лунку.

Флуоресценция клеток возрастает линейно с увеличением времени инкубации с резазурином. Однако, возрастание нелинейно пропорционально количеству клеток: возрастание больше, для большего количества клеток. Начиная с 30 мин инкубации есть видимые различия в уровне флуоресценции между разным количеством клеток для обеих линий. Различия увеличиваются с увеличением времени инкубации, и уже с 3 ч для RD и с 3,5 ч для Vero достоверно различны даже для малых концентраций клеток. Несмотря на почти одинаковое количество клеток, флуоресценция в клетках RD несколько выше, чем в клетках Vero на каждой временной точке, что может быть связано с опухолевым происхождением линии RD. Однако, даже при 4 ч не достигается порог максимально детектируемой флуоресценции. Таким образом, инкубации 3,5-4 ч достаточно для проведения эксперимента по оценке жизнеспособности клеток в резазуриновом тесте.

Не наблюдается значимых различий между клетками, обработанными и не обработанными ДМСО. Стоит отметить, что клетки, инкубированные в

присутствии 2% ДМСО, показывают даже несколько более высокие уровни флуоресценции. Следовательно, инкубация клеток с 2% ДМСО, который используется в качестве универсального растворителя низкомолекулярных органических соединений, не влияет на жизнеспособность клеток.

Таким образом, была разработана методика определения цитотоксичности соединений с оценкой гибели клеток по метаболизму резазурина с получением количественного значения CC_{50} .

3.2.2. Применение методики определения цитотоксичности по снижению доли жизнеспособных клеток в резазуриновом тесте

Цитотоксичность большинства соединений, описанных в главе 3, была определена по методике, описанной в разделе 3.2.1.

Также методика была использована самостоятельно для оценки острой и хронической токсичности серии новых Mango-специфичных красителей для клеток мышиных макрофагов RAW 264.7 (ATCC® TIB-71) (Рисунок 26).

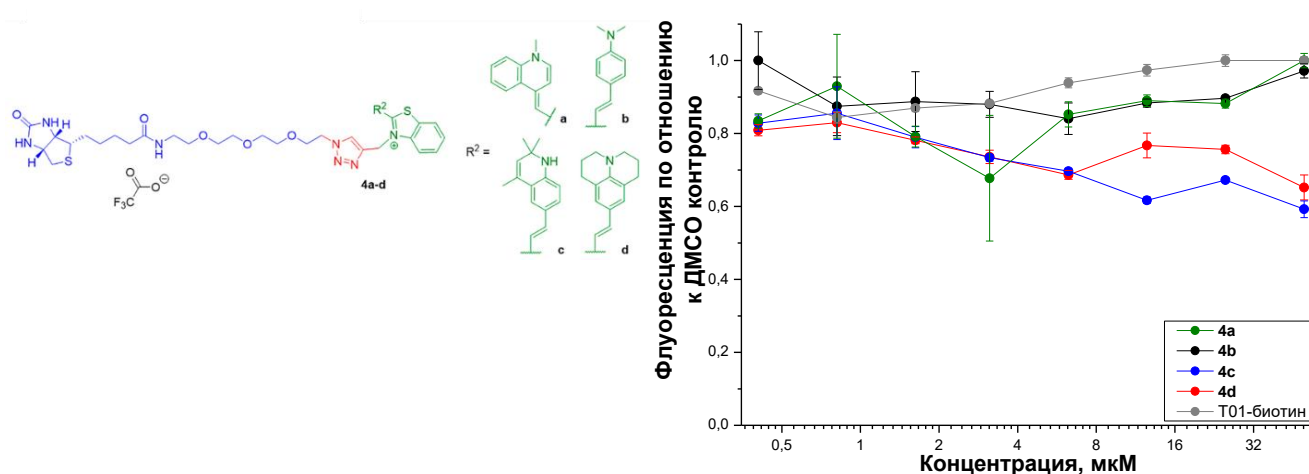


Рисунок 26 – Токсичность T01-биотина and красителей **4a-d** для клеток мышиных макрофагов RAW 264.7 после 7 дней инкубации

Никаких изменений в морфологии клеток и жизнеспособности не наблюдалось после 24-часовой инкубации с красителями. На 7-й день даже при концентрации 50 мкМ ни одно из соединений не привело к уровня клеточного метаболизма резазурина более чем на 50%, т.е. $CC_{50} > 50$ мкМ для всех

тестируемых соединений. Однако **4c** и **4d** в концентрации 25-50 мкМ вызывали микроскопические морфологические изменения в клетках [Bychenko et al., 2023].

3.3. Фенотипическая оценка противовирусной активности ингибиторов репродукции ортофлавивирусов

3.3.1. Отработка методики фенотипического скрининга на основе реакции подавления бляшкообразования ортофлавивирусов

Методика скрининга была разработана на основе реакции нейтрализации бляшек под агаровым покрытием. В качестве тестового выбирали штаммы, дающий чёткие, хорошо различимые бляшки за короткий срок (7 дней).

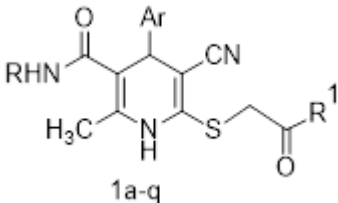
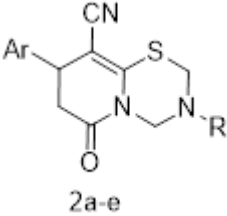
Ввиду того, что к началу исследований не было соединений с доказанной специфической активностью против переносимых клещами ортофлавивирусов, то в качестве контрольного соединения использовали гипериммунную сыворотку, как препарат, подавляющий репродукцию вируса на первых стадиях жизненного цикла до проникновения в клетку.

Для определения первой серии для фенотипического скрининга к.х.н. Осолодкиным Д.И. был проведён виртуальный скрининг 5886 гетероциклических соединений, синтезированных лабораторией ChemEx, на взаимодействие с аминокислотными остатками в кармане связывания β -октилгликозида (β -OG) эктодомена белка оболочки ортофлавивирусов E, который был обнаружен в одной из структур (PDB ID 1OKE [Modis et al., 2003]). Наличие молекулы в этом кармане предположительно блокирует конформационную перестройку молекулы, необходимую для осуществления процесса слияния мембран. В результате докинга соединений рассматриваемой библиотеки в модели структур димеров эктодоменов белков E ВКЭ, ПОВ и ВОГЛ были отобраны 100 соединений двух классов 1,4-дигидропиридинов и пиридотиадиазинов (Таблица 3) для скрининга *in vitro*.

Сначала была проведена оценка их острой (24 часа) и хронической (7 дней) токсичности для клеток СПЭВ по гибели клеток (раздел 3.1.1). Для большинства соединений значения CC_{50} значительно превышали 10 мкМ. Предварительную

оценку противовирусной активности соединений в концентрации 10 мкМ изучали в тесте 50% ингибирования бляшкообразования в клетках СПЭВ против ВКЭ (шт. Абсеттаров), ПОВ (шт. Пов24) или ВОГЛ (шт. Никитина). Двадцать два соединения проявили активность в концентрации 10 мкМ. Далее были проведены исследования для определения EC_{50} по той же методике с двукратными разведениями исследуемого соединения, начиная с 10 мкМ. Испытанные соединения дозозависимо ингибировали образование бляшек (Таблица 3).

Таблица 3 – Цитотоксичность и противовирусная активность 1,4-дигидропиридинов (**1a-q**) и пиридоthиадиазинов (**2a-e**) против переносимых клещами ортофлавивирусов (по подавлению бляшкообразования)

 1a-q  2a-e					$EC_{50} \pm SEM, \mu M$		
Соед.	Ar	R	R ¹	CC ₅₀ , мкМ	ВКЭ	ПОВ	ВОГЛ
1a	2-furyl	4-EtOC ₆ H ₄	4-nBuC ₆ H ₄ NH	14	2,5 ± 0,5	> 10	> 10
1b	2-furyl	4-H ₂ NSO ₂ C ₆ H ₄	4-EtC ₆ H ₄ NH	153	> 10	> 10	10 ± 7,8
1e	2-furyl	2-MeC ₆ H ₄	2-naphthyl-NH	> 250	> 10	> 10	5,3 ± 0,1
1f	2-furyl	Ph	3,4-Me ₂ C ₆ H ₃	19	> 10	> 10	3,2 ± 0,8
1g	2-furyl	2,6-Me ₂ C ₆ H ₃	2-benzothiazolyl-NH	7	> 10	> 10	7,1 ± 0,1
1h	2-furyl	2-benzothiazolyl	2-benzothiazolyl-NH	52	> 10	> 10	2,5 ± 0,9
1i	2-furyl	2-benzothiazolyl	4-iPrC ₆ H ₄ NH	29	> 10	> 10	2,5 ± 0,1
1j	5-Me-2-furyl	2-MeOC ₆ H ₄	4-BrC ₆ H ₄ NH	34	> 10	> 10	3,7 ± 0,4
1l	2-thienyl	2-MeOC ₆ H ₄	4-MeC ₆ H ₄ NH	97	> 10	> 10	5,5 ± 0,9
1m	Ph	4-ClC ₆ H ₄	3-MeC ₆ H ₄ NH	41	2,0 ± 0,4	> 10	> 10
1n	Ph	4-ClC ₆ H ₄	4-PhOC ₆ H ₄ NH	38	2,8 ± 0,6	> 10	> 10
1p	2-FC ₆ H ₄	2-MeC ₆ H ₄	4-MeOC ₆ H ₄ NH	89	> 10	> 10	7,2 ± 0,5
1q	4-OH-3-MeOC ₆ H ₃	Ph	4-EtC ₆ H ₄ NH	31	> 10	> 10	1,8 ± 0,4
2a	4-(4-ClC ₆ H ₄ CH ₂ O)C ₆ H ₄	2,4-(MeO) ₂ C ₆ H ₃	—	39	0,07 ± 0,02	1,3 ± 0,1	> 10
2b	3-BnOC ₆ H ₄	2-EtOC ₆ H ₄	—	116	2,6 ± 0,4	2,2 ± 0,3	> 10
2d	4-BnOC ₆ H ₄	4-nBuC ₆ H ₄	—	35	1,9 ± 0,4	> 10	> 10
2e	4-BnO-3-MeOC ₆ H ₃	4-MeOC ₆ H ₄	—	53	0,09±0,01	> 10	> 10

Графы окрашены пропорционально значению EC_{50} для соединений:

0,0N – высокоактивно

0,N – активно

1-10 – низкоактивно

>10 – неактивно

Соединения из 1,4-дигидропиридинового ряда проявили противовирусную активность в отношении ВОГЛ или ВКЭ, пиридотиадиазины – в отношении ВКЭ и ПОВ; и они, как правило, были более эффективны [Osolodkin et al., 2013].

Более того, соединение **1q**, наиболее активное в отношении ВОГЛ, было единственным в ряду 1,4-дигидропиридинов, содержащим гидроксильную и метоксигруппу в заместителе Ar. Более того, присутствие акцепторов водородных связей в соединениях коррелировало с их противовирусной активностью, что может быть важно для образования связей с ароматическими и/или несущими гидроксилы аминокислотными остатками в кармане связывания белка E [Osolodkin et al., 2013].

Таким образом, разработанный метод оценки противовирусной активности по ингибированию бляшкообразования под агаровым покрытием в культуре клеток СПЭВ позволил получить достаточно различающиеся значения EC_{50} , чтобы провести анализ соотношений структура-активность (SAR).

Однако методика постановки бляшек по агаровым покрытием – это трудоёмкий процесс, требующий достаточного большого количества соединения для проведения одного эксперимента и постановки реакции в сравнительно большом объёме, ввиду необходимости учёта довольно крупных бляшек, что ограничивает количество соединений, тестируемых одновременно в одном опыте: 150 в режиме скрининга и 50 с раститровкой для расчёта EC_{50} . Поэтому реакция бляшкообразования под агаровым покрытием был заменена на реакцию бляшкообразования под метилцеллюлозным покрытием, что уменьшает объём реакции в 4 раза и сложность её проведения, и увеличивает производительность скрининга, т.е. количество соединений, которые можно скринировать в одном эксперименте также не менее чем в 4 раза.

Отработанная методика фенотипической оценки противовирусной активности была использована для скрининга соединений различных химических классов против переносимых клещами ортофлавивирусов (ВКЭ, ПОВ, ВОГЛ). Эти соединения можно разделить на отдельные группы: жёсткие амфипатические ингибиторы слияния (RAFI) на основе урацила с флуоресцентным периленовым

заместителем; производные нуклеозидов; гетероциклические соединения; органические соединения с селеном и серой; сложные смеси гуминовых веществ. Результаты представлены далее в разделе 3.3.3.

3.3.2. Сравнение методик фенотипического скрининга против ортофлавириусов – подавление появления бляшек и фокусов

Реакция бляшкообразования сравнительно удобна при постановке, однако требует времени для репродукции вируса и образования признаков ЦПД с формированием визуально заметной бляшки. В реакции фокусообразования детектируются иммунохимически окрашенные области заражённых клеток, формирующиеся быстрее, и данная методика позволяет детектировать заражение клеток теми вирусами, которые не вызывают ЦПД в культуре клеток. Однако, бляшки вызываются инфекционным вирусом, в то время как антитела позволяют детектировать все вирусные частицы, что может изменять параметры реакции: обеспечивать большую чувствительность, детектировать большее количество вируса и т.п., что, в свою очередь, может влиять на рассчитываемое значение EC_{50} .

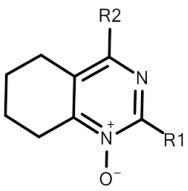
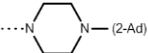
Для сравнения EC_{50} , полученных по ингибированию бляшек и фокусов, была проведена оценка противовирусной активности одних и тех же соединений в двух тест-системах против ВКЭ. Эксперименты были поставлены к.х.н. Дугевоу Е.В. под руководством и непосредственным участии автора данной работы.

Активность серии 4-аминотетрагидрохиназолинов определяли по их способности ингибировать образование бляшек [Dueva et al., 2020] или фокусов [Sedenkova et al., 2015] шт. Абсеттаров ВКЭ в культуре клеток СПЭВ (Таблица 4). Параметры постановки были одинаковыми, кроме способа выявления областей с ЦПД (бляшек) и клеток, заражённых вирусом (фокусы).

Все, кроме одного, исследованные соединения ингибировали репродукцию вируса в обеих тест-системах и имели сходный профиль активности: слабоактивные соединения ($EC_{50} > 10$ мкМ) **7a**, **7t** и **7ab** и высокоактивные ($EC_{50} < 10$ мкМ) **7o**, **7u**, **7w** и **7y**. Неактивное соединение **7c** не проявило активности также в обеих тест-системах в максимальной исследованной концентрации 50 мкМ.

Статистическое сравнение значений EC_{50} для исследованных соединений между тестами показало, что, несмотря на неполное совпадение численных значений, в рамках данных постановок и количества повторов эксперимента статистически достоверные различия между значениями EC_{50} на уровне значимости 0,05 выявлены для двух соединений **7a** и **7y**, однако EC_{50} имеют близкие значения и различаются не более, чем в 2 раза. Такой разницей можно пренебречь в рамках постановки фенотипического скрининга, поэтому результаты скрининга соединений, полученные по ингибированию бляшек и фокусов ВКЭ, статистически достоверно не различаются.

Таблица 4 – Противовирусная активность 4-аминотетрагидрохиназолинов против ВКЭ при оценке по подавлению образованию бляшек и фокусов в культуре клеток СПЭВ

Структура	Шифр	R1	R2	Оценка по БОЕ $CC_{50} \pm SEM$, мкМ	Оценка по ФОЕ $EC_{50} \pm SEM$, мкМ	p (тест Стьюдента)*
	7a	Me	NHBu	31 ± 4	12 ± 1	0,006*
	7c	<i>t</i> -Bu	NHCH ₂ Ph	>50	>50	—
	7o	Me	NH(2-OH-C ₆ H ₄)	8 ± 2	$5,60 \pm 0,1$	0,284
	7t	Et	NH(CH ₂) ₂ (1-Ad)	35 ± 1	$33,1 \pm 0,1$	0,117
	7u	<i>t</i> -Bu	NH(CH ₂) ₂ (1-Ad)	6 ± 1	$7,4 \pm 0,3$	0,238
	7w	<i>t</i> -Bu	NH(CH ₂) ₂ (2-Ad)	6 ± 2	$6,6 \pm 0,3$	0,779
	7y	<i>t</i> -Bu	NHCH(1-Ad)Ph	4 ± 1	11 ± 2	0,026**
	7ab	<i>t</i> -Bu		23 ± 4	$14,1 \pm 0,4$	0,078

* количество экспериментов 4

**различия статистически значимы

3.3.3. Применение методики фенотипического скрининга по подавлению бляшкообразования ортофлавивирусов

3.3.3.1. Жёсткие амфипатические ингибиторы слияния RAFI (rigid amphipatic fusion inhibitors)

Жесткие амфипатические ингибиторы слияния (RAFI) представляют собой класс аналогов нуклеозидов с объёмными ароматическими заместителями в основании [St Vincent et al., 2010; Colpitts et al., 2013]. Первоначально они были синтезированы как флуоресцентные аналоги нуклеозидов для мечения олигонуклеотидов [Коршун и др., 1996; Малахов и др., 2000; Манасова и др., 1998;

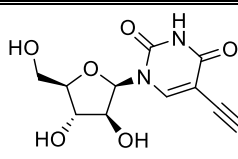
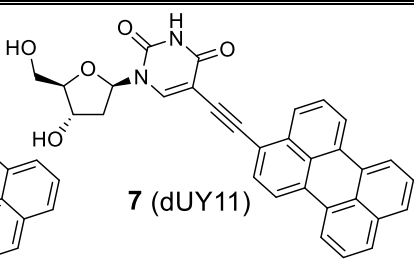
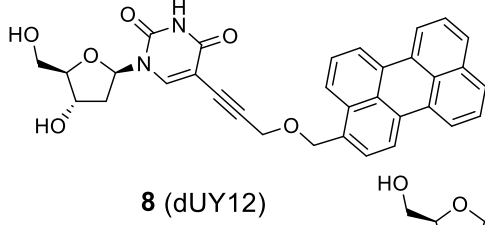
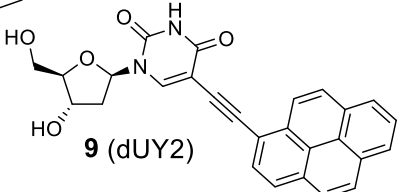
Korshun et al., 1997, 1998], а позже идентифицированы как ингибиторы репродукции ВПГ-1 [Андропова и др., 2003; Pchelintseva et al., 2005; Skorobogatyi et al., 2006a,b], однако дальнейшие исследования показали их активность против широкого спектра оболочечных вирусов, включая вирусы гриппа и ВГС [St Vincent et al., 2010; Colpitts et al., 2013]. Были предложены два механизма действия RAFI: один реализуется за счет их включения в мембраны вирионов или клеток с приданием мембране жёсткости и изменением её кривизны, что механически ингибирует процесс слияния [St Vincent et al., 2010; Colpitts et al., 2013; Schang, 2013]; другой предполагает фотосенсибилизацию заместителя, образование активных форм кислорода (АФК) и окисление липидов в мембранах, что приводит к их разрушению, особенно в составе вирионов, поскольку у метаболически активных клеток есть механизмы репарации липидов [Vigant et al., 2010, 2014].

Синтез соединений производился сотрудниками ИБХ РАН, оценка противовирусной активности – автором данной работы, а также к.х.н. Орловым А.А., Елецкой А.А. и Хватовым Е.В. с участием и под руководством автора данной работы.

Для первого исследования были выбраны четыре RAFI с периленом в качестве ароматического заместителя. Два из них, **6** и **7** (dUY11, 5-(перилени-3-илэтинил)-2'-дезоксипурацил), были протестированы против множественных оболочечных и безоболочечных вирусов и показали ингибирование репродукции оболочечных вирусов в диапазоне EC_{50} от 2 до 283 нМ и отсутствие ингибирования ЦПД безоболочечных вирусов в концентрациях 20–200 мкМ [St Vincent et al., 2010; Colpitts et al., 2013]. Еще два соединения, **8** и **9**, были протестированы только против ВПГ-1 и проявили высокую активность [St Vincent et al., 2010; Skorobogatyi et al., 2006b]. Все четыре выбранных периленовых RAFI активно ингибировали образование бляшек ВКЭ со значениями EC_{50} менее 1 мкМ, и даже на уровне десятков нМ. При этом не было выявлено признаков цитотоксичности в изученном диапазоне концентраций (Таблица 5). Эти результаты позволили проводить дальнейший скрининг противовирусной активности серий производных и аналогов

5-(перилени-3-илэтинил)-2'-дезоксиурацила и выявление механизма действия [Orlov et al., 2016].

Таблица 5 – Цитотоксичность и активность производных перилена на репродукцию ВКЭ (по подавлению бляшкообразования)

Структуры	Шифр	ВКЭ, EC ₅₀ ± SD, мкМ	СПЭВ, CC ₅₀ , мкМ
 6 (aUY11)	6 (aUY11)	0,018 ± 0,010	4,4
 7 (dUY11)	7 (dUY11)	0,024 ± 0,013	>50
 8 (dUY12)	8 (dUY12)	0,5 ± 0,4	>50
 9 (dUY2)	9 (dUY2)	0,98 ± 0,03	>50

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,000N – очень высокоактивно

0,00N – высокоактивно

0,0N – активно

0,N – низкоактивно

Исследование серии периленилтриазолов (однозамещённых 4-(перилени-2(3)-ил)-1,2,3-триазолов) выявило соединения с субмикромольными активностями (десятки нМ) и прямо показало, что нуклеозиды, лишённые периленов (**7a**, **7b**), неактивны против ВКЭ (Таблица 6). Таким образом, именно структура нуклеотида с периленовым заместителем – dUY11, 5-(перилени-3-илэтинил)-2-дезоксиурацил – отвечает за активность данных соединений, при этом активность не зависит от положения периленовой группы и активности флуоресценции [Aralov et al., 2017].

Таблица 6 – Цитотоксичность и активность производных перилентриазолов на репродукцию ВКЭ (по подавлению бляшкообразования)

Структуры	Шифр	ВКЭ, EC ₅₀ ± SD, мкМ	СПЭВ, CC ₅₀ , мкМ
4a,b: R² = Ph 5a,b: R² = perylen-2-yl 6a,b: R² = perylen-3-yl 7a,b: R² = Ph 8a,b: R² = perylen-2-yl 9a,b: R² = perylen-3-yl a: R¹ = H; b: R¹ = OH perylen-2-yl perylen-3-yl 10a: R = perylen-2-yl 10b: R = perylen-3-yl	7a	>50	>50
	7b	>50	>50
	8a	0,06 ± 0,03	>50
	8b	0,06 ± 0,03	>50
	9a	0,038 ± 0,012	>50
	9b	0,031 ± 0,013	>50
	10a	0,023 ± 0,012	>50
	10b	0,10 ± 0,05	>50

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,000N – очень высокоактивно

0,00N – высокоактивно

0,0N – активно

0,N – низкоактивно

Исследование серии 3'-О-замещённых триазолметильных производных dYU11 выявило соединения с наномолярной активностью, при этом некоторые из них вызывали слияние мембран клеток (формирование синцитий-подобных структур) на 7 сутки инкубирования без подавления жизнеспособности клеток, что косвенно указывает на взаимодействие данных соединений с мембранами (Таблица 7). Однако расчётный анализ липофильности соединений (включая исследованные ранее) не выявил явной корреляции между противовирусной активностью и липофильностью (Рисунок 27) [Proskurin et al., 2018].

Таблица 7 – Цитотоксичность и активность триазолметильных производных dUY11 на репродукцию ВКЭ (по подавлению бляшкообразования)

Шифр	ВКЭ, EC ₅₀ ± SD, мкМ	СПЭВ, СС ₅₀ , мкМ
4	0,0077 ± 0,0002	>50
6	0,0054 ± 0,0004	35
7a	0,030 ± 0,010	>50
7b	0,050 ± 0,030	>50
7c	0,037 ± 0,003	>50
7d	0,023 ± 0,004	>50
8a	0,0075 ± 0,0016	>50
8b	0,0096 ± 0,0001	>50

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,000N – очень высокоактивно

0,00N – высокоактивно

0,0N – активно

0,N – низкоактивно

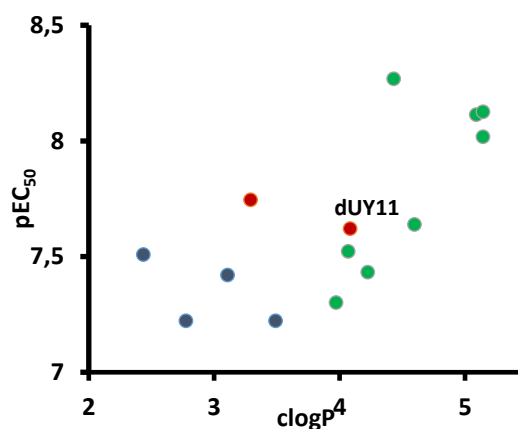
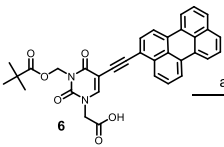
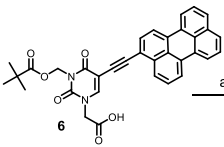
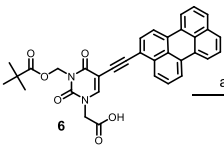
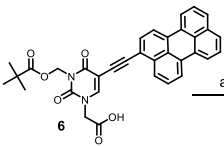
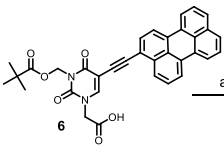
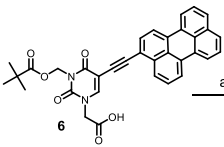
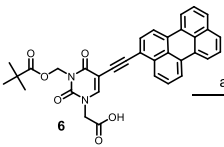
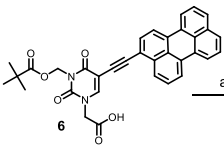
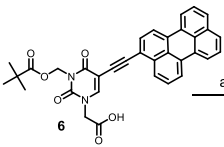
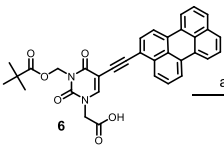
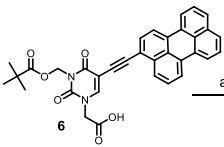
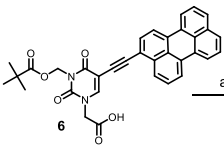


Рисунок 27 – Диаграмма зависимости показателя липофильности (ClogP) соединений от активности против ВКЭ (pEC₅₀) для периленовых RAFI

Далее была проведена оценка активности кластер-образующих производных dUY11 с целью оценки возможного комбинированного эффекта от объединения нескольких периленовых структур в одной молекуле. Соединения проявили низкую токсичность и высокую активность против ВКЭ *in vitro*, при этом соединение **7** имело EC₅₀ порядка 1 нМ. Однако, несмотря на то что кластер-образующие производные проявили наномолярную активность, их аналоги с одним периленом были всё равно активнее (Таблица 8) [Sapozhnikova et al., 2019].

Таблица 8 – Цитотоксичность и активность кластер-образующих производных dUY11 на репродукцию ВКЭ (по подавлению бляшкообразования)

Структуры	Шифр	ВКЭ, EC ₅₀ ± SD, мкМ	СПЭВ, CC ₅₀ , мкМ
	6	0,00121 ± 0,00025	>50
	7	0,00097 ± 0,00015	>50
	8	0,002 ± 0,001	<50
	9a	0,046 ± 0,017	>50
	9b	0,0010 ± 0,0003	>50
	9c	0,008 ± 0,001	18*
	9d	0,024 ± 0,007	<50*
	9e	0,015 ± 0,01	<50*
	9f	0,0033 ± 0,0011	>50
	10a	0,0081 ± 0,0017	>50*
	10b	0,066 ± 0,013	>50
	10c	0,10 ± 0,05	>50

* изменение морфологии клеток (формирование синцитий-подобных структур)

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,000N – очень высокоактивно

0,00N – высокоактивно

0,0N – активно

0,N – низкоактивно

Далее была проведена оценка активности амидов dUY11, замещённых по 1-му положению (вместо сахарного остатка) на углеводородные цепи различной длины и структуры и их Rom-защищённые аналоги. Все соединения серии были высокоактивны со значениями EC₅₀ менее 0,06 мкМ (Таблица 9). Таким образом, замещение пентозного кольца привело к 100-кратному увеличению активности. Однако, не было выявлено корреляции между активностью и физико-химическими

расчётными параметрами соединений, такими как растворимость (pSac), липофильность (ClogP), адсорбция в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) (сHIA) и проникновение через гематоэнцефалический барьер (сLog BB). Хотя стоит отметить, что наибольшую тенденцию к корреляции активности (pEC₅₀) выявлено с показателем липофильности (ClogP) (Рисунок 1) [Chistov et al., 2019].

Таблица 9 – Цитотоксичность и активность амидов dUY11 на репродукцию ВКЭ (по подавлению бляшкообразования)

Структуры	Шифр	ВКЭ, EC ₅₀ ± SD, мкМ	СПЭВ, CC ₅₀ , мкМ
a: R = Bu, R' = H; b-f: R = -(CH₂)_nOH (n = 2-6), R' = H; g: R = -CH₂CH(OH)CMe₂CH₂OH, R' = H; h: R = R' = -(CH₂)₂OH.	1	0,05 ± 0,01	>50*
	2a	0,014 ± 0,009	>50*
	2b	0,003 ± 0,001	>50*
	2c	0,006 ± 0,001	>50*
	2d	0,02 ± 0,01	>50*
	2e	0,077 ± 0,003	>50*
	2f	0,0061 ± 0,0024	>50*
	2g	0,019 ± 0,003	>50*
	2h	0,007 ± 0,003	>50*
	7	0,0012 ± 0,0003	>50*
	8a	0,054 ± 0,003	>50*
	8b	0,0021 ± 0,0004	>50*
	8c	0,00043 ± 0,00013	>50*
	8d	0,00069 ± 0,00012	>50*
	8e	0,0016 ± 0,0006	>50*
	8f	0,024 ± 0,003	>50*
	8g	0,00079 ± 0,000012	>50*
	8h	0,00044 ± 0,000012	>50*

* изменение морфологии клеток (формирование синцитий-подобных структур)

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,000N – очень высокоактивно

0,00N – высокоактивно

0,0N – активно

0,N – низкоактивно

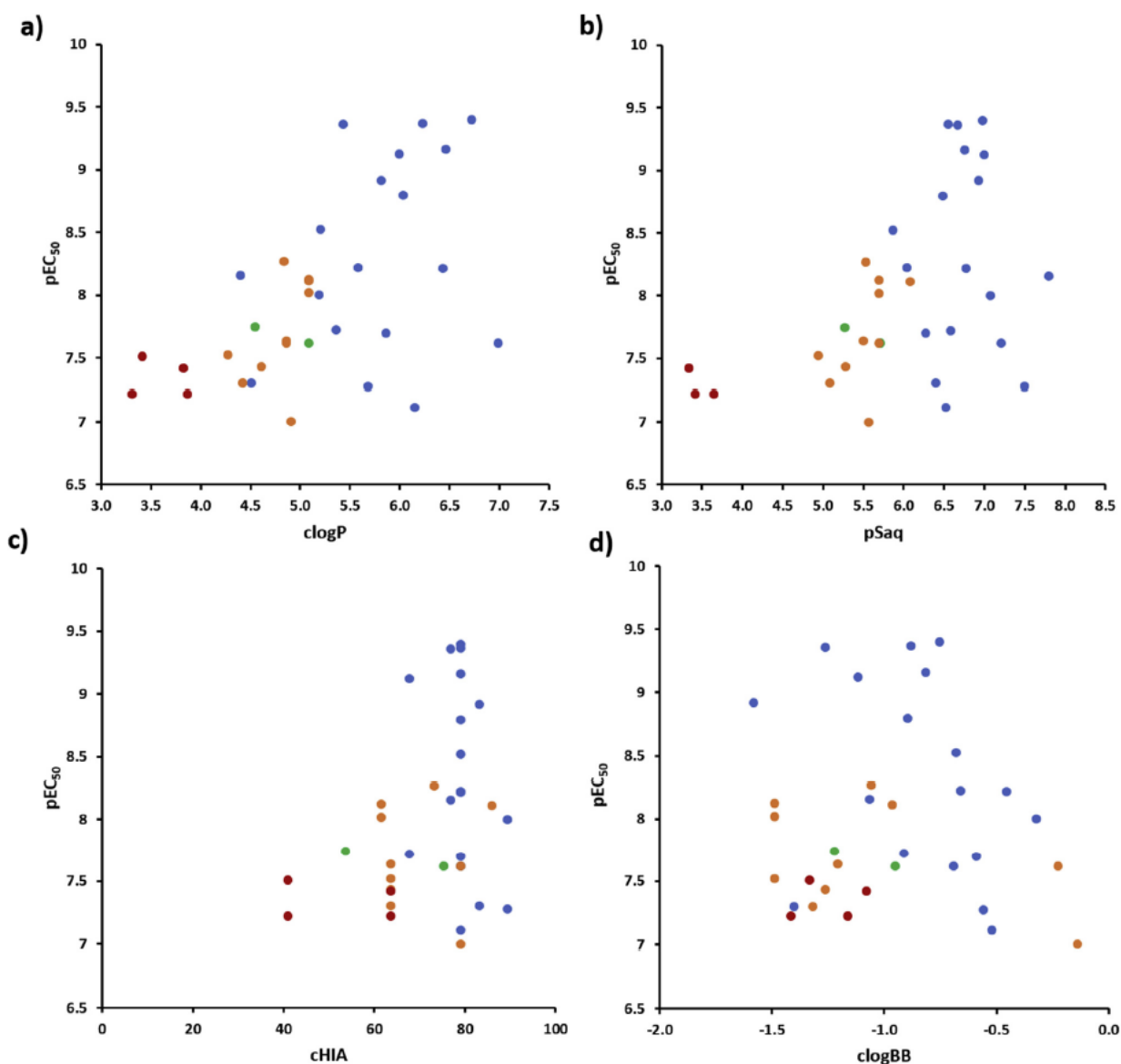
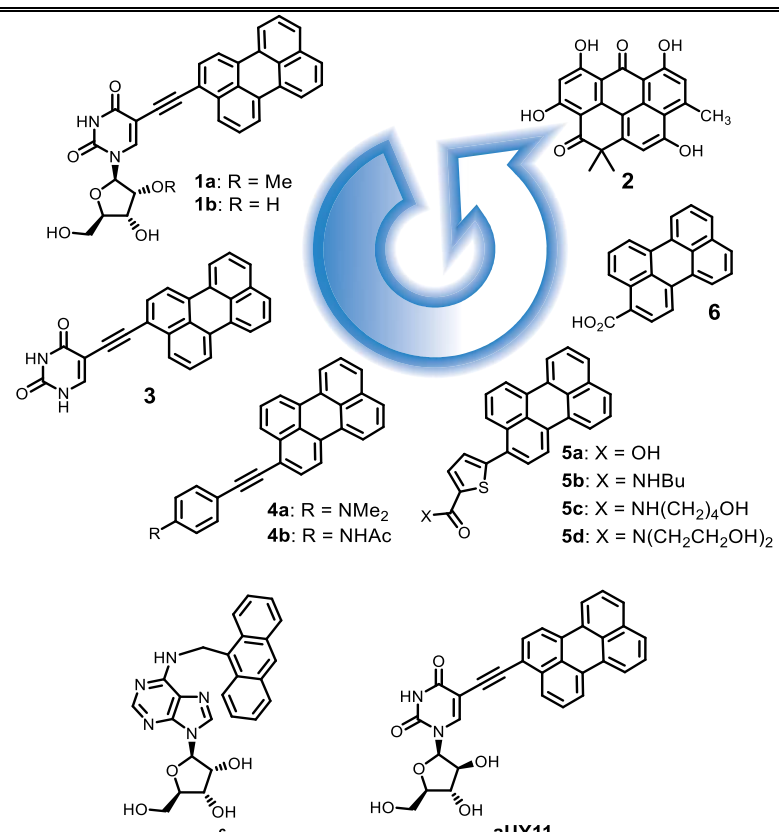


Рисунок 28 – Диаграмма зависимости показателя противовирусной активности производных dUY11 против ВКЭ (pEC₅₀) от расчётных показателей а) липофильность (clogP); б) растворимость (pSaq); в) адсорбция в ЖКТ (cHIA); д) проникновение через гематоэнцефалический барьер (clogBB) для периленовых RAFL.

Дальнейшее исследование ещё более упрощённых структур производных dYU11, содержащих перилен, но лишённых уже и нуклеотидного остова показало, что гелиомицин **2** обладает активностью против ВКЭ наряду со значительной цитотоксичностью для клеток СПЭВ (Таблица 10), что согласуется с литературными данными [Nadysev et al., 2018]. 3-периленкарбоновая кислота **6** имеет выраженную противовирусную активность наряду с низкой цитотоксичностью. 2'-О-метилрибонуклеозид **3** имеет сходные значения EC₅₀, в три раза превышающие соответствующие для дезоксирибо- (dUY11) и арабино-

(aUY11) соединения. Анилины **4a,b** оказались умеренно активными и нетоксичными. Периленилтиофен-карбоновая кислота **5a** оказалась наиболее высокоактивным и наименее цитотоксичным соединением с индексом селективности более 30000, таким образом представляя новый противовирусный каркас. Амиды этого соединения **5b–d** проявили слегка сниженную противовирусную активность, которая, однако, попадает в аналогичный диапазон концентраций, что согласуется с нашими исследованиями производных 5-(перилен-3-илэтинил)урацил-1-уксусной кислоты [Slesarchuk et al., 2020].

Таблица 10 – Цитотоксичность и активность упрощённых производных перилена на репродукцию ВКЭ (по подавлению бляшкообразования)

Структуры	Шифр	ВКЭ, EC ₅₀ ± SD, мкМ	СПЭВ, CC ₅₀ ± SD, мкМ
	1a	0,006 ± 0,002	38 ± 17
	1b	0,0077 ± 0,0014	>100
	2	0,15 ± 0,02	3,7 ± 1,3
	3	0,008 ± 0,002	37 ± 13
	4a	0,025 ± 0,015	>100
	4b	0,089 ± 0,010	>100
	5a	0,0016 ± 0,0002	26 ± 9
	5b	0,0039 ± 0,0007	>100
	5c	0,009 ± 0,004	>70
	5d	0,015 ± 0,004	>70
	6	0,037 ± 0,010	37 ± 13
	aUY11	0,021 ± 0,007	>50

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,000N – очень высокоактивно

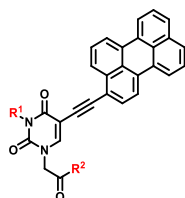
0,00N – высокоактивно

0,0N – активно

0,N – низкоактивно

Далее были проведены сравнительные исследования производных dUY11, замещённых по 1-му (N^1) и 3-му (N^3) положениям азотистого основания, и их Рот-замещённых аналогов против различных оболочечных вирусов. Результаты по вирусам представлены в соответствующих разделах, сравнительный анализ представлен в разделе 3.13.2. В отношении ВКЭ Рот-замещённые соединения обладают на порядок более высокой активностью (Таблица 11). Влияние заместителя в N^1 в целом одинаково в обеих сериях. Заместитель N^3 -Me снижает влияние гидрофобного заместителя и повышает активность. Соединения с двумя гидроксильными группами (**6g**/cm3pUY11, **6h**/cm22pUY11) обладают заметно более высокой активностью, что позволяет предположить наличие у них оптимальных заместителей. Наиболее гидрофильное соединение с тремя гидроксильными группами (**7c**/cm18pUY11b) проявило значительно меньшую активность. Большинство соединений не продемонстрировали существенного цитотоксического действия (Таблица 11) [Chistov et al., 2023].

Таблица 11 – Цитотоксичность и активность производных dUY11, замещённых по 1-му и 3-му положениям азотистого основания, на репродукцию ВКЭ (по подавлению бляшкообразования)



Шифр	R^1	R^2	ВКЭ, EC ₅₀ ± SD, мкМ	СПЭВ, CC ₅₀ , мкМ
4 (cm0mUY11)	Me	—	0,021 ± 0,005	18
5 (cm1mUY11)			0,015 ± 0,004	>50
6a (cm13mUY11)			0,19 ± 0,03	37
6b (cm2mUY11)			0,026 ± 0,006	>50
6c (cm3mUY11)			0,024 ± 0,015	>50
6d (cm4mUY11)			0,0019 ± 0,0008	>50
6e (cm5mUY11)			0,016 ± 0,012	>50
6f (cm6mUY11)			0,050 ± 0,019	>50
6g (cm12mUY11)			0,050 ± 0,030	>50
6h (cm11mUY11)			0,0120 ± 0,0022	>50
6i (cm7mUY11)			0,0169 ± 0,0004	35
7a (cm8mUY11)			0,01687 ± 0,00028	35
7b (cm9mUY11)			0,013 ± 0,004	>50

Шифр	R ¹	R ²	ВКЭ, EC ₅₀ ± SD, мкМ	СПЭВ, CC ₅₀ , мкМ
7с (cm10mUY11)	POM		0,022 ± 0,005	>50
9 (m2UY11)		—	0,0045 ± 0,0011	>50
cm1pUY11			0,0012 ± 0,0002	>50
cm4pUY11			0,054 ± 0,003	>50
cm6pUY11			0,0021 ± 0,0004	>50
cm7pUY11			0,00043 ± 0,00013	>50
cm2pUY11			0,00069 ± 0,00012	>50
cm8pUY11			0,0016 ± 0,0006	>50
cm9pUY11			0,024 ± 0,003	>50
cm3pUY11			0,00079 ± 0,00012	>50
cm22pUY11			0,00044 ± 0,00012	>50
cm5pUY11			0,00097 ± 0,00015	>50
cm16pUY11			0,046 ± 0,017	>50
cm17pUY11			0,0010 ± 0,0003	>50
cm18pUY11			0,008 ± 0,001	18
UY11	—	—	0,008 ± 0,002	37
aUY11	—	—	0,018 ± 0,010	4,4

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,000N – очень высокоактивно

0,00N – высокоактивно

0,0N – активно

0,N – низкоактивно

Таким образом, разработанный метод фенотипической оценки анти-ортофлавивирусной активности по подавлению бляшкообразования позволяет оценивать значения активности соединений с достаточной точностью, чтобы проводить анализ соотношений структура-активность (SAR).

3.3.3.2. Нуклеозиды

Несмотря на то, что многочисленные аналоги нуклеоз(т)идов были протестированы против переносимых комарами ортофлавивирусов, систематических исследований соотношений структура-активность не проводилось, или из разных лабораторий доступны лишь отдельные данные о SAR для конкретных серий соединений. Было обнаружено, что тритилирование [De Burghgraeve et al., 2013; Chatelain et al., 2013; Saudi et al., 2014; McGuigan et al., 2016] или силилирование [Angusti et al., 2008; Vernekar et al., 2015] сахарного остатка

являются особенно привлекательными стратегиями достижения ингибирующего эффекта нуклеозидов на репродукцию ортофлавириусов. А ациклические аналоги нуклеозидов неэффективны против ортофлавириусов *in vitro* [McGuigan et al., 2016; Wainwright et al., 2013]. Нуклеотидные основания варьировали довольно консервативно, в основном за счёт изменения водородных связей или структуры электронной плотности путем замены атомов азота и углерода [Chen et al., 2015; Wu et al., 2010; Ojwang et al., 2005]. N⁶-замещенные аденозины (N⁶-бензиладенозин и N⁶-фурфуриладенозин) проявили активность против вирусов Ласса и Марбург в рамках высокопроизводительного скрининга [PubChem 1, 2], а также против энтеровируса A71 [Drenichev et al., 2016; Tararov et al., 2015].

Для расширения SAR нуклеозидов против ВКЭ был проведен скрининг серии N⁶-замещенных производных аденозина наряду с N²-замещенными гуанозинами, N⁴-замещенными цитидинами, полярными рибозидами нуклеотидов и 3'-С-метилированными нуклеозидами. Исследования были проведены к.х.н. Орловым А.А. при участии и под руководством автора данной работы.

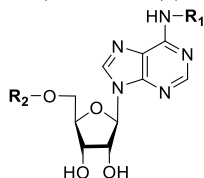
Большинство соединений этой серии не проявляли активность по ингибированию бляшкообразования ВКЭ (Таблица 12). Это говорит о том, что декорирование аминогрупп азотистых оснований, а также 3'-С-метилирование рибозы обычно не приводят к возникновению такого рода активности.

Активность N⁶-замещенных производных аденозина против ВКЭ постепенно увеличивалась с увеличением размера заместителя в положении N⁶ от метила до 2-пиренилметила: метиладенозин **2a** и бензиладенозин **1a** были неактивны, антраценилметиладенозин **1g** проявил активность, а N⁶-(2-пиренилметил)аденозин **1h** продемонстрировал выраженный противовирусный эффект на микромолярном уровне (наравне с ранее описанными нуклеозидами [Eyer et al., 2015, 2016]), хотя и оказался довольно цитотоксичным. Удаление рибозы из **1a** с получением бензиладенина **1l** не привело к появлению противовирусной активности. Активность **1h** с объёмным ароматическим заместителем может быть объяснена взаимодействием с вирусной мембраной, аналогично RAFI, описанным выше [Orlov et al., 2017].

Возможный механизм действия идентифицированных ингибиторов ВКЭ может быть связан с взаимодействием с белком NS5, состоящим из доменов метилтрансферазы и RdRp, или ингибированием проникновения в клетку. Подобные замещённые нуклеозиды ингибировали активность ортофлавирусной РНК полимеразы NS5 в ферментативных тестах [Angusti et al., 2008; De Burghgraeve et al., 2013; Vernekar et al., 2015; Chen et al., 2013].

Таблица 12 – Цитотоксичность и активность производных нуклеозидов на репродукцию ВКЭ (по подавлению бляшкообразования)

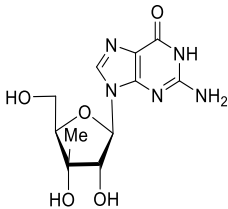
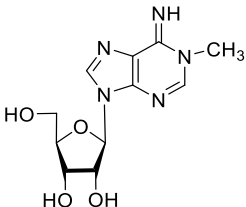
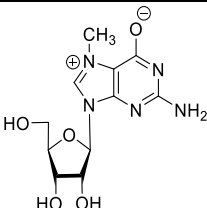
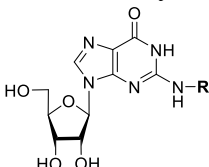
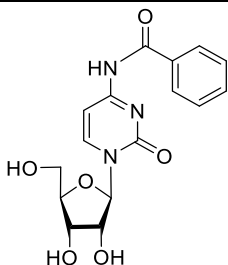
N⁶-замещённые аденозины				
Шифр	Заместитель		ВКЭ, EC ₅₀ ± SD, мкМ	СПЭВ, CC ₅₀ , мкМ
	R ₁	R ₂		
1a		H	>50	ND*
1b		H	>50	ND
1c		H	>50	ND
1d		H	>50	ND
1e		H	>50	ND
1f		H	>50	ND
1g		H	15 ± 2	>50
1h		H	6 ± 1	9
1i			2 ± 1	9
1j			20 ± 10	>50
1k			5 ± 4	>50
1l			>50	>50

N⁶-замещённые аденозины

Шифр	Заместитель		БКЭ, EC ₅₀ ± SD, мкМ	СПЭВ, CC ₅₀ , мкМ
	R ₁	R ₂		
2a	CH ₃	H	>50	ND
2b		H	>50	ND
2c		H	>50	ND
2d		H	>50	ND
2e		H	>50	ND
2f		H	>50	ND
2g		H	>50	ND
2h		H	>50	ND
2i		H	>50	ND
2j		H	>50	ND

3'-С-метилнуклеозиды

Шифр	Структура	БКЭ, EC ₅₀ ± SD, мкМ	СПЭВ, CC ₅₀ , мкМ
3a		>50	ND
3b		>50	ND
3c		>50	ND

Шифр	Структура	БКЭ, EC ₅₀ ± SD, мкМ	СПЭВ, CC ₅₀ , мкМ
3d		>50	ND
4a		>50	ND
4b		>50	ND
<i>N</i>²-замещённые гуанозины 			
Шифр	R	БКЭ, EC ₅₀ ± SD, мкМ	СПЭВ, CC ₅₀ , мкМ
5a		>50	ND
5b		>50	ND
<i>N</i>⁴-замещённый цитидин			
Шифр	Структура	БКЭ, EC ₅₀ ± SD, мкМ	СПЭВ, CC ₅₀ , мкМ
6		>50	ND

*ND – не исследовали

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0–10 – высокоактивно

10–20 – активно

20–50 – низкоактивно

>50 – неактивно

3.3.3.3. Феноксазиновые нуклеозиды

Противовирусная активность аналога нуклеозида может быть достигнута путем изменения размера и формы не только сахарного остатка, но и ароматического гетероциклического основания. Нуклеозидные и ациклические аналоги с большими ароматическими заместителями привлекают большое внимание благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам и широкому спектру биологической активности.

Производные феноксазина с системой гетероциклов ранее использовались для стабилизации дуплексов нуклеиновых кислот [Lin, Matteucci, 1998; Holmes et al., 2003; Ortega et al., 2007; Lou et al., 2014; Varizhuk et al., 2017; Kishimoto et al., 2017] и С-богатых квадруплексов [Tsvetkov et al., 2018], для обнаружения 8-охо-dG или поврежденного нуклеотида в составе олигонуклеотидов [Nakagawa et al., 2007; Nasr et al. 2009; Li et al., 2010; Taniguchi et al., 2014], и для ковалентного захвата 8-нитрогуанозина [Fuchi, Sasaki, 2014, 2015] и 8-тиогуанозина [Fuchi et al., 2015]. Кроме того, эти производные рассматриваются как флуоресцентные зонды для распознавания, изучения структуры и метаболизма нуклеиновых кислот [Gardarsson et al., 2011; Rodgers et al., 2014].

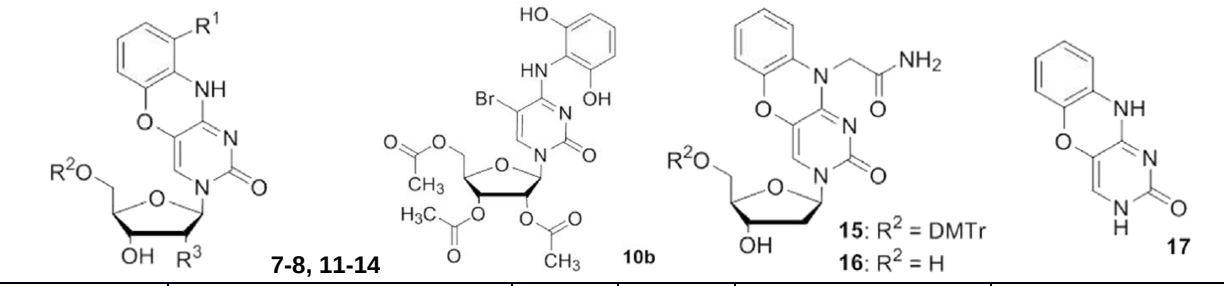
Учитывая лёгкое включение феноксазиновых нуклеозидов в цепь нуклеиновых кислот [Edwards et al., 2011], они могут нарушать репликацию и транскрипцию клеток и вирусов, влияя на эффективность синтеза ДНК и РНК клеточными или вирусными полимеразми. Тем не менее, несмотря на большое количество применений в химии нуклеиновых кислот и молекулярной биологии, противовирусные свойства феноксазиновых нуклеозидов до сих пор не охарактеризованы. Тем не менее ранее показано, что феноксазины без сахарного фрагмента обладают противовирусной активностью в отношении ЦМВ и умеренно ингибируют репродукцию ВПГ-1 и ВПГ-2 (Hayashi et al., 2008), что указывает на возможность дальнейшего анализа.

Был проведен фенотипический скрининг серии производных феноксазиновых нуклеозидов, содержащие заместители в 2'-дезоксирибозы или рибозы против различных РНК-содержащих вирусов. Результаты по вирусам

представлены в соответствующих разделах. Экспериментальные исследования с ВКЭ, ВОГЛ и ПОВ спланированы и проведены автором данной работы с участием к.х.н. Орлова А.А., Хватова Е.В., Коручекова А.А.

Большая часть исследованных соединений не вызывала появления признаков токсичности в клетках СПЭВ, но соединения серий **8** и **12** обладали выраженной токсичностью к 7-му дню инкубации (Таблица 13). Субмикромольный эффект ингибирования репродукции ВКЭ проявили производные серий **13** и **14**, защищённые DMTr (EC_{50} 0,35-10,7 мкМ) [Kozlovskaya et al., 2019].

Таблица 13 – Цитотоксичность и активность феноксазиновых нуклеозидов на репродукцию ВКЭ (по подавлению бляшкообразования)

					
Шифр	R1	R2	R3	ВКЭ, $EC_{50} \pm SD$, мкМ	СПЭВ, $CC_{50} \pm SD$, мкМ
7a	H	H	H	> 25	>100
7b	H	H	OH	> 25	>100
7c	H	H	OCH ₃	47 ± 1	>100
8a	H	H	DMTr	3,4 ± 1,4	<12.5
8b	H	DMTr	OH	0,9 ± 0,3	<12.5
8c	H	DMTr	OCH ₃	1,44 ± 0,01	28 ± 11
10b				> 75	ND*
11a	OCH ₂ CH ₂ NH-CBz	H	H	> 50	> 50
11b	OCH ₂ CH ₂ NH-CBz	H	OH	> 80	> 80
12a	OCH ₂ CH ₂ NH ₂	H	H	12 ± 1	<12.5
12b	OCH ₂ CH ₂ NH ₂	H	OH	14,1±1,9	<16
13a	OCH ₂ CH ₂ NH-CBz	DMTr	H	0,7± 0,5	> 50
13b	OCH ₂ CH ₂ NH-CBz	DMTr	OH	0,4 ± 0,3	>40
14a	OCH ₂ CH ₂ NH ₂	DMTr	H	0,9 ± 0,3	32 ± 11
14b	OCH ₂ CH ₂ NH ₂	DMTr	OH	2,40 ± 0,02	35 ± 12
15				2,0 ± 0,5	> 50
16				> 90	> 90
17				107,9 ± 0,4	ND
N⁶-(9-Anthranylmethyl)-adenosine				7,8 ± 0,4	> 50

*ND – не исследовали

Графы окрашены пропорционально значению EC_{50} для соединений:

0–1 – высокоактивно

1–10 – активно

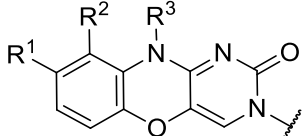
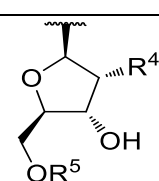
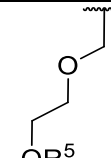
10–50 – низкоактивно

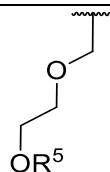
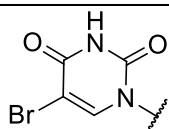
>50 – неактивно

Далее мы оценили противовирусную активность серии 1,3-диаза-2-оксофеноксазиновых нуклеозидов с жирными C₈₋₁₀ алкоксизаместителями в ароматическом фрагменте, а также производных с ациклическим и карбоциклическим фрагментами вместо остатка рибозы в отношении ряда РНК-содержащих вирусов. Результаты по вирусам представлены в соответствующих разделах.

Наиболее эффективными в отношении ВКЭ, ВОГЛ и ПОВ были соединения **11a**, **11b**, **12b** и **12c** со значениями EC₅₀ менее 10 мкМ (Таблица 14) [Kozlovskaya et al., 2021b].

Таблица 14 – Цитотоксичность и активность феноксазиновых нуклеозидов на репродукцию ВКЭ (по подавлению бляшкообразования)

									
									
Шифр	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	EC ₅₀ ± SD, мкМ			СПЭВ, CC ₅₀ ± SD, мкМ
						ВКЭ	ПОВ	ВОГЛ	
11a	OC ₈ H ₁₇	H	H	H	H	2,8 ± 0,4	1,5 ± 0,5	ND*	>100
11b	OC ₉ H ₁₉	H	H	H	H	5,3 ± 0,2	7,7 ± 1,2	ND	>100
11c	OC ₁₀ H ₂₁	H	H	H	H	40	4,4 ± 3,2	ND	>100
12a	OC ₈ H ₁₇	H	CH ₃	H	H	22 ± 6	13,3 ± 0,9	ND	>100
12b	OC ₉ H ₁₉	H	CH ₃	H	H	2,53 ± 0,18	2,4 ± 0,4	ND	>100
12c	OC ₁₀ H ₂₁	H	CH ₃	H	H	5,4 ± 0,3	0,45 ± 0,03	ND	79 ± 3
12d	H	H	CH ₃	H	H	40	>50	ND	>100
									
Шифр	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	EC ₅₀ ± SD, мкМ			СПЭВ, CC ₅₀ ± SD, мкМ
						ВКЭ	ПОВ	ВОГЛ	
16a	H	H	H	–	H	23,6 ± 0,4	>50	7,2 ± 0,7	>100
17	H	H	CH ₃	–	H	16 ± 9	13,5 ± 1,6	4,5	>100
19	H	H	H	–	DMTr	36 ± 3	21	21,4 ± 1,4	>100
20	H	H	CH ₃	–	DMTr	16 ± 7	8 ± 2	3,1 ± 1,5	>100



Шифр	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	EC ₅₀ ± SD, мкМ			СПЭВ, CC ₅₀ ± SD, мкМ
						ВКЭ	ПОВ	ВОГЛ	
13	–	–	–	–	H	>50	>50	>50	>100
14	–	–	–	–	Ac	>50	>50	33.0 ± 5.3	>100
18	–	–	–	–	DMTr	15 ± 4	22.0 ± 0.5	5 ± 2	46 ± 1
1-Adamantylmethyl 5-amino-4-(2-phenylethyl)isoxazole-3-carboxylate						4.0 ± 0.9	15 ± 5	15 ± 5	>100

*ND – не исследовали

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0–1 – высокоактивно

1–10 – активно

10–50 – низкоактивно

>50 – неактивно

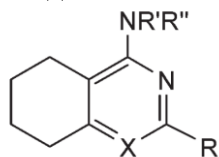
3.3.3.4. 4-аминотетрагидрохиназолины

С целью расширения хемотипов противовирусных соединений и поиска новых химических структур был проведён скрининг серии из 4-фторзамещенных пиримидиновых N-оксидов и пиримидинов, которые являются отличными субстратами для ароматического нуклеофильного замещения и обладают высоким потенциалом функционализации, предоставляя множество возможностей для создания новых молекулярных каркасов (Таблица 15). Исследования выполнены к.х.н. Дугево Е.В. под руководством и при участии автора данной работы.

Цитотоксичность **7a-ab** обычно была ниже для тех соединений, которые не содержали адамантильную часть. Значения цитотоксичности значительно различались как для производных N-оксида тетрагидрохиназолина, так и для производных тетрагидрохиназолина (Таблица 15). На основании этих данных все соединения были отправлены на дальнейшую оценку противовирусной активности.

Испытанные соединения дозозависимо ингибировали репродукцию ВКЭ (Таблица 15).

Таблица 15 – Цитотоксичность и активность 4-аминотетрагидрохиназолинов на репродукцию ВКЭ (по подавлению бляшкообразования)



Шифр	R	NR'R''		БКЭ, EC ₅₀ ± SD, мкМ	СПЭВ, CC ₅₀ , мкМ
		R'	R''		
7a	Me	H	<i>n</i> -Bu	12 ± 1	ND*
7b	Me	H	CH ₂ Ph	>50	93
7c	<i>t</i> -Bu	H	CH ₂ Ph	46 ± 3	98
7d	Me	H	CH ₂ (4-OMe-C ₆ H ₄)	>50	87
7e	Me	H	CH ₂ (3-OH-4-OMe-C ₆ H ₃)	>50	214
7f	Me			>50	>125
7g	Me			>50	>500
7h	<i>t</i> -Bu			>50	282
7i	Me			>50	>500
7j	Me			>50	305
7k	<i>t</i> -Bu			>50	213
7l	Me	H	Ph	>50	>250
7m	<i>t</i> -Bu	H	Ph	>50	>500
7n	Me	H	4-Me-Ph	5,60 ± 0,09	340
7o	Me	H	2-OH-Ph	>50	47
7p	Me	H	CH ₂ -(1-Ad)	>50	419
7q	<i>t</i> -Bu	H	CH ₂ -(1-Ad)	>50	40
7r	Me	H	CH(1-Ad)CH ₃	>50	12
7s	Me	H	(CH ₂) ₂ -(1-Ad)	ND	4
7t	Et	H	(CH ₂) ₂ -(1-Ad)	33,1 ± 0,2	64
7u	<i>t</i> -Bu	H	(CH ₂) ₂ -(1-Ad)	7,4 ± 0,5	12
7v	Me	H	(CH ₂) ₂ -(2-Ad)	>50	16
7w	<i>t</i> -Bu	H	(CH ₂) ₂ -(2-Ad)	6,6 ± 0,4	35
7x	Me	H	(CH ₂) ₂ O-(1-Ad)	>50	85
7y	Me	H	CH ₂ -(4-(1-Ad)-Ph)	11 ± 3	14
7z	<i>t</i> -Bu	H	CH ₂ -(4-(1-Ad)-Ph)	5,5 ± 0,2	11
7aa	Me			>50	90
7ab	<i>t</i> -Bu			14,1 ± 0,6	211

*ND – не исследовали

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0–10 – высокоактивно

10–20 – активно

20–50 – низкоактивно

>50 – неактивно

Соединение **7a** проявило умеренную активность с EC_{50} 12 мкМ. Ряд морфолин-содержащих соединений **7f–h**, производных пиперазина **7i–k** и производных первичных ароматических аминов не проявлял противовирусной активности, за исключением **7o** (EC_{50} = 5,60 мкМ) и малоактивного **7c**. Активные соединения **7u**, **7w**, **7z** и **7ab** содержали объёмную гидрофобную адамантильную группу в R" и трет-бутильный фрагмент в R-положении. Удаление адамантильной группы приводило к значительному снижению активности (**7z** по сравнению с **7c**) или к её потере (**7ab** по сравнению с **7k**). Замена трет-бутильного заместителя на более мелкие группы также снижала активность (**7s**, **7t**, **7v**, **7y**, **7aa**). Укорочение линкера между адамантилом и центральной частью (**7q**) также приводило к потере активности [Sedenkova et al., 2015].

3.3.3.5. Изоксазолы

Широко используемой стратегией конструирования противовирусных препаратов против оболочечных вирусов, включая ортофлавиовирусы, является ингибирование проникновения вируса в клетки за счёт предотвращения слияния мембран клетки и вириона [Mukhopadhyay et al., 2005]. Небольшие молекулы могут занимать карман β -ОГ в белке Е и предотвращать конформационную перестройку белка Е ортофлавиовирусов, необходимую для слияния мембран и высвобождения вирусного генома в цитоплазму. Поскольку аминокислотная последовательность и структура белков ортофлавиовирусов, особенно переносимых клещами, достаточно консервативны [Pierson, Diamond, 2013], можно ожидать, что ингибиторы слияния ВКЭ будут ингибировать репродукцию представителей других групп в качестве противовирусных препаратов широкого спектра действия.

Для расширения структурного разнообразия молекул и возможностей для разработки противовирусных препаратов против ортофлавиовирусов была протестирована серия соединений аналогичного размера с N-оксидом 4-аминотетрагидрохиназолина (Раздел 3.3.3.4) с целью оценки их активности против переносимых клещами ортофлавиовирусов (ВКЭ, ПОВ, ВОГЛ). Соединения на

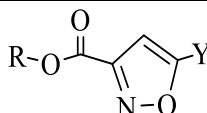
основе изоксазола были выбраны ввиду их структурной компактности, синтетической доступности и возможности разнообразной функционализации.

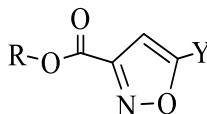
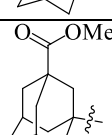
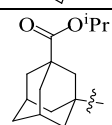
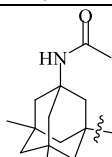
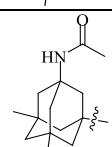
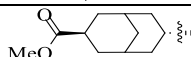
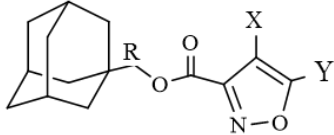
Экспериментальная работа выполнена автором работы и к.х.н. Дугевоу Е.В. под руководством автора работы.

Соединения **4a–d**, содержащие липофильные трет-бутильные, бензильные, 1-адамантильные или 2-адамантильные фрагменты в сложноэфирных группах, проявляли умеренную противовирусную активность (Таблица 16). Введение заместителей в адамантановое ядро независимо от их типа, объёмности, количества и положения не приводило к улучшению противовирусных свойств по сравнению с исходным соединением **4c**. Удлинение линкера на одну метиленовую группу (**4j**) приводило к существенному увеличению противовирусной активности, примерно на порядок. Дальнейшее удлинение и/или модификация линкера не увеличивали активность против ВКЭ (**4k–m**). Активность изучаемой подсерии в отношении репродукции ВОГЛ и ПОВ была менее выраженной.

Синтетический предшественник гетероцикла **4j**, соответствующий 5-нитроизоксазолу **6j**, проявил меньшую противовирусную активность, что подтверждает важность присутствия аминогруппы в гетероцикле. Введение липофильного β -фенилэтильного заместителя в положение 4 изоксазольного кольца (**4o**) не только сохраняло достаточные противовирусные свойства против ВКЭ, но и приводило к снижению цитотоксичности по сравнению с гетероциклом **4j**. При этом активность **4o** в отношении репродукции ВОГЛ была самой высокой из всей серии. Таким образом, терапевтический индекс **4o** оказался лучшим в исследованном ряду производных изоксазола [Vasilenko et al., 2019].

Таблица 16 – Цитотоксичность и активность соединений на основе изоксазола на репродукцию переносимых клещами ортофлавивирусов (по подавлению бляшкообразования)

Шифр	Заместители			CC ₅₀ , мкМ СПЭВ	EC ₅₀ ± SD, мкМ		
	R	X	Y		ВКЭ	ВОГЛ	ПОВ
							
4a	<i>t</i> -Bu	—	NH ₂	>500	17 ± 3	>50	13 ± 3
4b	PhCH ₂	—	NH ₂	324	19 ± 6	>50	31 ± 7

Шифр	Заместители			СС ₅₀ , мкМ СПЭВ	ЕС ₅₀ ± SD, мкМ		
	R	X	Y		ВКЭ	ВОГЛ	ПОВ
							
4c		—	NH ₂	382	11 ± 4	26 ± 1	12 ± 5
4d		—	NH ₂	160	11 ± 2	30 ± 1	13 ± 6
4e		—	NH ₂	ND*	>50	>50	>50
4f		—	NH ₂	>500	29 ± 3	>50	18 ± 7
4g		—	NH ₂	354	13 ± 2	22 ± 5	8 ± 2
6h		—	NO ₂	ND	>50	ND	ND
4h		—	NH ₂	ND	>50	>50	>50
4i		—	NH ₂	ND	>50	>50	>50
							
4j	-CH ₂ -	H	NH ₂	88	1,7 ± 0,1	24 ± 3	24 ± 8
6j	-CH ₂ -	H	NO ₂	ND	17 ± 3	ND	ND
4k	-CH ₂ -CH ₂ -	H	NH ₂	416	14 ± 2	13 ± 5	12 ± 2
4l	-O-CH ₂ -CH ₂ -	H	NH ₂	ND	>50	>50	38 ± 12
4m	-Ph-CH ₂	H	NH ₂	273	20 ± 3	22 ± 20	29 ± 5
4n	-CH ₂ -	Me	NH ₂	62	22,4 ± 0,6	25 ± 5	14 ± 3
4o	-CH ₂ -	CH ₂ CH ₂ Ph	NH ₂	416	3,7± 0,2	12 ± 2	15 ± 2
Контроль	N-Butyl-2-methyl-5,6,7,8-tetrahydroquinazoline-4-amine 1-oxide			> 50	12 ± 1	ND	ND

*ND – не исследовали

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0–10 – высокоактивно

10–20 – активно

20–50 – низкоактивно

>50 – неактивно

3.3.3.6. Селен-содержащие органические низкомолекулярные соединения

Противовирусную активность обычно оценивают для соединений, состоящих из основных биогенных элементов: С, N, O, S и Р. Исследование химии других элементов является перспективной стратегией для открытия новых противовирусных классов. Одним из жизненно важных элементов является селен, который играет важную роль в нескольких биологических процессах, включая защиту клеток от окислительного стресса и дейодирование гормонов щитовидной железы [Minutoli et al., 2015]. Дефицит селена также связан с вирулентностью и патогенезом ряда РНК-содержащих вирусов [Steinbrenner et al., 2015]. Атом селена часто рассматривается как хорошая биоизостерическая замена атомов серы и кислорода в органических молекулах [Orlov et al., 2018]. Его радиус и электроотрицательность близки к атому серы [Ciapetti, Giethlen, 2008]. Спектр биологической активности селеноорганических соединений широк: от соединений с антиоксидантными свойствами до противовоспалительной, антипролиферативной, противомикробной и противовирусной активности [Mugesh et al., 2001].

Сообщения о противовирусной активности селеноорганических соединений охватывают в основном исследования Se-содержащих аналогов нуклеозидов. Селеназофурин, аналог противовирусного препарата широкого спектра действия рибавирина, был изучен против нескольких вирусов и проявил активность, сравнимую с рибавирином, *in vitro* [Kirisi et al., 1983, 1984; Huggins et al., 1984; Sidwell et al., 1985; Wray et al., 1986]. Аналог гуанозина 7-метил-8-селеногуанозин (7-Me-8-SeG) проявил 58% протективный эффект на мышинной модели против летальной инфекции, вызванной вирусом леса Семлики [Bonnet, Robins, 1993]. Аналог хорошо изученного нуклеозидного ингибитора репликации вирусов со стадией обратной транскрипции ВИЧ-1 и ВГВ β -Se-FddC активен против этих вирусов с EC_{50} в микромолярном диапазоне [Du et al., 1997; Chu et al., 2000]. С другой стороны, нуклеозид β -4-Se-ddU не проявил активности против ВИЧ-1 ($EC_{50} > 100$ мкМ) [Tosh et al., 2012]. Ациклические пиримидиновые Se-нуклеозиды (например, 6-PhSe-U) проявляли селективную противовирусную активность

против ВИЧ-1 и ВИЧ-2 в клетках, но не ингибировали обратную транскриптазу ВИЧ-1 [Goudgaon, Schinazi, 1991]. Ненуклеозидные селенорганические противовирусные препараты включают 1,2,3-селенадиазолтиоацетанилиды (STAs), проявляющие анти-ВИЧ-активность, вероятно, реализуемую через обратную транскриптазу [Zhan et al., 2009]. Механизм действия эбселена и его аналогов [Wójtowicz et al., 2003, 2004; Pietka-Ottlik et al., 2008] и диселенидов [Wójtowicz et al., 2003; Pietka-Ottlik et al., 2010] еще предстоит детально изучить [Orlov et al., 2018].

Разработанные методики фенотипического скрининга на основе ингибирования бляшкообразования ВКЭ и оценки цитотоксичности были далее применены для исследования противовирусной активности нескольких серий селенорганических и сероорганических соединений, полученных из цианотиоацетамида и цианоселеноацетамида (Таблица 17).

Таблица 17 – Цитотоксичность и активность селенорганических соединений на репродукцию ВКЭ (по подавлению бляшкообразования)

Шифр	Заместитель			CC ₅₀ , мкМ	EC ₅₀ ± SD, мкМ
	R	R ¹ или Ar ¹	R ² или Ar		
2a	—	4-MeC ₆ H ₄	2-furyl	>50	>50
2b	—	4-MeC ₆ H ₄	Ph	>50	8 ± 1
2c	—	4-Me-3-ClC ₆ H ₃	Ph	>50	4,7 ± 0,3
4a	—	Ph	Ph	>50	8 ± 1
4b	—	Ph	4-MeC ₆ H ₄	>50	7 ± 1

Шифр	Заместитель			CC ₅₀ , мкМ	EC ₅₀ ± SD, мкМ
	R	R ¹ или Ar ¹	R ² или Ar		
4c	—	4-MeC ₆ H ₄	Ph	>50	7 ± 2
5a	4-MeC ₆ H ₄	—	-	<50	ND*
5b	4-MeC ₆ H ₄ NH	—	-	35	9 ± 3
6a	4-MeC ₆ H ₄ NH	—	2-thienyl	ND	ND
6b	4-MeC ₆ H ₄	—	2-furyl	ND	ND
7a	2-thienyl	CN	2-thienyl	<50	ND
7b	OMe	CN	2-furyl	>50	9 ± 7
7c	Ph	CN	2-furyl	<50	ND
7d	4-MeC ₆ H ₄	CN	2-furyl	18	ND
7e	PhNH	CN	2-furyl	<50	ND
7f	4-MeC ₆ H ₄ NH	CN	2-furyl	ND	ND
7g	OMe	CN	Ph	>50	14 ± 13
7h	OEt	CN	Ph	>50	14 ± 9
7i	Ph	CN	Ph	<10	3
7j	4-MeC ₆ H ₄	CN	Ph	52	5,3 ± 0,2
7k	PhNH	CN	Ph	<50	ND
7l	4-MeC ₆ H ₄ NH	CN	Ph	ND	ND
7m	Ph	CN	2-MeOC ₆ H ₄	7	4 ± 3
7n	4-MeC ₆ H ₄	H	2-FC ₆ H ₄	35	>50
7o	PhNH	H	2-FC ₆ H ₄	>50	>50
7p	4-MeC ₆ H ₄ NH	H	2-FC ₆ H ₄	>50	>50
8a	H	—	2-furyl	>50	>50
8b	Ph	—	2-furyl	28	24 ± 3
8c	C(O)Ph	—	2-furyl	31	6 ± 2
8d	4-Me-3-ClC ₆ H ₃ NHC(O)	—	2-furyl	<50	ND
8e	PhNHC(O)	—	4-MeC ₆ H ₄	~50	11 ± 7
8f	4-MeC ₆ H ₄ NHC(O)	—	4-MeC ₆ H ₄	ND	ND
9a	4-MeC ₆ H ₄	—	2-thienyl	<50	ND
9b	4-FC ₆ H ₄	—	2-thienyl	<50	ND
9c	PhCH ₂	—	2-thienyl	<50	ND
9d	4-MeC ₆ H ₄	—	Ph	<50	ND
10a	2-thienyl	PhCH ₂	-	ND	ND
10b	2-thienyl	4-MeC ₆ H ₄	-	35	>50
11a	CH ₃	H	Ph	>50	3
11b	CH ₂ Ph	H	2-EtOC ₆ H ₄	35	4,90 ± 0,26
11c	CH ₂ Ph	R ¹ +R ² = (CH ₂) ₅	-	>50	2,34 ± 0,23
12a	—	—	Ph	>50	3 ± 1
12b	—	—	4-MeC ₆ H ₄	>50	0,44 ± 0,02

*ND – не исследовали в виду токсичности (CC₅₀ > 50 мкМ)

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0–10 – высокоактивно

10–20 – активно

20–50 – низкоактивно

>50 – неактивно

Все соединения из серий 6 и 9, а также несколько соединений из других серий были явно токсичными и в дальнейшем не исследовались. Низкотоксичные ($CC_{50} < 50$ мкМ) соединения были исследованы на противовирусную активность. Единственное умеренно токсичное соединение **10b** из серии 10 не проявляло активности в концентрации 50 мкМ. Таким образом, для дальнейшего исследования оставалось семь серий: 2, 4, 5, 7, 8, 11 и 12 (Таблица 17). Соединения **2b,c**, **4a-c**, **7b,g,h**, **11a,c** и **12a,b** ингибировали бляшкообразование ВКЭ в микромолярных концентрациях без признаков цитотоксичности при 50 мкМ [Orlov et al., 2018].

3.3.3.7. Гуминовые вещества

Гуминовые вещества представляют собой сложную природную смесь, содержащую различные органические кислоты, образующиеся в результате окислительной деградации макромолекул разлагающейся биомассы, таких как терпеноиды, лигнины, полисахариды, пептиды, дубильные вещества и т.д. [MacCarthy, 2001; Nebbioso, Piccolo, 2011]. Гуминовые вещества характеризуются широким спектром биологической активности, включая антибактериальные, противовирусные и противовоспалительные свойства [Perminova, Hatfield, 2005]. Только общие сведения о структурах молекул, содержащихся в гуминовых веществах, могут быть получены без осуществления tandemной масс-спектрометрической идентификации.

В рамках данной работы была проведена оценка противовирусной активности в отношении ВКЭ и цитотоксичности 10 проб гуминовых веществ (Таблица 18). Все образцы гуминовых веществ, использованные в этом исследовании, за исключением двух синтетических, ингибировали репродукцию ВКЭ с активностью в диапазоне EC_{50} 0,1–1 мкг/мл. Синтетические образцы (МНQ-FA и НQ-FA) не проявляли заметной активности ни в одном из экспериментов [Orlov et al., 2019].

Таблица 18 – Цитотоксичность и активность гуминовых веществ на репродукцию ВКЭ (по подавлению бляшкообразования)

Проба	СПЭВ СС ₅₀ , мкг/мл	ВКЭ ЕС ₅₀ ± SD, мкг/мл
CHM-Pow	>10	0,81 ± 0,02
CHM-GL	>10	0,51 ± 0,03
CHM-Irk	>10	0,14 ± 0,08
CHA-Pow	>10	0,26 ± 0,14
CHA-GL	>10	0,30 ± 0,19
CHA-SH4	>10	0,74 ± 0,15
PHA-TTL	>10	0,70 ± 0,30
PHA-T7	>10	0,90 ± 0,10
MHQ-FA	>10	>10
HQ-FA	>10	>10
3-amino-7,7-dimethyl-2-(4methylbenzoyl)-5H,6H,7H,8H-selenopheno[2,3b]quinolin-5-one	>100 мкМ	0,39 ± 0,11 мкМ

Разработанный, апробированный и валидированный метод оценки противовирусной активности по подавлению бляшкообразования переносимых клещами ортофлавириусов (ВКЭ, ПОВ, ВОГЛ) используется в лаборатории противовирусных лекарственных средств ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) для скрининга противовирусной активности низкомолекулярных соединений против ортофлавириусов.

3.4. Фенотипический скрининг противовирусной активности ингибиторов репродукции энтеровирусов

3.4.1. Отработка методики фенотипического скрининга против энтеровирусов по подавлению вирус-индуцированного ЦПД

Методика оценки нейтрализующей активности антител против полиовирусов (вид ЭВ-С) разработана и апробирована множеством лабораторий по всему миру. Всемирная организация здравоохранения внедрила эту методику во всех лабораториях Глобальной сети по надзору за полиомиелитом. Она представляет собой реакцию нейтрализации инфекционности (ЦПД) в клетках Нер2с [WHO, 2004]. При этом, ввиду того что полиовирус, как и другие энтеровирусы, активнее

размножается в метаболически активных делящихся клетках, то реакция проводится с добавлением смеси сыворотки и вируса к свежеприготовленной суспензии клеток перед посадкой на планшеты. Для получения сравнимых результатов к каждой реакции добавляются не только положительный (стандартная сыворотка) и отрицательный (сыворотка без антител) контроля, но и проводится подтитровка дозы вируса для соблюдения приемлемого диапазона доз (50-200 ТЦД₅₀): с одной стороны, для возможности использовать формулу Кербера для расчёта титра антител, с другой – для достижения сравнимости результатов, полученных в разных постановках и в разных лабораториях, и избегания ложноотрицательных результатов при слишком высокой дозе вируса. Именно эта методика была взята за основу скринингового теста по оценке противовирусной активности в отношении энтеровирусов.

В качестве тестовой культуры была выбрана линия клеток рабдомиосаркомы человека RD, так как в ней размножается большее количество энтеровирусов независимо от вида, чем в клетках Her2c, что делает тест универсальнее. В качестве тестовых штаммов были выбраны несколько актуальных изолятов наиболее распространённых типов ЭВ видов А, В и С.

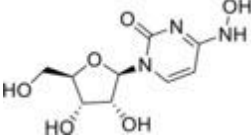
Методика была апробирована с использованием ингибитора широкого спектра действия N⁴-гидроксицитидин (ННС), для которого ранее была показана активность в отношении ингибирования репродукции различных РНК-содержащих вирусов через взаимодействие с вирусной репликативной системой и действующего по типу летального мутагенеза [Hadj Hassine et al., 2022]. Исследования выполнены автором данной работы.

N⁴-гидроксицитидин (ННС) (Таблица 19) ингибировал появление признаков ЦПД всех исследованных энтеровирусов трёх видов, при этом значения ЕС₅₀ были ниже для вирусов Коксаки независимо от принадлежности к виду энтеровирусов (ЭВ-А или ЭВ-В) [Kozlovskaya et al., 2018].

Таким образом, была разработана и валидирована на референтном соединении методика фенотипического скрининга противовирусной активности

соединений против энтеровирусов видов А, В и С с оценкой по ингибированию вирус-индуцированного ЦПД.

Таблица 19 – Противовирусная активность N⁴-гидроксицитидина против энтеровирусов разных видов при оценке по подавлению образования признаков ЦПД в культуре клеток RD

Структура	Вид ЭВ	Тип ЭВ	EC ₅₀ ± SD, мкМ
	ЭВ-А	ЭВ-А71	28 ± 13
		CVA16	5,8 ± 0,6
	ЭВ-В	E30	22 ± 5
		E6	87 ± 17
		CVA9	22 ± 5
	ЭВ-С	PV1	43 ± 9

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

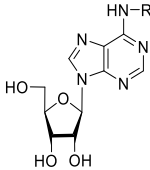
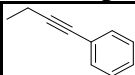
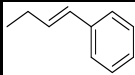
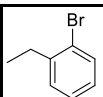
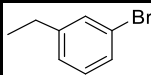
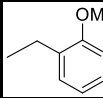
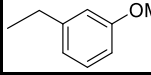
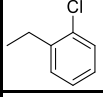
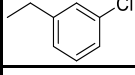
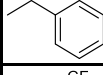
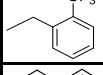
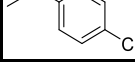
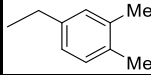
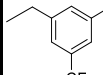
0–10 – высокоактивно
 10–20 – активно
 20–100 – низкоактивно
 >100 – неактивно

3.4.2. Сравнение методик фенотипического скрининга по подавлению энтеровирус-индуцированного ЦПД с учётом результатов методом световой микроскопии и по оценке доли жизнеспособных клеток (резазуриновый тест)

Сравнение методик было проведено с использованием прототипного штамма ВгCr ЭВ-А71 (вид ЭВ-А). Сравнение активности производных N⁶-бензиладенозина проводили по стандартной методике на растущих клетках RD против 100 ТЦД₅₀ вируса. Однако, фиксация результата после наступления 100% ЦПД в контрольных лунках с ДМСО происходила разным образом: был проведён учёт ЦПД методом световой микроскопии с расчётом EC₅₀ по формуле Кербера и с окраской резазурином для фиксации жизнеспособных клеток с расчётом EC₅₀ по кривой ингибирования (Таблица 20).

Значения EC₅₀, полученные по одной методике с разной фиксацией результата, не различались значимо, за исключением соединения **5p**. Из чего можно заключить, что значения EC₅₀, рассчитанные по формуле Кербера по результатам визуального учёта ЦПД, при постановке с титрованием соединений с шагом 2 статистически значимо не отличается от значений EC₅₀, рассчитанных для этих же экспериментов методом аппроксимации нелинейной функцией по результатам учёта доли жизнеспособных клеток в резазуриновом тесте.

Таблица 20 – Цитотоксичность и активность производных N⁶-бензиладенозина на репродукцию ЭВ-А71 (по подавлению признаков ЦПД с детексией методом световой микроскопии и в резазуриновом тесте)

				
#	Заместитель (R)	EC ₅₀ ± SEM, мкМ		p (тест Стьюдента)*
		Микроскопия	Резазуриновый тест	
Производные с алифатическими заместителями				
4g		6,2 ± 1,6	4,6	0,798
4h		4,9 ± 1,6	2,30	0,524
Однозамещённые производные				
5a		1,37 ± 0,08	<0,81	—**
5b		0,58 ± 0,21	<0,81	—
5d		1,37 ± 0,08	<0,81	—
5e		1,91 ± 0,42	2,30	0,895
5j		1,41 ± 0,28	1,15	0,862
5k		0,60 ± 0,18	<0,81	—
5n		1,06 ± 0,12	1,2	0,951
5p		32 ± 13	9,2	0,388
5r		6,6 ± 1,1	6,5	0,991
Двухзамещённые производные				
6c		0,34 ± 0,14	<0,81	—
6f		2,52 ± 0,28	1,15	0,454

* Для расчёта p: при отсутствии SD считали его равным значению; количество экспериментов – 2 для обеих групп

**– p не рассчитывали ввиду нехватки данных

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,N – очень высокоактивно

1-10 – высокоактивно

10-20 – активно

20-50 – низкоактивно

Тем не менее, в данном эксперименте не рассматривалось влияние других параметров постановки эксперимента: доза вируса, штамм вируса и т.п., которые могут вносить изменения в результаты эксперимента. Влияние этих параметров будет рассмотрено в разделах 3.10-3.14.

Несмотря на очевидные преимущества визуальной оценки ЦПД, такие как простота и дешевизна, очевидной проблемой таких методов является их зависимость от оператора: правильное определение признаков вирус-индуцированного ЦПД, физическая усталость оператора при учёте большого количества экспериментов, отсутствие возможности автоматической и независимой записи результатов эксперимента и, в связи со всем этим, невысокая масштабируемость скрининга. С другой стороны, при анализе доли жизнеспособных клеток, особенно автоматизированном, теряется возможность визуального контроля состояния клеток в процессе эксперимента, что не позволяет оценить причину гибели клеток (токсичность соединения, вирус, ошибка при постановке эксперимента) без дополнительных исследований (например, визуально методом световой микроскопии).

Также возможны объективные причины снижения жизнеспособности клеток при вирусной инфекции с добавлением соединения, часть из которых легко компенсируется постановкой контролей:

- вирус может ингибировать метаболизм клеток, и зависимость может быть нелинейной, но учитывается постановкой отрицательного контроля без соединений;
- исследуемые соединения могут ингибировать метаболизм клеток, и зависимость может быть нелинейной (т.е. признаков ЦПД нет, клетки полностью живы, но метаболически малоактивны) – эффект можно оценить только в отдельном тесте на цитотоксичность соединения.

3.4.3. Применение методики фенотипического скрининга по подавлению появления признаков энтеровирус-индуцированного ЦПД

3.4.3.1. Нуклеозиды

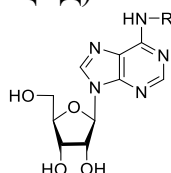
Различные низкомолекулярные соединения тестировали против энтеровирусов, в том числе, гуанидингидрохлорид, плеконарил, аналоги оснований/нуклеозидов, эпидитиодикетопиперазины, производные берберины, конъюгаты стероида тиазолина, сульфатированный рамнан и т.д. [Bauer et al., 2017; van der Linden et al., 2015; Smee et al., 2016; Wang et al., 2018; Wang et al., 2018; Ke et al., 2018]. Некоторые из них проявили высокую микромолярную активность *in vitro*. Ранее были идентифицированы несколько производных N⁶-бензиладенозина, продемонстрировавших ингибирование ЭВ-А71 с хорошими индексами селективности [Tanase et al., 2015; Tararov et al., 2015; Drenichev et al., 2016; Oslovskiy et al., 2017].

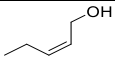
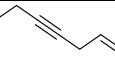
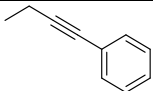
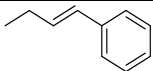
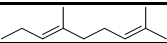
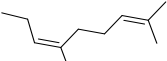
Мы определили спектр противовирусной активности серии из 87 производных N⁶-бензиладенозина против 3-6 представителей энтеровирусов видов А, В и С (Таблица 21). Исследования выполнены автором данной работы, Золотаревой (Голинец) А.Д и Карповой Е.В. при участии и под руководством автора данной работы.

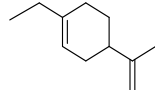
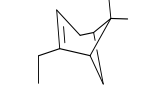
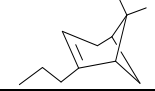
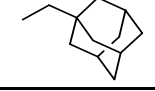
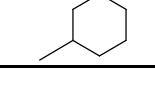
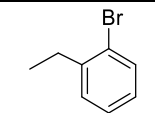
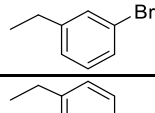
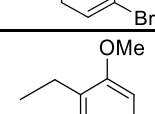
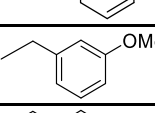
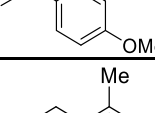
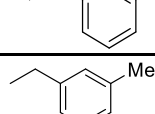
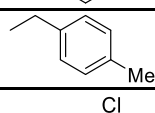
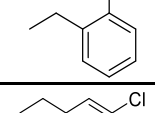
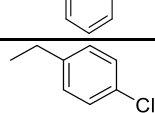
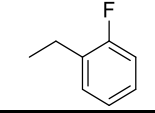
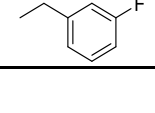
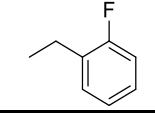
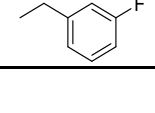
N⁶-замещённые производные аденозина с алифатическими заместителями (**4a-o**) были неактивны или в ряде случаев проявляли сниженную ингибирующую активность по сравнению с природными цитокининовыми нуклеозидами (**3a-c**), за исключением соединений **4g** и **4h**. Наиболее активными оказались монозамещённые производные N⁶-бензиладенозина с метоксиметильной (**5d, 5e**), метильной (**5g-i**), трифторметильной (**5p-q**) группами или атомом галогена (**5b, 5k, 5m-o**) и дизамещённые производные (**6a, 6c, 6g**). Однако высокая субмикромолярная активность **5d, 5n** и **5o** сопровождалась высокой микромолярной цитотоксичностью. Большинство соединений, активных в отношении ЭВ-А71, были неактивны в отношении Е30 или ПВ1. Аналоги N⁶-бензиладенозина, содержащие одну функциональную группу, такую как метил (**5g-**

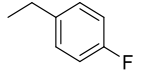
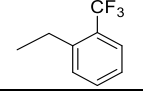
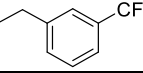
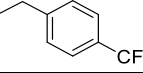
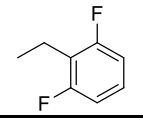
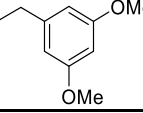
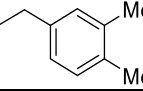
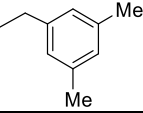
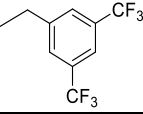
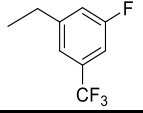
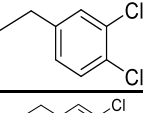
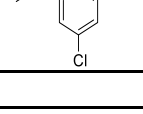
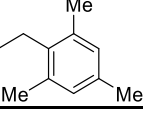
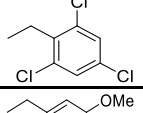
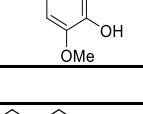
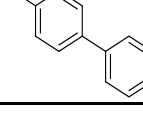
i), атом фтора (**5m-o**) или трифторметильная группа (**5p-r**) в разных положениях фенильной группы, а также N⁶-бензиладенозин (**3b**), имели сходные значения EC₅₀ в отношении CVA16 и ЭВ-A71, оба относятся к виду ЭВ-A, или E30 и E13, оба ЭВ-B. Соединения **3b**, **5b**, **5g-k**, **5m-r** и **6a**, **6c**, **6g** ингибировали репродукцию CVA16 на микромолярном или субмикромолярном уровне, как и ЭВ-A71. Большинство из них были неактивны как против E30, так и против E13, за исключением **5k**, **5n**, **5o** и **6g**, которые ингибировали их оба. Те же соединения и **5b** проявляли микромолярную активность в отношении ПВ1 (вид ЭВ-C). Наиболее активен в отношении всех исследованных энтеровирусов с EC₅₀ ≤ 2 мкМ N⁶-(3,4-дихлорбензил)аденозин (**6g**).

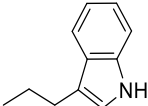
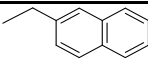
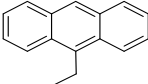
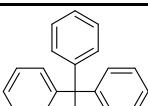
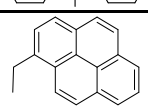
Таблица 21 – Цитотоксичность и активность производных N⁶-бензиладенозина на репродукцию энтеровирусов (по подавлению признаков ЦПД)



#	Заместитель (R)	RD CC ₅₀ ± SD, мкМ	EC ₅₀ ± SD, мкМ					
			ЭВ-A		ЭВ-B		ЭВ-C	
			ЭВ-A71	CVA16	E30	E13	ПВ1	CVA21
Природные цитокининовые нуклеозиды								
3a		7 ± 3	5,8 ± 4,9	ND*	n/a**	ND	n/a	ND
3b		8,1 ± 1,9	3,6 ± 1,3	0,92 ± 0,33	n/a	5,0 ± 0,6	n/a	n/a
3c		37	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
Производные с алифатическими заместителями								
4a	Me	>104	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
4b	OMe	74	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
4c	NH ₂	37	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
4d		37	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
4e		28 ± 13	19 ± 7	ND	n/a	ND	n/a	ND
4f		52 ± 30	22 ± 5	ND	n/a	ND	n/a	ND
4g		89 ± 22	7,2 ± 2,2	ND	n/a	ND	n/a	ND
4h		89 ± 22	5,6 ± 1,8	ND	n/a	ND	n/a	ND
4i		104	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
4j		74	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

#	Заместитель (R)	RD CC ₅₀ ± SD, мкМ	EC ₅₀ ± SD, мкМ					
			ЭВ-A		ЭВ-B		ЭВ-C	
			ЭВ-A71	CVA16	E30	E13	ПВ1	CVA21
4k		74	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
4l		89 ± 22	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
4m		36	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
4n		23	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
4o		62	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
Однозамещённые производные								
5a		74	1,50 ± 0,18	0,45 ± 0,05	n/a	n/a	n/a	n/a
5b		74	0,60 ± 0,07	0,28 ± 0,14	23 ± 4	27 ± 8	5,0 ± 0,64	7,7 ± 2,7
5c		74	6,3 ± 1,5	1,06 ± 0,11	n/a	n/a	n/a	n/a
5d		9	1,20 ± 0,41	0,41 ± 0,10	n/a	13 ± 7	n/a	n/a
5e		74	2,02 ± 0,25	0,82 ± 0,14	n/a	n/a	n/a	n/a
5f		ND	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
5g		68 ± 14	4,7 ± 1,0	ND	n/a	ND	n/a	ND
5h		74 ± 1	1,18 ± 0,51	0,30 ± 0,06	n/a	76 ± 21	53 ± 30	n/a
5i		87 ± 16	9,7 ± 5,3	1,2 ± 0,2	n/a	n/a	n/a	n/a
5j		82	1,83 ± 0,66	0,53 ± 0,06	n/a	n/a	n/a	n/a
5k		76	0,85 ± 0,11	0,28 ± 0,05	13 ± 3	8,5 ± 1,0	4,4 ± 1,6	6,3 ± 1,6
5l		41	3,2 ± 0,9	0,80 ± 0,31	n/a	10,1 ± 1,2	38 ± 13	55 ± 26
5m		63 ± 19	1,99 ± 0,83	1,7 ± 0,3	n/a	40 ± 5	n/a	n/a
5n		13 ± 7	1,44 ± 0,75	0,60 ± 0,12	8 ± 2	6,2 ± 2,2	6,9 ± 2,1	55 ± 46

#	Заместитель (R)	RD CC ₅₀ ± SD, мкМ	EC ₅₀ ± SD, мкМ					
			ЭВ-A		ЭВ-B		ЭВ-C	
			ЭВ-A71	CVA16	E30	E13	ПВ1	CVA21
5o		7 ± 3	1,43 ± 0,73	0,60 ± 0,12	5,9 ± 0,7	2,4 ± 0,7	5,6 ± 1,4	n/a
5p		92 ± 21	n/a	2,1 ± 0,3	n/a	n/a	n/a	n/a
5q		85 ± 17	0,45 ± 0,27	0,07 ± 0,01	n/a	n/a	n/a	n/a
5r		77 ± 6	74 ± 30	2,4 ± 0,5	n/a	n/a	n/a	n/a
Двухзамещённые производные								
6a		88 ± 15	1,23 ± 0,47	1,2 ± 0,2	n/a	n/a	n/a	n/a
6b		>100	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
6c		>100	0,66 ± 0,16	0,13 ± 0,06	n/a	n/a	n/a	n/a
6d		>100	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
6e		74	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
6f		>100	22 ± 5	0,59 ± 0,17	n/a	n/a	n/a	n/a
6g		74	0,43 ± 0,05	0,08 ± 0,02	1,39 ± 0,34	1,5 ± 0,2	1,78 ± 0,22	2,2 ± 0,5
6h		>104	29 ± 3	1,16 ± 0,16	n/a	n/a	n/a	n/a
Тризамещённые производные								
7a		>100	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
7b		74	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
7c		73	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
Производные с большими боковыми заместителями								
8a		52	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND

#	Заместитель (R)	RD CC ₅₀ ± SD, мкМ	EC ₅₀ ± SD, мкМ					
			ЭВ-А		ЭВ-В		ЭВ-С	
			ЭВ-A71	CVA16	E30	E13	ПВ1	CVA21
8b		>100	83 ± 14	ND	n/a	ND	n/a	ND
8c		74	14 ± 5	ND	n/a	ND	n/a	ND
8d		37	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
8e		13	n/a	ND	n/a	ND	n/a	ND
8f		43 ± 30	19 ± 7	ND	n/a	ND	n/a	ND

*ND – не исследовали

**n/a – неактивны в нетоксичных концентрациях

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,0N – высокоактивно

0,N

1-10

10-20

20-50

50-100 – низкоактивно

>100 – неактивно

Для расширения спектра аналогов нуклеозидов и возможного расширения SAR для будущего дизайна противовирусных соединений мы провели скрининг противовирусной активности небольшой серии различных аналогов и производных нуклеозидов с гидрофобными заместителями в азотистых основаниях (Таблица 22) [Kozlovskaya et al., 2018].

Соединения **1**, **2**, **5** и **6** не проявляли противовирусной активности ни против одного из исследованных энтеровирусов. Для соединения **2** (2'-амино-2'-дезоксиаденозин) это наблюдение согласуется с предыдущим исследованием, где ингибирование репликации наблюдалось для вируса кори, но не для вирусов ВПГ-2, ВВС и E7 [Taguchi et al., 1981].

Таблица 22 – Цитотоксичность и активность производных и аналогов нуклеозидов на репродукцию энтеровирусов (по подавлению признаков ЦПД)

Шифр	Структура	CC ₅₀ , мкМ RD	EC ₅₀ ± SD, мкМ					
			ЭВ-A		ЭВ-B			ЭВ-C
			ЭВ-A71	CVA16	E30	E6	CVA9	ПВ1
1		>100	>100	ND*	>100	ND	ND	>100
2		>100	>100	ND	>100	ND	ND	>100
3		>100	>100	ND	>100	ND	ND	>100
4		>100	>100	ND	>100	ND	ND	>100
5		>100	>100	ND	>100	ND	ND	>100
6		73	18 ± 12	5,4 ± 1,2	>100	>100	>100	>100
7		36	16 ± 9	3,8 ± 0,8	>100	>100	>100	>100
8		>100	>100	ND	>100	ND	ND	>100
9		20	> 100	ND	>100	ND	ND	>100
Контроль	N ⁶ -Benzyladenosine	9,2	2,5 ± 0,2	0,92 ± 0,24	11 ± 2	ND	ND	10 ± 1

*ND – не исследовали

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,N – активно

1-10

10–20

20–50 – слабоактивно

>50 – неактивно

Фурано[2,3-d]пиримидиновые нуклеозиды с алкин-1-ильными хвостами **5-8** и их синтетический аналог-предшественник **9** проявили противовирусную активность. Ранее для **9** показана активность против BVDV (EC₅₀ 1,9 мкМ) и

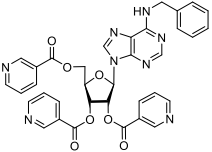
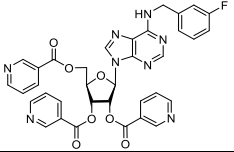
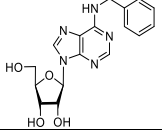
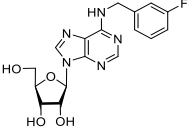
умеренная против ВГС (EC_{50} 100 мкМ) без ингибирования РНК-зависимой РНК полимеразы NS5B и РНК-хеликазы NS3 [Taba et al., 2017]. Аналоги (**5-8**) ранее были протестированы против ВВЗ и ЦМВ, и наиболее активные из них имели заместители C_{10} и C_{12} [Robins et al., 2006]. Для безоболочечных РНК-содержащих энтеровирусов также существует оптимальная длина цепи алкила: активны только соединения (**6** и **7**) с C_5 - и C_6 -алкилами, а удлинение (**8**) или удаление (**5**) цепи приводит к потере активности. Активность вряд ли может быть связана с детергентными свойствами молекулы, учитывая, что только вирусы, принадлежащие к виду энтеровирус А, ЭВ-А71 и CVA16, чувствительны к этим соединениям [Kozlovskaya et al., 2018].

По сравнению с N^6 -бензиладенозином, соединения **6** и **7** демонстрируют гораздо более приемлемый уровень токсичности (Таблица 22). Стоит отметить, что сам уровень токсичности значительно ниже для фурано[2,3-d]пиримидиновых нуклеозидов, чем для N^6 -бензиладенозина, и это открывает путь для дальнейшей разработки более активных структур, сохраняющих такую же низкую токсичность [Kozlovskaya et al., 2018].

Подходом к снижению цитотоксичности соединений является синтез биоразлагаемых форм соединений, которые постепенно подвергаются метаболическим превращениям внутри клеток с образованием исходных соединений или желаемых метаболитов [Clas et al., 2014]. Одним из общих подходов к созданию таких биоразлагаемых производных является введение в их структуру остатков различных эфиров. Эти заместители могут повышать стабильность и липофильность исходных соединений и обеспечивать сайт-специфическую или сайт-усиленную доставку лекарств через плазматические мембраны или липидные барьеры за счет многоступенчатых ферментативных и/или химических превращений [Bodor, Buchwald, 1999].

Производные N^6 -бензиладенозина **3b** и фтор- N^6 -бензиладенозина **5n** с биоразлагаемым остатком никотиновой кислоты в сахарном остатке были протестированы на активность против ЭВ-А71 и цитотоксичность (Таблица 23).

Таблица 23 – Цитотоксичность и активность производных N⁶-бензиладенозина на репродукцию энтеровирусов (по подавлению признаков ЦПД)

Шифр	Структура	EC ₅₀ ± SD, мкМ		CC ₅₀ ± SD, мкМ
		46973	BrCr	
3b-N		2 ± 4	11 ± 6	>100
5n-N		9 ± 2	7 ± 3	>100
3b		2,0 ± 0,4	1,6 ± 0,6	13 ± 8
5n		1,5 ± 0,6	0,9 ± 0,2	17 ± 7

Полностью О-никотиноилированные производные N⁶-бензиладенозина **3b-N** и **5n-N** ингибировали репродукцию обоих тестовых штаммов ЭВ-А71 BrCr и 46973 и проявляли значительно более низкую цитотоксичность (CC₅₀ >100 мкМ) по сравнению с исходными соединениями **3b** и **5n** (CC₅₀ 13–17 мкМ). Противовирусная активность фторсодержащего соединения **5n-N** в 1,5 раза превышала активность **3b-N** в отношении шт. BrCr и в два раза – в отношении шт. 46973. По расчётным данным **3b-N** и **5n-N** обладают более высокой липофильностью (сLogP 3,77 и 3,91 соответственно), чем исходные **3b** и **5n** (сLogP -0,06 и 0,08 соответственно). Таким образом, должны легко проникать в клетки с последующим гидролизом внутри клеток. Противовирусная активность **3b-N** и **5n-N** в отношении штамма BrCr была примерно на порядок ниже, чем у исходных соединений **3b** и **5n**, однако, абсолютные значения всё ещё достаточно высокие и находятся в микромолярном диапазоне. Это согласуется с экспериментальными данными для 5'-О-никотиноилированного AZT против ВИЧ [Torrence et al., 1988; Aggarwal et al., 1990] и может быть связано с последовательным гидролизом связей никотиноилового эфира внутри клетки. Затем постепенное высвобождение незащищенных нуклеозидов **3b** и **5n** может привести к накоплению их 5'-

трифосфорилированных форм в нетоксичных концентрациях, достаточно высоких для ингибирования репродукции вируса [Zenchenko et al., 2022].

3.4.3.2. Жёсткие амфипатические ингибиторы слияния (RAFI) – неспецифическая активность

RAFI, как описано выше, ингибиторы слияния, нацеленные на липидные мембраны. Поэтому очень часто безоболочечные вирусы используются как контроль механизма действия. Была проведена оценка активности амидов 5-(perylene-3-ylethynyl)-1-(carboxymethyl)uracil, замещённых по 1-му положению (вместо сахарного остатка) на углеводородные хвосты различной длины и структуры, и их N3-Pom-защищённых аналогов против ЭВ-А71 в культуре клеток RD. Два соединения **2d** и **2g** проявили противовирусную активность, сравнимую с цитотоксичностью при многократном повторении эксперимента (Таблица 24).

Таблица 24 – Цитотоксичность и активность производных периленовых нуклеотидов на репродукцию ЭВ-А71 (по подавлению ЦПД)

Структура	Шифр	ЭВ-А71, EC ₅₀ ± SD, мкМ	RD, CC ₅₀ ± SD, мкМ
a: R = Bu, R' = H; b-f: R = -(CH₂)_nOH (n = 2-6), R' = H; g: R = -CH₂CH(OH)CMe₂CH₂OH, R' = H; h: R = R' = -(CH₂)₂OH.	1	n/a*	65 ± 9
	2a	n/a	76 ± 11
	2b	n/a	>104
	2c	n/a	>104
	2d	56 ± 7	81 ± 8
	2e	n/a	>104
	2f	n/a	38 ± 8
	2g	108 ± 21	106 ± 11
	2h	n/a	>104
	8a	n/a	10 ± 2
	8b	n/a	38 ± 8
	8c	n/a	10 ± 2
	8d	n/a	38 ± 8
	8e	n/a	10 ± 2
	8f	n/a	38 ± 8
	8g	n/a	19 ± 4
	8h	n/a	14 ± 3

*n/a – неактивны в нетоксичных концентрациях

Поскольку энтеровирусы представляют собой быстро размножающиеся вирусы с коротким репликативным циклом в клеточной линии, урожай вируса сильно зависит от благополучия клетки [Palansch et al., 2013]. Уровни активности против ЭВ-А71 были довольно близки к уровням цитотоксичности, поэтому можно было ожидать, что RAFI могут влиять на клеточную активность или скорость размножения клеток, что приводит к снижению скорости размножения ЭВ-А71. Чтобы исследовать это, мы оценили жизнеспособность клеток RD, СПЭВ и Vero в присутствии **2d** и **2g**, демонстрирующих некоторую активность против ЭВ-А71, и неактивных **1** и **8c** в резазуриновом тесте (Рисунок 29). Соединения **2d** и **2g** в концентрациях >20 мкМ заметно снижали жизнеспособность клеток RD, но не влияли на клетки СПЭВ или Vero. Кроме того, наблюдалась корреляция между цитостатическим эффектом и EC_{50} : **2d** с EC_{50} 81 ± 8 мМ оказывал более выраженный цитостатический эффект, чем **2g** с EC_{50} 108 ± 21 мМ [Chistov et al., 2019].

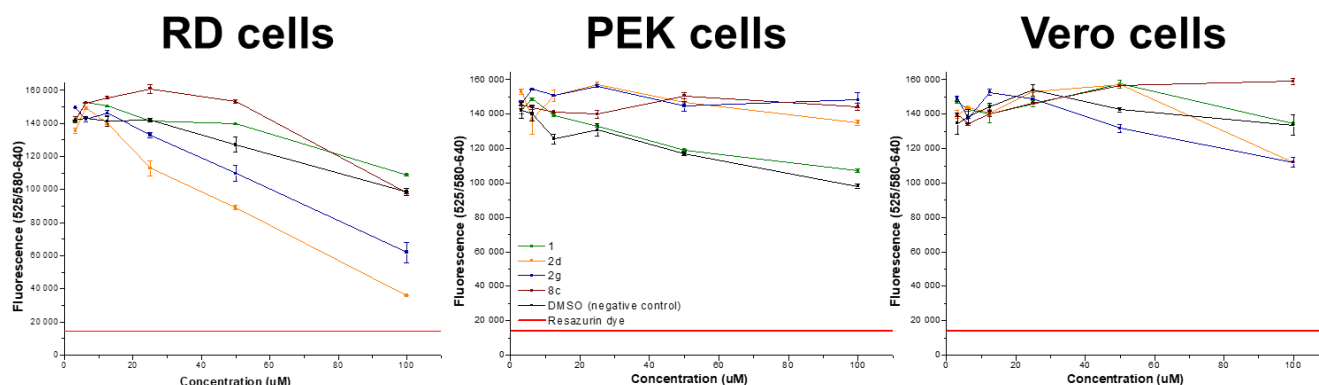


Рисунок 29 – Оценка жизнеспособности клеток RD, СПЭВ и Vero в присутствии производных периленовых нуклеозидов, проявивших некоторую активность против ЭВ-А71.

Таким образом, можно предположить, что анти-энтеровирусная активность RAFI **2d** и **2g** неспецифична и является результатом снижения жизнеспособности клеток RD, которые не могут в достаточной степени поддерживать репродукцию вируса.

Этот вывод должен привлечь внимание к более точному анализу данных о противовирусной активности *in vitro*.

3.4.3.3. Другие соединения

Соединения, описанные в разделах 3.3.3.3 (феноксазиновые нуклеотиды), 3.3.3.4 (4-аминотетрагидрохиназолины), 3.3.3.6 (селен-содержащие органические), 3.3.3.7 (гуминовые вещества) не проявили активности против энтеровирусов (тестировали против ПВ1 или ЭВ-А71, Е30 и ПВ1).

3.4.3.4. Растительные экстракты

Было проведено исследование ингибиторной активности против ЭВ-А71 для 64 экстрактов растительного происхождения, полученных путём экстракции органическими растворителями из растительной биомассы с последующим хроматографическим фракционированием (Таблица 25). В основном, экстракты не ингибировали репродукцию ЭВ-А71, за исключением белково-пептидных экстрактов (БПЭ) тутовника, чернушки посевной (*Nigella sativa*) и папоротника орляка (*Pteridium aquilinum*). При этом для последнего EC_{50} составило всего $1,9 \pm 0,3$ мкг/мл, что делает его перспективным для дальнейшего исследования.

Таблица 25 – Цитотоксичность и активность растительных экстрактов на репродукцию ЭВ-А71 (по подавлению ЦПД)

Растение	Характер образца	$EC_{50} \pm SD$, мкг/мл
Адамов корень (<i>Dioscorea communis</i>)	Ацетон	>500
	Бутанол	>500
	Этилацетат	>500
Амарант	БПЭ	>500
Амброзия (<i>Ambrosia</i> sp.)	Ацетон	>500
	БПЭ	>500
	Бутанол	>500
	Гексан	>500
	Этилацетат	>500
Борщевик (<i>Heracleum sphondylium</i>)	Ацетон	>500
	БПЭ	>500
	Бутанол	>500
Дуб (<i>Quercus robur</i> cortex)	Водный экстракт 3-4%	>500
	Водный экстракт 10%	>500
	Водный экстракт 50%	>500
	Бутанол	>500
	Этилацетат	>500

Растение	Характер образца	EC ₅₀ ± SD, мкг/мл
Ежа сборная (<i>Dactylis glomerata</i>)	Ацетон	>500
	БПЭ	>500
	Бутанол	>500
	Гексан	>500
	Этилацетат	>500
Ежовник	БПЭ	>500
Канатник	БПЭ	>500
Колосняк (<i>Leymus arenarius</i>)	Ацетон	>500
	БПЭ	>500
	Бутанол	>500
	Этилацетат	>500
Мальва	БПЭ	>500
Марь (<i>Chenopodium acerifolium</i>)	Ацетон	>500
	БПЭ	>500
	Бутанол	>500
	Этилацетат	>500
Мокрица	БПЭ	>500
Одуванчик (<i>Araxacum officinále</i>), семена	Ацетон	>500
	БПЭ	>500
	Бутанол	>500
	Гексан	>500
	Этилацетат	>500
Одуванчик, (<i>Araxacum officinále</i>), цветки	БПЭ	>500
Папартник орляк	Ацетон	>500
	БПЭ	1,9 ± 0,3
	Бутанол	>500
	Этилацетат	>500
Пырей удлинённый (<i>Agropyron elongate</i>)	Ацетон	>500
	БПЭ	>500
	Бутанол	>500
	Этилацетат	>500
Свербига восточная	БПЭ	>500
Солодка	БПЭ	>500
Таволга вязолистная (<i>Filipendula ulmaria</i>)	Ацетон	>500
	БПЭ	>500
	Бутанол	>500
	Гексан	>500
	Гексан	>500
	Этилацетат	>500
Тимофеевка	БПЭ	>500
Тутовник	БПЭ	430 ± 100
Укроп	БПЭ	>500
Чернушка посевная (<i>Nigella sativa</i>) (Йемен)	БПЭ	>500
Чернушка посевная (<i>Nigella sativa</i>) (Крым)	Ацетон	>500
	БПЭ	>500
	Бутанол	>500
Чернушка посевная (<i>Nigella sativa</i>) (Крым), обезжир.	БПЭ	150 ± 40
Чернушка посевная (<i>Nigella sativa</i>) (Турция)	БПЭ	>500

3.5. Фенотипический скрининг противовирусной активности ингибиторов репродукции тогавирусов

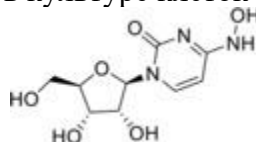
3.5.1. Отработка методики фенотипического скрининга против тогавирусов по подавлению вирус-индуцированного ЦПД

Штамм Nic ЧИКВ (GenBank ID MN271691-2) в 2018 г. был выделен из комаров *Aedes albopictus* в Типитапа, Никарагуа на культуре клеток C6/36 (5 пассажей) и был предоставлен д.м.н. Игнатьевым Г.М. для выполнения данной работы. Автором данной работы были проведены 3 дополнительных пассажа в культуре клеток Vero, в которой вирус давал устойчивое ЦПД на 3-5 сутки после заражения.

Ввиду того, что вирус давал чётко различимое ЦПД в культуре клеток Vero в достаточно короткий срок, при этом время появления и выраженность признаков ЦПД была прямо пропорциональная дозе заражения, реакция нейтрализация инфекционности (ЦПД) была выбрана как основа для методики фенотипического скрининга.

Разработанную методику оценки противовирусной активности апробировали с использованием ингибитора широкого спектра действия N⁴-гидроксицитидин (ННС), для которого ранее была показана активность в отношении подавления репродукции ЧИКВ в культуре клеток [Ehteshami et al., 2017]. В наших экспериментах ННС проявил высокую активность в ингибировании репродукции выбранного штамма ЧИКВ (доза 100-200 ТЦД₅₀) при оценке по появлению признаков ЦПД и расчёте ЕС₅₀ по методу Кербера (Таблица 26). Полученное значение ЕС₅₀ было на порядок выше заявленного в статье для инфекционного вируса, что может быть связано с разницей используемых методик. Более того, значения, полученные для ЧИКВ репликона в тех же работах, не отличались от полученных нами в эксперименте. Таким образом, выбранная методика подходит для оценки противовирусной активности химических соединений в отношении ЧИКВ *in vitro*.

Таблица 26 – Противовирусная активность N⁴-гидроксицитидина против ЧИКВ при оценке по подавлению образования признаков ЦПД в культуре клеток Vero



Источник данных	Ehteshami et al., 2017			Эксперимент
	клетки Huh-7 и репликон ЧИКВ	клетки ВНК-21 и репликон ЧИКВ	ЧИКВ урожай в клетках Vero	ЧИКВ ЦПД в клетках Vero
EC ₅₀ ± SD, мкМ	0,8 ± 0,1	1,8 ± 0,2	0,2 ± 0,1	5,9 ± 2,4
p* (тест Стьюдента)	0,087	0,149	0,064	—

* количество экспериментов считали равным 4

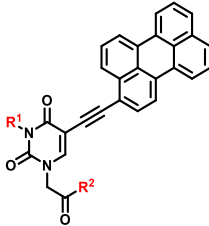
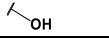
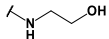
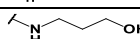
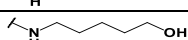
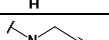
3.5.2. Сравнение методик фенотипического скрининга против тогавирусов по подавлению ЦПД и бляшкообразования

Сравнение методик проводили с использованием RAFI – производных периленовых нуклеотидов. Активность соединений сравнивали в одном эксперименте: готовили смеси ЧИКВ с последовательными разведениями ингибиторов, после чего смеси параллельно добавляли к клеткам Vero с последующей детекцией ЦПД и бляшек (Таблица 27). Эксперимент повторили 2 раза с 2 независимыми повторами внутри каждого эксперимента.

По результатам экспериментов доза заражения соответствовала допустимым 100-200 ТЦД₅₀ или 48-72 БОЕ, что достаточно для нормального расчёта EC₅₀ по формулам Кербера и Риды и Менча. При этом соотношение ТЦД₅₀ к БОЕ составило 2,74 ± 0,46.

Значения EC₅₀ для RAFI, полученные по ингибированию бляшкообразования, были в 2-8 раз ниже, чем значения, полученные по ингибированию ЦПД. Однако статистически достоверные отличия были получены только для 2 из 5 RAFI (cm6pUY11, cm7pUY11). Значения EC₅₀ для контрольного соединения ННС не различались (Таблица 27).

Таблица 27 – Активность производных периленовых нуклеотидов на репродукцию ЧИКВ (по подавлению ЦПД и бляшкообразования)

					
Шифр	R ¹	R ²	133-178 ТЦД ₅₀ , EC ₅₀ ± SEM, мкМ	48-72 БОЕ, EC ₅₀ ± SEM, мкМ	р* (тест Стьюдента)
cm1pUY11	POM		0,19 ± 0,08	0,072 ± 0,013	0,172
cm6pUY11			0,69 ± 0,19	0,087 ± 0,021	0,024**
cm7pUY11			0,48 ± 0,12	0,094 ± 0,012	0,023**
cm8pUY11			0,27 ± 0,07	0,087 ± 0,025	0,067
cm5pUY11			0,17 ± 0,05	0,080 ± 0,026	0,138
NHC			2.65 ± 0.72	2.23 ± 0.15	0.590

* количество экспериментов 4

**различия статистически значимы

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,0N – высокоактивно

0,N – активно

1-4 – низкоактивно

>4 – неактивно

3.5.3. Применение методики фенотипического скрининга по ингибированию тогавирус-индуцированного ЦПД или бляшкообразования

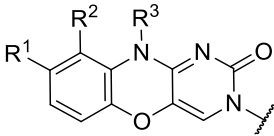
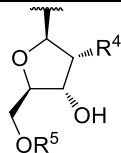
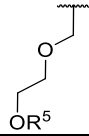
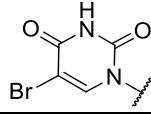
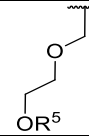
Был проведен фенотипический скрининг против ЧИКВ для двух серий периленовых RAFI, производных бенгальского розового, феноксазиновых нуклеозидов и растительных экстрактов. Данные исследования были выполнены автором данной работы и Колпаковой Е.С.

3.5.3.1. Феноксазиновые нуклеозиды

Мы оценили противовирусную активность серии 1,3-диаза-2-оксофеноксазиновых нуклеозидов с жирными C₈₋₁₀ алкоксизаместителями в ароматическом фрагменте, а также производных с ациклическим и карбоциклическим фрагментами. Экспериментальные исследования выполнены автором данной работы. Соединения **11a**, **11b**, **12b** и **12c** продемонстрировали

активность против ЧИКВ в тесте по подавлению бляшкообразования. При этом наибольшую активность проявило соединение **12c** с субмикромольным значением EC_{50} (Таблица 28). Токсичность соединений в клеточной линии Vero в большинстве случаев была незначительной [Kozlovskaya et al., 2021b].

Таблица 28 – Цитотоксичность и активность феноксазиновых нуклеозидов на репродукцию ЧИКВ (по подавлению бляшкообразования)

							
							
Шифр	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	ЧИКВ, $EC_{50} \pm SD$, мкМ	Vero, $CC_{50} \pm SD$, мкМ
11a	OC ₈ H ₁₇	H	H	H	H	2,5 ± 0,5	>100
11b	OC ₉ H ₁₉	H	H	H	H	7,4 ± 1,2	>100
12a	OC ₈ H ₁₇	H	CH ₃	H	H	24 ± 1	>100
12b	OC ₉ H ₁₉	H	CH ₃	H	H	6,3 ± 1,1	>100
12c	OC ₁₀ H ₂₁	H	CH ₃	H	H	0,71 ± 0,02	59 ± 2
12d	H	H	CH ₃	H	H	>50	>100
							
16a	H	H	H	–	H	28 ± 8	>100
17	H	H	CH ₃	–	H	15 ± 6	>100
19	H	H	H	–	DMTr	>50	>100
20	H	H	CH ₃	–	DMTr	6,1 ± 1,5	>100
							
							
13	–	–	–	–	H	>50	>100
14	–	–	–	–	Ac	>50	>100
18	–	–	–	–	DMTr	5,9 ± 1,4	>100

Графы окрашены пропорционально значению EC_{50} для соединений:

0–1 – высокоактивно

1–10 – активно

10–50 – низкоактивно

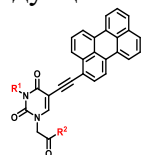
>50 – неактивно

3.5.3.2. Жёсткие амфипатические ингибиторы слияния (RAFI)

Поскольку показано, что RAFI на основе производных dUY11, являются высокоактивными ингибиторами оболочечных вирусов (раздел 3.3.3.1), то был проведён скрининг серии производных dUY11, замещённых по 1-му (N^1) и 3-му (N^3) положениям азотистого основания, по ингибированию ЧИКВ-индуцированного ЦПД (Таблица 29).

В отношении ЧИКВ все соединения за исключением **6f** и **7c** проявили ингибирующую активность со значениями EC_{50} менее 4 мкМ. Однако эти значения всё равно были на несколько порядков ниже, чем аналогичные значения против ВКЭ, что вероятно, объясняется различием методик определения – по подавлению ЧИКВ-индуцированного ЦПД и бляшкообразования ВКЭ, как показано выше в разделе 3.5.2. Влияние заместителя в положении N^1 в целом одинаково в обеих сериях. Метил в положении N^3 снижает влияние гидрофобного заместителя и повышает активность. Соединения с двумя гидроксильными группами (**6g**/cm3pUY11, **6h**/cm22pUY11) обладают заметно более высокой активностью. Наиболее гидрофильное соединение с тремя гидроксильными группами (**7c**/cm18pUY11b) было неактивно в исследованном диапазоне концентраций, а его Ром-замещённый аналог cm18pUY11 проявил самую низкую активность в серии. Большинство соединений не оказывали существенного цитотоксического действия на клетки Vero (Таблица 29) [Chistov et al., 2023].

Таблица 29 – Цитотоксичность и активность производных периленовых нуклеотидов на репродукцию ЧИКВ (по подавлению ЦПД)



Шифр	R^1	R^2	ЧИКВ, $EC_{50} \pm SD$, мкМ	Vero, $CC_{50} \pm SD$, мкМ
4 (cm0mUY11)	Me	—	$0,43 \pm 0,10$	>50
05 (cm1mUY11)			$0,11 \pm 0,03$	>50
6a (cm13mUY11)			$0,43 \pm 0,10$	>50
6b (cm2mUY11)			$0,38 \pm 0,18$	>50
6c (cm3mUY11)			$0,38 \pm 0,18$	>50
6d (cm4mUY11)			$0,88 \pm 0,75$	>50

Шифр	R ¹	R ²	ЧИКВ, EC ₅₀ ± SD, мкМ	Vero, CC ₅₀ ± SD, мкМ
6e (cm5mUY11)	Me		1,1 ± 0,7	>50
6f (cm6mUY11)			>4	>50
6g (cm12mUY11)			0,88 ± 0,75	>50
6h (cm11mUY11)			0,09 ± 0,04	>50
6i (cm7mUY11)			3,2 ± 0,7	>50
7b (cm9mUY11)			1,1 ± 0,5	>50
7c (cm10mUY11)			>4	>50
cm1pUY11	POM		0,24 ± 0,16	>50
cm4pUY11		—	1,35 ± 0,91	>50
cm6pUY11			1,1 ± 1,0	>50
cm7pUY11			0,13 ± 0,06	>50
cm2pUY11			0,19 ± 0,09	>50
cm8pUY11			0,17 ± 0,11	>50
cm9pUY11			2,5 ± 2,1	>50
cm3pUY11			0,15 ± 0,04	>50
cm22pUY11			0,09 ± 0,04	22,8 ± 7,3
cm5pUY11			0,88 ± 0,75	>50
cm16pUY11			2,3 ± 2,0	>50
cm17pUY11			1,5 ± 0,7	>50
cm18pUY11			3,0 ± 1,4	>50
UY11 ^b			1,1 ± 0,5	>50
aUY11 ^b			<0,8	>50

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,0N – высокоактивно

0,N – активно

1-4 – низкоактивно

>4 – неактивно

Несмотря на очень высокую и специфическую активность *in vitro*, RAFI не тестировались *in vivo*. Наиболее сложной проблемой является низкая растворимость в воде соединений на основе перилена. Поэтому нами была проанализирована серия новых производных с улучшенной растворимостью путём введения различных положительно заряженных заместителей (Таблица 30).

Все заряженные производные проявили сравнимую или более высокую активность против ЧИКВ по сравнению с положительным контролем (ННС) в

низких микромолярных-субмикромолярных концентрациях практически без признаков цитотоксичности (Таблица 30). В то же время некоторые незаряженные интермедиаты (**2b**, **6**) не проявляли активности в отношении ЧИКВ. В частности, замена этильного линкера между периленилтриазолильным и морфолиновым остатками на пропильный приводила к полной потере активности в отношении ЧИКВ, но соответствующее N-метилованное производное **3b** уже обладало активностью в отношении этого вируса. Между тем, удаление силоксановой 5',3'-О-защитной группы восстановило активность **7**, что свидетельствует о важности сохранения липофильного периленового остатка и полярных, в нашем случае гидроксильных, групп для максимальной активности [Shtro et al., 2022].

Таблица 30 – Цитотоксичность и активность производных периленовых нуклеотидов с заряженными заместителями на репродукцию ЧИКВ (по подавлению ЦПД)

Структура	Шифр	ЧИКВ, EC ₅₀ ± SD, мкМ	Vero, CC ₅₀ ± SD, мкМ
	2a	0,47 ± 0,16	>100
	2b	>100	>100
	3a	11 ± 9	>100
	3b	11 ± 3	>100
	5	1,2 ± 0,6	>100
	6	>100	>100
	7	<0,02	98 ± 17
	8	0,55 ± 0,33	>100
	10	0,99 ± 0,15	>100
	Контроль (NHC)	9,7 ± 2,8	>100

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,0N – высокоактивно

0,N – активно

1-20 – низкоактивно

>100 – неактивно

3.5.3.3. Производные Бенгальского розового

Фотосенсибилизирующие противовирусные препараты являются многообещающим классом кандидатов в лекарства против оболочечных вирусов

[Mariewskaya et al., 2021]. Соединения, отличающиеся по структуре и спектральным свойствам, могут избирательно влиять на вирусные оболочки, ингибировать слияние вирусов с клеткой или даже влиять на целостность вирионов в наномолярных концентрациях без значительной цитотоксичности [Kunstek et al., 2022]. В качестве механизма действия этих соединений в настоящее время предполагается модификация фосфолипидов в липидной мембране вириона посредством синглетного кислорода $^1\text{O}_2$, продуцируемого соединениями под воздействием света [Vigant et al., 2013, 2014].

Бенгальский розовый — анионный ксантеновый краситель, производное флуоресцеина, продемонстрировавший активность при освещении в отношении ВПГ-1, вирусов Сендай, гриппа, иммунодефицита человека и везикулярного стоматита [Roat et al., 1987; Brooks et al., 1994; Lenard et al., 1993]. Медицинское применение Бенгальского розового в основном ограничено его коротким периодом полувыведения, поэтому были разработаны различные системы доставки. Бенгальский розовый нашел широкое применение в сонофотодинамической терапии, действуя преимущественно через фотореакцию 2-го типа – генерацию $^1\text{O}_2$ [Demartis et al., 2021]. Создание производных предоставляет широкий спектр возможностей для оптимизации его биологических свойств, тем не менее, для серий производных красителя, в основном, оценивали активность против бактерий [Tegos, Hamblin, 2006; Ferreira et al., 2013] и раковых клеток [Chen et al., 2018].

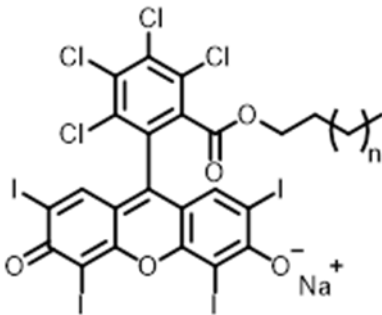
Мы провели скрининг ряда производных бенгальского розового с различными гидрофобными н-алкильными заместителями против нескольких оболочечных вирусов, результаты по которым представлены в соответствующих разделах.

Противовирусную активность синтезированных производных бенгальского розового **2a-e** в отношении ЧИКВ оценивали по ингибированию ЦПД в клетках Vero, и ННС использовали в качестве положительного контроля (Таблица 31).

Все производные проявили активность по подавлению ЦПД, вызванного ЧИКВ, при этом значения EC_{50} были на 3-4 порядка выше положительного контроля ННС и сопоставимы с активностью RAFI против ВКЭ. Наиболее

активные производные **2b** и **2c** с н-гексильным (C₆) и н-октильным (C₈) заместителями соответственно продемонстрировали активность в субнанолярных концентрациях и на два порядка более высокую эффективность ингибирования репродукции ЧИКВ по сравнению с исходным красителем. Несмотря на наличие некоторой цитотоксичности в микролярном диапазоне для клеток Vero, высокие эффективные концентрации обеспечивают значительный SI (например, около 230000 для **2c**), что делает эти производные бенгальского розового перспективными, если не в качестве противовирусных средств, то в качестве инактивирующих агентов при разработке вакцин против лихорадки Чикунгунья [Rubekina et al., 2022].

Таблица 31 – Цитотоксичность и активность производных бенгальского розового на репродукцию ЧИКВ (по подавлению ЦПД)

Структура	Шифр	ЧИКВ, EC ₅₀ ± SD, мкМ	Vero, CC ₅₀ ± SD, мкМ
 n = 1 (2a); 3 (2b); 5 (2c); 7 (2d); 9 (2e)	1	0,11 ± 0,05	43 ± 10
	2a	0,004 ± 0,002	8 ± 1
	2b	0,0007 ± 0,0003	60 ± 15
	2c	0,0002 ± 0,0001	53 ± 25
	2d	0,002 ± 0,001	60 ± 15
	2e	0,038 ± 0,030	> 100
	Контроль (ННС)	23,6 ± 10,2	> 100

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,000N – очень высокоактивно

0,00N – высокоактивно

0,0N – активно

0,N – низкоактивно

3.5.3.4. Растительные экстракты

Было проведено исследование ингибиторной активности 64 экстрактов растительного происхождения на репродукцию ЧИКВ по подавлению признаков ЦПД в культуре клеток Vero (Таблица 32). Наибольшую активность проявили экстракты коры дуба, семян одуванчика, папоротника-орляка и таволги вязолистной. При этом, за исключение водного экстракта коры дуба, активность проявляли экстракты, приготовленные экстракцией органическими

растворителями, что указывает на органическое происхождение активных молекул. В то же время белково-пептидные экстракты либо не проявили активности, либо она была на очень низком уровне.

Таблица 32 – Цитотоксичность и активность растительных экстрактов на репродукцию ЧИКВ (по подавлению ЦПД)

Растение	Характер образца	EC ₅₀ ± SD, мкг/мл
Адамов корень (<i>Dioscorea communis</i>)	Ацетон	8,8 ± 5,0
	Бутанол	30 ± 7
	Этилацетат	>500
Амарант	БПЭ	600 ± 140
Амброзия (<i>Ambrosia</i> sp.)	Ацетон	>500
	БПЭ	>500
	Бутанол	>500
	Гексан	16 ± 9
	Этилацетат	16 ± 10
Борщевик (<i>Heracleum sphondylium</i>)	Ацетон	4,4 ± 3,7
	БПЭ	>500
	Бутанол	6,0 ± 5,6
Дуб (<i>Quercus robur</i> cortex)	Водный экстракт 3-4%	5,3 ± 7,6
	Водный экстракт 10%	0,40 ± 0,10
	Водный экстракт 50%	0,50 ± 0,30
	Бутанол	1,10 ± 0,50
	Этилацетат	13 ± 11
Ежа сборная (<i>Dactylis glomerata</i>)	Ацетон	210 ± 50
	БПЭ	>500
	Бутанол	52 ± 18
	Гексан	17 ± 16
	Этилацетат	69 ± 32
Ежовник	БПЭ	>500
Канатник	БПЭ	>500
Колосняк (<i>Leymus arenarius</i>)	Ацетон	34 ± 31
	БПЭ	>500
	Бутанол	11 ± 1
	Этилацетат	57 ± 37
Мальва	БПЭ	>500
Марь (<i>Chenopodium acerifolium</i>)	Ацетон	2,6 ± 1,2
	БПЭ	13 ± 6
	Бутанол	>500
	Этилацетат	0,7 ± 0,2
Мокрица	БПЭ	>500
Одуванчик (<i>Araxacum officinále</i>), семена	Ацетон	35 ± 15
	БПЭ	>500
	Бутанол	11 ± 3
	Гексан	9 ± 14
	Этилацетат	<1,6
Одуванчик, (<i>Araxacum officinále</i>), цветки	БПЭ	>500

Растение	Характер образца	EC ₅₀ ± SD, мкг/мл
Папоротник орляк (<i>Pteridium aquilinum</i>)	Ацетон	1,6 ± 1,2
	БПЭ	2,6 ± 1,2
	Бутанол	0,2 ± 0,9
	Этилацетат	0,3 ± 0,1
Пырей удлиненный (<i>Agropyron elongate</i>)	Ацетон	>500
	БПЭ	>500
	Бутанол	25 ± 22
	Этилацетат	45 ± 48
Свербига восточная	БПЭ	>500
Солодка	БПЭ	>500
Таволга вязолистная (<i>Filipendula ulmaria</i>)	Ацетон	1,3 ± 0,4
	БПЭ	100 ± 50
	Бутанол	14 ± 7
	Гексан	11 ± 2
	Гексан	2,2 ± 1,5
	Этилацетат	19 ± 10
Тимофеевка	БПЭ	>500
Тутовник	БПЭ	>500
Укроп	БПЭ	>500
Чернушка посевная (<i>Nigella sativa</i>) (Йемен)	БПЭ	>500
Чернушка посевная (<i>Nigella sativa</i>) (Крым)	БПЭ	>500
	Бутанол	>500
Чернушка посевная (<i>Nigella sativa</i>) (Крым), обезжир.	БПЭ	>500
Чернушка посевная (<i>Nigella sativa</i>) (Турция)	БПЭ	>500
N ⁴ -hydroxycytidine (NHC)	ДМСО	5,9 ± 2,4

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0–10 – высокоактивно

10–20 – активно

20–50 – низкоактивно

>50 – неактивно

3.6. Фенотипический скрининг противовирусной активности ингибиторов репродукции лентивирусов

3.6.1. Отработка методики фенотипического скрининга против лентивирусов по подавлению вирус-индуцированного ЦПД

Для разработки методики фенотипического скрининга использовали штамм вируса иммунодефицита человека типа 1, полученный путём трансфекции из вектора pNL4-3 (NIBSC). Это рекомбинантный (инфекционный) провирусный

клон, который содержит ДНК изолятов ВИЧ-1 NY5 (5'-конец) и BRU (3'-конец). В качестве тест-культуры использовали перевиваемую суспензионную Т-лимфобластоидную линию клеток МТ-4. В этих клетках удалось получить устойчивое, визуально различимое ЦПД на 7-10 сутки после инфицирования.

Методика основана на ранее разработанном протоколе тестирования препаратов против энтеровирусов: по ингибированию вирус-индуцированного ЦПД (50-200 ТЦД₅₀ шт. NL4-3) в суспензии клеток МТ-4 (300 тыс. кл/лунку) с визуальной детекцией в световой микроскоп на 8-10 сутки.

Методика была апробирована с использованием зидовудина (азидотимидин, AZT), являющийся первым зарегистрированным лекарством от ВИЧ-инфекции, эффективным, но очень токсичным препаратом (Таблица 33). По литературным данным значения ЕС₅₀ для AZT в тесте с инфекционным вирусом в культуре клеток МТ-4 составляла 4-66 нМ. В рамках нашей постановки активность составила 7,1 нМ, что соответствует данному диапазону значений. Таким образом, данную методику можно использовать далее для проведения фенотипического скрининга.

Таблица 33 – Противовирусная активность азидотимидина (AZT) против ВИЧ-1 при оценке по подавлению образования признаков ЦПД в культуре клеток МТ-4

Источник данных	NL4-3, ЕС ₅₀ ± SD, мкМ	МТ-4, СС ₅₀ , мкМ
Эксперимент	0,0071 ± 0,0043	8,0 ± 1,5
Melroy, Nair, 2005	0,004	—*
Li et al., 2012	0,004	>93
Hitchcock, 1993	0,066	—

*— нет данных

3.6.2. Применение методики фенотипического скрининга по подавлению лентивирус-индуцированного ЦПД

Эксперименты выполнены Шустовой Е.Ю., Яковчук Е.В. и Бородулиной М.О. с участием и под руководством автора данной работы.

3.6.2.1. Синтетические аналоги хромофора GFP

G-квадруплексы (G4s) представляют собой вторичные структуры, образованные богатыми гуанином участками нуклеиновых кислот. В полинуклеотидах, сложенных квадруплексом, четыре гуаниновых основания одной или разных цепей образуют плоскую структуру, стабилизированную водородными связями Хугстина [Andreeva et al., 2021]. Среди наиболее привлекательных мишеней для подавления репродукции вируса является структура G4, образующаяся в промоторе 5'-LTR-III провируса ВИЧ (Рисунок 30), что имеет решающее значение для эффективного прохождения вирусного цикла [Perrone et al., 2015]. Лиганды G4 представляют собой низкомолекулярные соединения, которые способны специфически связываться с квадруплексом и модулировать его термическую стабильность. Это взаимодействие может привести к нарушению регуляции репликации, трансляции или транскрипции, поэтому может быть использовано для дизайна лекарств [Spiegel et al., 2020].

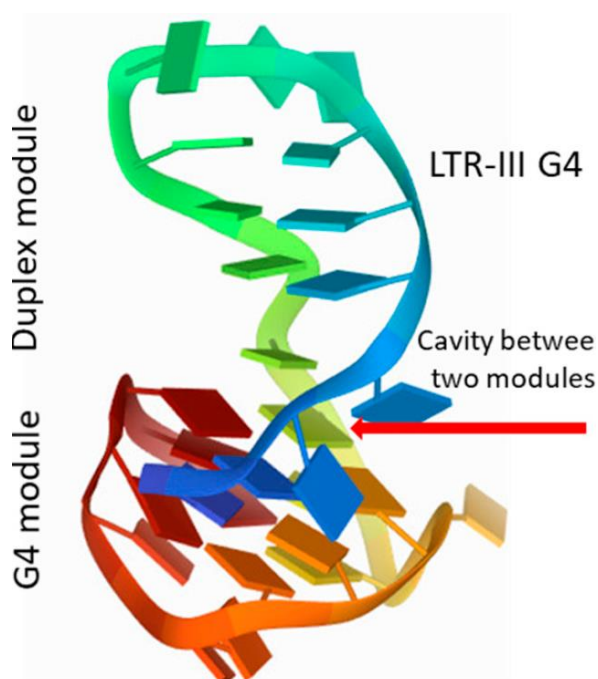
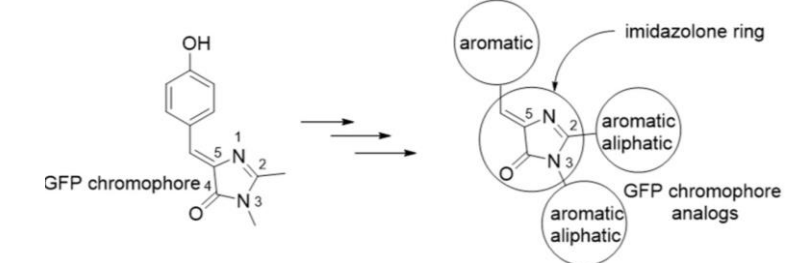


Рисунок 30 – Структура ВИЧ-1 LTR-III G4 (PDB 6H1K) [Ryazantsev et al., 2021]

Мы провели скрининг хромофора GFP и его синтетических аналогов в качестве лигандов для ВИЧ-1 LTR-III G4 как потенциальных ингибиторов репродукции ВИЧ (Таблица 34). При этом в отдельных молекулярно-

биологических экспериментах оценивалась способность соединений стабилизировать тестовую G4-структуру по увеличению температуры плавления.

Таблица 34 – Цитотоксичность и активность синтетических аналогов хромофора GFP на репродукцию ВИЧ (по подавлению ЦПД)

			
Шифр	↑Тпл.	ВИЧ-1, EC ₅₀ ± SD, мкМ	MT-4, CC ₅₀ ± SD, мкМ
N1193	>3°C	n/a*	2±1
N1196		n/a	>25
N1197		n/a	1,7 ± 0,8
ZS260.1		3,8 ± 0,9	4,1 ± 0,6
N1068		1,8 ± 0,4	3,0 ± 1,0
N1198		1,8 ± 0,4	3,0 ± 1,0
N960a		n/a	>25
N1052		n/a	7 ± 3
N1199		3,0 ± 1,0	5 ± 3
N1195		3,8 ± 0,9	6 ± 3
ZS331		n/a	1,2 ± 0,6
N848.3		n/a	6±2
N848.2		n/a	6±2
N683.1		n/a	>25
ccE4	1-2°C	n/a	>25
N1069		4,0 ± 2,0	6 ± 2
M903.2		n/a	>25
N1122		n/a	>25
N1049		2,0 ± 1,0	5 ± 3
M813		n/a	0,5 ± 0,2
AR559		n/a	>25
N906	<1°C	n/a	7 ± 3
SA120		n/a	>25
N840		n/a	>25
MID161		8,0 ± 2,0	17 ± 5
M802		n/a	7 ± 3
M2227		n/a	>25

*n/a – неактивно в нетоксичных концентрациях

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0–1 – высокоактивно

1–10 – активно

10–50 – низкоактивно

>50 – неактивно

Большинство соединений были очень токсичны для клеток МТ-4 ($CC_{50} < 10$ мкМ). Ни одно из 10 нетоксичных соединений ($CC_{50} > 25$ мкМ) не ингибировало репродукцию ВИЧ в клетках МТ-4. LTR-стабилизирующие соединения ZS260.1, N1068 и N1198 проявили неплохую ингибирующую активность с EC_{50} в микромолярном диапазоне, которая сопровождалась значительной цитотоксичностью. Цитотоксичность в основном увеличивалась с увеличением стабилизации LTR G4 и коррелировала с ингибирующей активностью, что указывает на то, что механизмы активности и цитотоксичности сходны, и соединения могут иметь аналогичные мишени в геномах вирусов и человека [Ryazantsev et al., 2021].

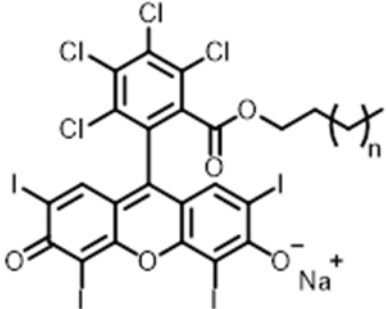
3.6.2.2. Производные Бенгальского розового

Как уже описывалось выше (раздел 3.5.3.3), фотосенсибилизирующие препараты являются многообещающим классом фармакологических веществ против оболочечных вирусов за их способность специфически ингибировать процесс слияния мембран за счёт модификации фосфолипидов и разрушения связей в оболочке вириона за счёт синглетного кислорода 1O_2 , который выделяется фотосенсибилизатором под воздействием света [Mariewskaya et al., 2021; Vigant et al., 2013, 2014]. Одно из таких соединений бенгальский розовый [Demartis et al., 2021].

Мы провели скрининг ряда производных бенгальского розового с различными гидрофобными н-алкильными цепями против нескольких оболочечных вирусов, включая шт. NL4-3 ВИЧ-1 (Таблица 35).

Все испытанные соединения проявляли активность в отношении ВИЧ-1 с микромолярными значениями EC_{50} , однако они были всего в 2-5 раз меньше значений цитотоксичности (CC_{50}) для клеток МТ-4, и значительно ниже, чем контрольный препарат AZT. Бенгальский розовый проявил гораздо более низкую активность в отношении ВИЧ, чем сообщалось ранее [Lenard et al., 1993], что, по-видимому, связано с отсутствием предварительного освещения перед обработкой клеток [Rubeikina et al., 2022].

Таблица 35 – Цитотоксичность и активность производных бенгальского розового на репродукцию ВИЧ (по подавлению ЦПД)

Структура	Шифр	ВИЧ-1, EC ₅₀ ± SD, мкМ	MT-4, CC ₅₀ ± SD, мкМ
 n = 1 (2a); 3 (2b); 5 (2c); 7 (2d); 9 (2e)	1	18 ± 7	>50
	2a	6,3 ± 2,6	15 ± 4
	2b	4,4 ± 1,8	15 ± 4
	2c	8,8 ± 3,7	42 ± 10
	2d	8,8 ± 2,6	42 ± 10
	2e	>50	>50
	Контроль (AZT)	0,01	>5

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0–1 – высокоактивно

1–10 – активно

10–50 – низкоактивно

>50 – неактивно

3.7. Фенотипический скрининг противовирусной активности ингибиторов репродукции коронавирусов

3.7.1. Выделение штамма SARS-CoV-2 и отработка условий размножения вируса в культуре клеток Vero

После объявления пандемии COVID-19 [WHO, 2020] резко возросла необходимость поиска противовирусных стратегий против SARS-CoV-2. Для этого сначала было необходимо выделить и охарактеризовать вирус, а также отработать методику его наращивания в культуре клеток.

ПЦР-положительные образцы мазков из носоглотки пациентов, поступивших в стационары г. Москвы с лихорадкой (38-39°C) и кашлем, высевали на клетки Vero. Признаки ЦПД наблюдались с 3-го дня после заражения в некоторых культурах (11/39) (Таблица 36). Суспензию культуры собирали на 6-7-й день после инфицирования; некоторые из них были непригодны для работы из-за бактериальной или грибковой контаминации (12/39). ЦПД-отрицательные культуры использовали для слепого пассажа, и все они вызвали признаки ЦПД во

втором пассаже (16/16). Суспензии заражённых клеток исследовали на наличие вирусной РНК SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР [Kozlovskaya et al., 2020].

Выделение и характеристика штаммов SARS-CoV-2 выполнена автором данной работы.

Таблица 36 – Выделяемость вируса SARS-CoV-2 из ПЦР-положительных проб орофарингеальных мазков при пассировании в культуре клеток Vero

Мазки	I пассаж	II пассаж	Контаминация (бактерии, грибы)
39	11	16	12

Две суспензии положительных культур с самыми высокими значениями $C(t)$ – штаммы 25 и ПИК35 использовали для высокопроизводительного секвенирования (HTS). Последовательности были отправлены в базу данных GISAID как EPI_ISL_428851-2. Описание клинических случаев (Таблица 37) сходно. Оба пациента поступили в больницу 1 апреля 2020 г. В обоих случаях компьютерная томография (КТ) выявила полисегментарную пневмонию. Первый пациент с лёгкими симптомами был выписан на амбулаторное лечение; второй пациент был госпитализирован, переведён в отделение интенсивной терапии на 6-7 сутки и выписан через 15 дней с отрицательными мазками из носоглотки и выздоровлением [Kozlovskaya et al., 2020].

Таблица 37 – Клинические особенности случаев COVID-19, от которых были выделены штаммы SARS-CoV-2

Штамм	Пол	Возраст, лет	Дата начала забол-я	Первичные симптомы	Обращение в больницу	Симптомы при обращении	КТ	Лечение
25	Ж	42	30 марта	Слабость, сухой кашель, Т до 38°C	1 апреля	Слабость, сухой кашель, Т до 36,2°C	Билатеральная полисегментарная пневмония	Лечение на дому, Плаквенил, азитромицин
ПИК35	М	44	19 марта	Боль в горле, сухой кашель, Т до 39°C	1 апреля	Сухой кашель, Т до 38,5°C	Полисегментарная пневмония, множественные поражения, инфильтраты	Госпитализирован

Выделенные штаммы SARS-CoV-2 (25 и ПИК35) содержали по восемь нуклеотидных замен по сравнению с исходным Уханьским штаммом (GenBank NC_045512): по 7 общих и по 1 уникальной без каких-либо дополнительных гетерогенных позиций или делеций/вставок. Пять из семи общих нуклеотидных мутаций в области, кодирующей белок, привели к четырем аминокислотным заменам (Таблица 38). Оба варианта обладали мутацией D614G в белке шипа S и относились к прототипной линии B.1.1. [Kozlovskaya et al., 2020].

Штамм ПИК35 был выбран для дальнейшего пассирования и разработки методик оценки нейтрализующей активности антител и противовирусной активности соединений. Всего штамм прошёл 5 пассажей в культуре клеток Vero и давал чёткое ЦПД на 5 сутки после заражения.

Таблица 38 – Нуклеотидные и аминокислотные мутации в геномах вариантов SARS-CoV-2, описанных в этом исследовании, по сравнению с вариантом Wuhan (GenBank NC_045512.2)

Участок генома	Белок	НТ позиция	NC_045512.2	Шт. 25 EPI_ISL_428851		Шт. ПИК35 EPI_ISL_428852	
			нт	нт	ак	нт	ак
5'НТР	—	241	C	T	N/A	T	N/A
OPC1ab	nsp3 (PL ^{Pro})	3037	C	T	Phe ₉₂₄	T	Phe ₉₂₄
		3373	C	A	Asp ₁₀₃₆ →Glu	C	—
	nsp5 (3CL ^{Pro})	10969	C	C	—	T	Phe ₃₅₆₈
	Nsp12 (RdRp)	14408	C	T	Pro ₄₇₀₄ →Leu	T	Pro ₄₇₀₄ →Leu
OPC2	S	23403	A	G	Asp ₆₁₄ →Gly	G	Asp ₆₁₄ →Gly
OPC9a	N	28881	G	A	Arg ₂₀₃ →Lys	A	Arg ₂₀₃ →Lys
		28882	G	A		A	
		28883	G	C	Gly ₂₀₄ →Arg	C	Gly ₂₀₄ →Arg

3.7.2. Отработка методики постановки реакции нейтрализации и фенотипического скрининга против коронавирусов по подавлению вирус-индуцированного ЦПД

Ввиду того, что вирус давал устойчивое чётко различимое ЦПД в культуре клеток Vero в достаточно короткий срок, при этом время и выраженность признаков ЦПД была прямо пропорциональная дозе заражения, реакция нейтрализация инфекционности (ЦПД) была выбрана как основа для методик

оценки нейтрализующей активности антител и фенотипического скрининга. Для отработки специфичности использовали сыворотки четырех разных групп [Игнатъев и др., 2022]. Работа выполнена автором данной работы при участии Волока В.П.

- Группа 1. 30 сывороток. Сыворотки собраны в 2016-2017 гг. от лиц в возрасте 20-60 лет в рамках Национальной программы серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики;
- Группа 2. 23 сыворотки. Сыворотки получены до мая 2019 года от лиц с лабораторно подтвержденным диагнозом острая респираторная вирусная инфекция (ОРВИ). Из них, респираторно-синтициальный вирус (РСВ) – 3, риновирусы – 12, аденовирусы – 1, метапневмовирус – 2, вирусы парагриппа – 2 (1 типа, 4 типа), коронавирусы (сезонные) – 3, из них 2 (E229), 1 (OC43). Лабораторное подтверждение этиологического агента ОРВИ проводили в клиническом материале методом ПЦР с использованием «АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL» (кат. номер R-V57);
- Группа 3. 10 сывороток. Сыворотки вакцинированных людей, содержащие антитела к вирусу гриппа по результатам РТГА со штаммами вируса гриппа типа А (H1N1, H3N2) и типа В (штаммы линий Виктория и Ямагата);
- Группа 4. Всего 126 сывороток от 63 пациентов (по 2 сыворотки на пациента). Сыворотки от пациентов с диагнозом коронавирусная инфекция COVID-19. Все больные находились в условиях стационарного лечения. Диагноз «коронавирусная инфекция» был поставлен клинически на основе результатов КТ. Также у всех больных был хотя бы один положительный результат носоглоточных смывов по данным ОТ-ПЦР. Сыворотки были получены от больных в динамике лечения: первая сыворотка – на 1-2 сутки после госпитализации, вторая сыворотка – через 4-9 суток после получения первой сыворотки (интервал между отбором сывороток составил $6,11 \pm 0,10$ дней).

Письменное информированное согласие было получено от всех субъектов или их законных представителей в клинических учреждениях, которые проводили сбор и первичную обработку сывороток.

Сыворотки групп 1-3 не ингибировали развитие SARS-CoV-2-индуцированного ЦПД в культуре клеток Vero (титр антител менее детектируемого, $<1:8$) (Таблица 39). Из первых 63 сывороток (сыворотка «1») было выявлено 38, обладающих вируснейтрализующей активностью. При исследовании вторых сывороток (сыворотка «2»), взятых спустя 4-9 суток после первых, показано что все сыворотки обладали вируснейтрализующей активностью (Рисунок 31). При этом средний геометрический титр (СГТ) нейтрализующих антител в сыворотках пациентов с COVID-19 ($M \pm SD, \log_2$) увеличился: с $2,90 \pm 2,67$ до $7,10 \pm 1,82$ [Игнатъев и др., 2022].

Таблица 39 – Результаты выявления антител в сыворотках пациентов с COVID-19

Характеристика антител	Сыворотка «1»		Сыворотка «2»	
	Количество положительных		Количество положительных	
	abs.	%	abs.	%
Положительные в РН	38	60,3	63	100
Всего	63		63	

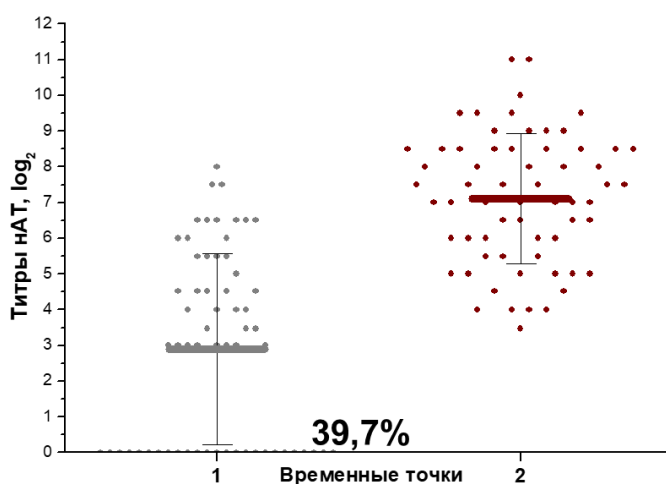


Рисунок 31 – Титры нейтрализующих антител к штамму ПИК35 вируса SARS-CoV-2 в сыворотках больных COVID-19 в динамике наблюдения. Доля негативных сывороток на момент первого взятия крови указана цифрой на графике.

Таким образом, показана специфичность реакции нейтрализации инфекционности шт. ПИК35 SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero, детектируемая по подавлению вирус-индуцированного ЦПД [Kozlovskaya et al., 2021a].

Далее на основе реакции нейтрализации была разработана методика для тестирования соединений в виде 5-10 мМ растворов в ДМСО. Методика была апробирована на N⁴-гидроксицитидине (NHC) – производном нуклеозида с широким спектром противовирусной активности (Таблица 40). В нашей системе NHC эффективно ингибировал репродукцию SARS-CoV-2, подавляя появление признаков вирус-индуцированного ЦПД. Значение EC₅₀ находилось в микромолярном диапазоне, что характеризует соединение как высокоэффективное, несмотря на 10-кратное превышение концентрации, описанной в литературе. Это различие объяснимо использованием разных штаммов: в работе использован ранний штамм, очень близкий к исходному штамму Ухань; ПИК35 – более поздний штамм, активно циркулировавший в человеческой популяции с адаптивной заменой D614G белке – и разной схемы постановки эксперимента.

Таблица 40 – Противовирусная активность N⁴-гидроксицитидине (NHC) против SARS-CoV-2 при оценке по подавлению образования признаков ЦПД в культуре клеток Vero

Источник данных	EC ₅₀ ± SD, мкМ	CC ₅₀ , мкМ	Примечание
Эксперимент	7,4 ± 3,6 (шт. ПИК35)	>100 (клетки Vero)	Детекция по ЦПД визуально на 5 сутки после заражения 0,002 MOI
Sheahan et al., 2020	0,30 (шт. USA-WA1/2020)	>10 (клетки Vero E6)	Детекция ЦПД по жизнеспособности клеток (резазурина) на 48 ч после заражения MOI 0.05

Таким образом, показана специфичность и применимость методики фенотипического скрининга противовирусной активности соединений в культуре клеток в отношении SARS-CoV-2 по подавлению вирус-индуцированного ЦПД.

3.7.3. Сравнение методики фенотипической оценки противовирусной активности по снижению урожая SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero и в псевдовирусной системе

Разработанная методика была модернизирована для выявления минимальных различий в ингибирующей активности между разведениями соединений. Для этого, клетки Vero заражали вирусом после инкубации с соединением, и по прохождении 1 вирусного репликативного цикла (около 24 ч) культуральную жидкость собирали и определяли в ней урожай вируса титрованием по ЦПД в клетках Vero. Результаты представляли как процент ингибирования накопления урожая вируса по сравнению с отрицательным контролем без добавления соединения. В качестве положительного контроля использовали стандартную сыворотку мышей, вакцинированных коронавирусной вакциной. В работе оценивали способность пептида P1 (STIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQSSLASWNY) и его сшитого варианта P1st (STIEEQAKTXLDKXNHEAEDLFYQXSLAXWNY; X – (S)-2-(4-pentenyl)alanine – сшивающий агент) ингибировать репродукцию SARS-CoV-2 шт. ПИК35. Эксперимент проведён автором данной работы.

Сшитый пептид P1st дозозависимо снижал титр урожая вируса (Рисунок 32А), в то время как несшитый пептид P1 почти не ингибировал размножение вируса. Сыворотка иммунизированной мыши ингибировала размножение со 100% эффективностью (данные не приведены). Зависимость ингибирования урожая вируса пептидом P1st позволило рассчитать EC_{50} , которое составило 7 мкМ [Astrakhantseva et al., 2023].

В параллельных экспериментах Астраханцевой И.В. оценивали способность данных пептидов ингибировать проникновение псевдовирусных частиц, несущих тримеры белка S SARS-CoV-2 и ген GFP, в клетки HEK-293T, экспрессирующие рецептор ACE2. Сшитый пептид P1st также дозозависимо ингибировал доставку и экспрессию гена GFP в клетках, а несшитый вариант – не ингибировал (Рисунок 32Б). EC_{50} для пептида P1st составило 25 мкМ [Astrakhantseva et al., 2023].

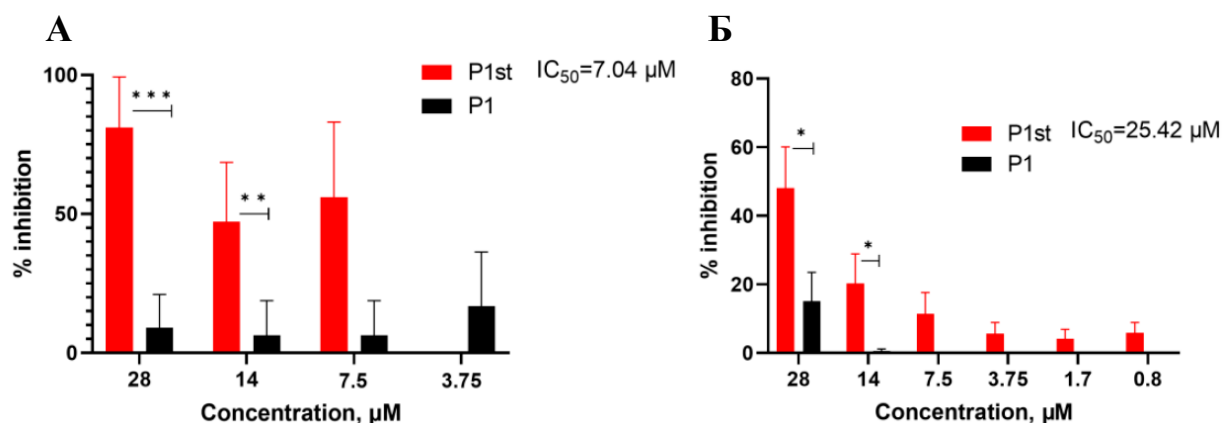


Рисунок 32 – Влияние сшитого (P1st) и несшитого (P1) пептида на инфекцию SARS-CoV-2 *in vitro* (А) и проникновение псевдовиральных частиц (Б). Представлены данные трёх независимых экспериментов; данные анализировали с помощью множественного непарного критерия Стьюдента, * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$.

Несмотря на различия значений EC_{50} , полученные в инфекционной и неинфекционной системах, разброс данных внутри экспериментов не выявил достоверных различий между средними значениями активности ($p = 0,255$, критерий Стьюдента).

3.7.4. Применение методики фенотипического скрининга по подавлению коронавируса-индуцированного ЦПД

Разработанная методика (раздел 3.7.2) была использована для оценки противовирусной активности соединений разных химических классов и отличающихся по предполагаемому механизму действия: производные и аналоги нуклеозидов, гетероциклические соединения, RAFI, пептиды и растительные экстракты.

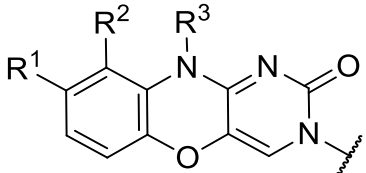
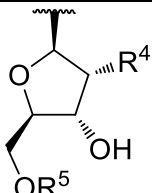
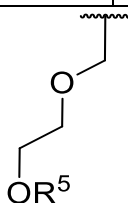
Работы выполнены автором данной работы при участии Волока В.П. и Шустовой Е.Ю.

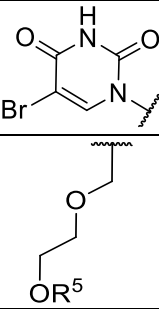
3.7.4.1. Феноксазиновые нуклеозиды

Феноксазиновые нуклеозиды могут служить универсальными противовирусными средствами, действующими на репликацию вирусов. Две серии нуклеозидов, ранее проанализированные нами на активность против РНК-

содержащих вирусов (раздел 3.3.3.3 и 3.5.3.1), были проанализированы на способность ингибировать репродукцию SARS-CoV-2 (Таблица 41).

Таблица 41 – Цитотоксичность и активность феноксазиновых нуклеозидов на репродукцию SARS-CoV-2 (по подавлению ЦПД)

							
							
Шифр	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	SARS-CoV-2, EC ₅₀ ± SD, мкМ	Vero, CC ₅₀ ± SD, мкМ
7a	H	H	H	H	H	n/a*	>100
7b	H	H	H	H	DMTr	n/a	13,4 ± 6,3
11a	OC ₈ H ₁₇	H	H	H	H	n/a	>100
11b	OC ₉ H ₁₉	H	H	H	H	n/a	>100
12a	OC ₈ H ₁₇	H	CH ₃	H	H	n/a	>100
12b	OC ₉ H ₁₉	H	CH ₃	H	H	n/a	>100
12c	OC ₁₀ H ₂₁	H	CH ₃	H	H	n/a	59 ± 2
12d	H	H	CH ₃	H	H	n/a	>100
25	H	H	H	OH	H	n/a	>100
26	H	H	H	OCH ₃	H	n/a	>100
27	H	H	H	OH	DMTr	11,5 ± 3,7	15,9 ± 2,5
28	H	H	H	OCH ₃	DMTr	12,4 ± 7,5	26,5 ± 2,5
29	H	OCH ₂ CH ₂ NH ₂	H	H	H	1,12 ± 0,03	1,81 ± 0,56
30	H	OCH ₂ CH ₂ NH ₂	H	OH	H	2,52 ± 0,44	2,92 ± 2,13
31	H	OCH ₂ CH ₂ NH ₂	H	H	DMTr	n/a	>100
32	H	OCH ₂ CH ₂ NH ₂	H	OH	DMTr	n/a	>100
33	H	H	CH ₂ (O)NH ₂	H	H	n/a	>100
34	H	H	CH ₂ (O)NH ₂	H	DMTr	n/a	85 ± 21
							
16a	H	H	H	–	H	n/a	>100
16b	OC ₉ H ₁₉	H	H	–	H	n/a	>100
17	H	H	CH ₃	–	H	n/a	>100
19	H	H	H	–	DMTr	n/a	>100
20	H	H	CH ₃	–	DMTr	n/a	>100

							
Шифр	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	SARS-CoV-2, EC ₅₀ ± SD, мкМ	Vero, CC ₅₀ ± SD, мкМ
13	—	—	—	—	H	n/a	>100
14	—	—	—	—	Ac	n/a	>100
18	—	—	—	—	DMTr	n/a	>100

* n/a – неактивно в нетоксичных концентрациях

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0–10 – высокоактивно

10–20 – активно

20–50 – низкоактивно

>50 – неактивно

Феноксазиновые нуклеозиды из серий **11-14**, **16-20** и **23** не проявили заметного ингибирования репродукции SARS-CoV-2 (Таблица 41). Только соединения **27-30** продемонстрировали значимое ингибирование репродукции SARS-CoV-2 со значениями EC₅₀ в микромолярном диапазоне. Активность сопровождалась достаточно выраженной цитотоксичностью в отношении клеток Vero. Аналоги 2-аминоэтоксилированных феноксазиновых нуклеозидов **29** и **30** были более активными, хотя и более токсичными с индексами селективности лишь немногим более 1. Диметокситритилированные рибонуклеозиды **27** и **28** были менее активными, но имели развиваемые индексы селективности 1,4 и 2,1, соответственно. Это дополняет широкий спектр активности соединения **27**, которое ингибирует репродукцию как штаммов ВВЗ, так и ВКЭ с EC₅₀ в диапазоне от 0,9 до 2,7 мкМ (раздел 3.3.3.3) и еще больше подчеркивает необходимость снижения токсичности этого соединения [Kozlovskaya et al., 2021b].

3.7.4.2. Производные нуклеозидов

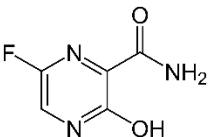
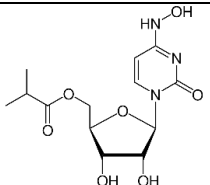
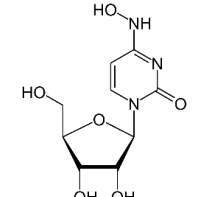
Главным ферментом репликации и транскрипции РНК-содержащего вируса является РНК-зависимая РНК полимераз. Это делает RdRp привлекательной

терапевтической мишенью, а отсутствие ее аналога в клетках млекопитающих предполагает высокую селективность ингибирования. Нуклеозидные ингибиторы являются одним из основных классов соединений, подавляющих работу RdRp путём связывания в активном центре фермента, или приводящие к обрыву цепи во время синтеза РНК. Ещё одним вариантом подавления репродукции вируса является летальный мутагенез, когда включение нуклеозидного аналога в растущую цепь РНК приводит к накоплению мутантных молекул, которые не могут быть правильно транслированы, что делает вирус нежизнеспособным.

Для двух противовирусных препаратов на основе подобных аналогов нуклеозидов, Молнупиравира (пролекарство NHC) и Фавипиравира, такая активность рассматривалась ранее на других вирусах и на SARS-CoV-2, и была протестирована нами для оценки возможностей нашей методики фенотипического скрининга и перспективности дальнейшего применения их в широкой клинической практике в РФ.

Фавипиравир в стандартно тестируемом диапазоне концентраций не ингибировал репродукцию SARS-CoV-2. При увеличении максимальной тестируемой концентрации в 20 раз: со 100 мкМ до 2000 мкМ, удалось выявить активность, но на сравнительно низком уровне (Таблица 42).

Таблица 42 – Активность субстанций Молнупиравира и Фавипиравира против SARS-CoV-2 (по подавлению признаков ЦПД)

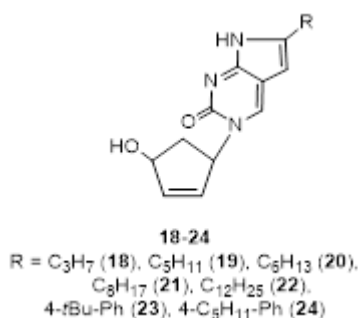
Соединение	Структура	EC ₅₀ ±SD, мкМ	CC ₅₀ ±SD, мкМ
Фавипиравир		309 ± 149	>1000
Молнупиравир (пролекарство NHC)		1,90 ± 0,46	>100
NHC		4,84 ± 0,42	>100

Молнупиравир (пролекарство NHC) проявил микромолярную активность против SARS-CoV-2, чуть более высокую по сравнению с контрольным препаратом NHC. Все соединения не вызывали снижения метаболизма клеток Vero в тестируемом диапазоне концентраций. Таким образом, полученные данные хорошо соответствуют другим исследованиям [Rabie, Abdalla, 2023; Zhao et al., 2021].

Далее мы провели скрининг 12 аналогов гетероциклических оснований, 41 5'-норкарбоциклического аналога нуклеозидов и 6 5-замещенных производных уридина, ранее проявивших противовирусную [Matyugina et al., 2010; 2013 a,b; 2015a], антибактериальную [Matyugina et al., 2012 a,b; 2015b], противопаразитарную [Alzahrani et al., 2017; Khandazhinskaya et al., 2019] или антипролиферативную [Klimenko et al., 2018] активность.

Всего было протестировано 59 соединений на способность ингибировать репродукцию SARS-CoV-2 в клетках Vero, и два соединения **23** и **24** подавляли размножение вируса с микромолярной активностью: EC₅₀ 53 и 21 мкМ, соответственно (Таблица 43). Активность сопровождалась довольно выраженной цитотоксичностью [Matyugina et al., 2021; Maslova et al., 2022; Svetlova et al., 2022].

Таблица 43 – Цитотоксичность и активность 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов на репродукцию SARS-CoV-2 (по подавлению ЦПД; приведены результаты для активных соединений)



Соединение	EC ₅₀ ± SEM, мкМ	CC ₅₀ ± SEM, мкМ
23	53 ± 18	75 ± 25
24	21 ± 6	53 ± 18
NHC	5,3 ± 0,9	>100

3.7.4.3. Пептидомиметики – ингибиторы главной протеазы Mpro (nsp5) SARS-CoV-2

Селективный ингибитор Mpro SARS-CoV-2 PF-00835231 был разработан корпорацией Pfizer на основе исследования протеаз бетакоронавирусов SARS-CoV и MERS-CoV [Boras et al., 2021]. Ингибитор представляет собой пептидомиметик, ковалентно связывающийся с каталитическим аминокислотным остатком Cys145. Дизайн ингибитора основан на достижении эффективного взаимодействия молекулы ингибитора с областями сайта связывания субстрата протеазой S1-S4: в области S1 располагается γ -лактамный фрагмент, в области S2 — небольшой алифатический фрагмент, в областях S3 и S4 — гидрофобные фрагменты (Рисунок 33). Структурное сходство Нарлапревира (селективного ингибитора протеазы NS3/4A ВГС) с ингибиторами Mpro ярко выражено [Fu et al., 2020; Bai et al., 2021; Zakharova et al., 2021].

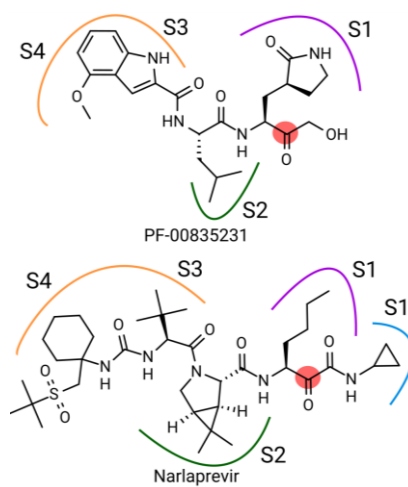


Рисунок 33 – Структура селективного ингибитора Mpro SARS-CoV-2 PF-00835231 и ингибитора протеазы NS3/4A вируса гепатита С Нарлапревира. Место взаимодействия с каталитическим Cys145 реакционного центра показано красным кругом.

Была проведена оценка противовирусной активности PF-00835231 и Нарлапревира против шт. ПИК-35 SARS-CoV-2 в клетках Vero с помощью разработанной нами методики (Таблица 44). Оба ингибитора PF-00835231 и Нарлапревир проявили сходную активность 64 ± 12 мкМ. Для достижения заявленной микромолярной активности PF-00835231 необходимо применение

дополнительного препарата, способствующего накоплению соединения в клетках. Таким образом, активность обоих ингибиторов была сходной, но в 10 раз ниже активности контрольного соединения NHC.

Таблица 44 – Цитотоксичность и активность ингибиторов протеаз на репродукцию SARS-CoV-2 (по подавлению ЦПД)

Соединение	EC ₅₀ ± SEM, мкМ	CC ₅₀ ± SEM, мкМ
PF-00835231	64 ± 12	–
Нарлапревир	64 ± 12	106 ± 9
NHC	4,84 ± 0,42	>100

3.7.4.4. Пептиды – ингибиторы взаимодействия SARS-CoV-2 с рецептором (ACE2)

Ингибирование связывания с рецептором является очевидной и часто используемой стратегией борьбы с вирусными инфекциями. Начальные этапы взаимодействия SARS-CoV-2 с клеткой определяет белок S. Рецептор-связывающий домен (RBD) белка S взаимодействует с интерфейсом клеточного рецептора ACE2, состоящего из α-спиралей h1 и h2, и запускает слияние клеточной и вирусной мембран для доставки вирусного генома в цитоплазму [Yang et al., 2020]. К настоящему времени для ингибирования этого взаимодействия разработаны и используются в клинической практике моноклональные антитела с нейтрализующей активностью [Guo et al., 2021; Zhou et al., 2021; Chen et al., 2021]. Одним из подходов к дизайну молекул, способных ингибировать связывание RBD SARS-CoV-2 и родственных вирусов с ACE2, является конструирование пептидов, имитирующих структуру и свойства клеточного рецептора ACE2 [Krut' et al., 2022]. В 2020–2022 гг. *in silico* изучено значительное количество молекул пептидов на основе последовательности ACE2, направленных на взаимодействие с белком S [Pomplun, 2020], и только для некоторых из них изучена эффективность ингибирования образования комплекса RBD-ACE2 и (или) противовирусная активность *in vitro*. Некоторые из синтезированных соединений, обладающие высокой (наномолярной) аффинностью связывания *in silico* [Han, Kral, 2020] и *in situ* [Huang et al., 2020; Sadremomtaz et al., 2022], проявляли противовирусную

активность на клеточных или животных моделях [Cao et al., 2020; Khatri et al., 2022; Linsky et al., 2020].

Мы оценили противовирусную активность мономерных пептидов на основе аминокислотной последовательности антипараллельных α -спиралей h1 и h2 ACE2 с модифицированными остатками и их гетеродимерных «химерных» пептидов X1–4 (Таблица 45).

Таблица 45 – Связывание с RBD и ингибирующая активность пептидов на репродукцию SARS-CoV-2 (по подавлению ЦПД)

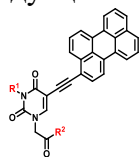
Код	Аминокислотная последовательность	Kd связывания с RBD, мкМ		EC ₅₀ , мкМ
		Вода	Водно-спиртовая смесь	
Спираль h1				
MTI-23 (SPB1, контроль)	IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS-NH ₂	NB*	3,6 ± 1,8	>200
h1- <i>D</i> -Cys (21-42) h1	cEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYk	ND**	ND	>200
h1-Mpa (21-42) h1	IEEQAKTFLDK[Mpa]FNHQAEDLFYk	NB	1,1 ± 0,4	>200
200h1 (21-44) h1	IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQCS	NB	3,1 ± 1,0	>200
900h1 (21-44) h1	IEEQAKTFLDEFNEEAEDLFYQCS	NB	3,5 ± 2,4	>200
Спираль h2				
h2 (67-89) h2	DKWSAFLKEQSTIAQ-Nle-YPLQECI	40 ± 8	2,6 ± 1,1	>200
h2-Cys (67-89) h2	DKWSAFLKECSTIAQIYPLQEI	NB	3,9 ± 1,9	>200
900h2 (64-87) h2	NCGDKWSAFLKEQSTLAQ-Nle-YPLQE	1.7 ± 0.4	7,2 ± 3,6	>200
Димерные пептиды				
X1 (h1- <i>D</i> -Cys – h2)	cEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYk S—————S DKWSAFLKEQSTLAQ-Nle-YPLQECI	4.2 ± 0.5	7,4 ± 5,5	>200
X2 (h1-Mpa – h2-Cys)	IEEQAKTFLDKFNHQAEDLFYk Mpa S S DKWSAFLKECSTIAQIYPLQEI	12 ± 5	0,93 ± 0,37	>200
X3 (200h1 – 900h2) Cys ⁴³ (h1)-Cys ⁶⁵ (h2)	IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQCS S—————S NCGDKWSAFLKEQSTLAQ-Nle-YPLQE	NB	ND	>200

****ND** - исследование не проводилось

3.7.4.5. Жёсткие амфипатические ингибиторы слияния (RAFI)

Соединения, за исключением **cm22pUY11**, не проявили значимой токсичности для клеток Vero (Таблица 46). Значения EC_{50} при подавлении признаков ЦДП, вызванного SARS-CoV-2, составили менее 3 мкМ, при этом большая часть соединений имела субмикромольную активность. Соединений с N³ метилом и Rom имели сходную противовирусную активность. Как показано выше для ВКЭ (раздел 3.3.3.1) и ЧИКВ (раздел 3.5.3.2), влияние N¹-заместителя в целом одинаково в обеих сериях.

Таблица 46 – Цитотоксичность и активность производных периленовых нуклеозидов на репродукцию SARS-CoV-2 (по подавлению ЦПД)



Шифр	R ¹	R ²	SARS-CoV-2, EC ₅₀ ± SD	Vero, CC ₅₀ ± SD
4 (cm0mUY11)	Me		1,02 ± 0,28	>50
05 (cm1mUY11)			0,06 ± 0,02	>50
6a (cm13mUY11)			0,63 ± 0,56	>50
6b (cm2mUY11)			0,11 ± 0,04	>50
6c (cm3mUY11)			0,06 ± 0,02	>50
6d (cm4mUY11)			0,06 ± 0,02	>50
6e (cm5mUY11)			0,15 ± 0,08	>50
6f (cm6mUY11)			1,06 ± 0,76	>50
6g (cm12mUY11)			0,09 ± 0,05	>50
6h (cm11mUY11)			0,02 ± 0,02	>50
6i (cm7mUY11)			0,27 ± 0,16	>50
7a (cm8mUY11)			0,63 ± 0,56	>50
7b (cm9mUY11)			0,27 ± 0,10	>50
7c (cm10mUY11)			0,10 ± 0,02	>50
cm1pUY11	POM		0,15 ± 0,08	>50
cm4pUY11			2,55 ± 1,56	>50
cm6pUY11			0,07 ± 0,03	>50
cm7pUY11			0,17 ± 0,13	>50
cm2pUY11			0,06 ± 0,02	>50
cm8pUY11			0,09 ± 0,03	>50
cm9pUY11			2,37 ± 1,60	>50
cm3pUY11			0,07 ± 0,02	>50
cm22pUY11			0,05 ± 0,03	23 ± 7
cm5pUY11			1,58 ± 0,67	>50
cm16pUY11			3,13 ± 0,86	>50
cm17pUY11			0,39 ± 0,22	>50
cm18pUY11			0,16 ± 0,05	>50
UY11	—	—	1,03 ± 0,59	>50

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,0N – высокоактивно

0,N – активно

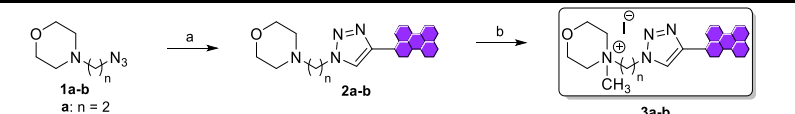
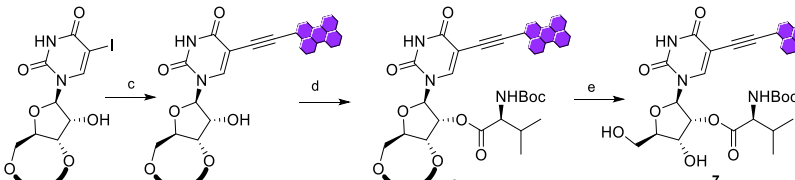
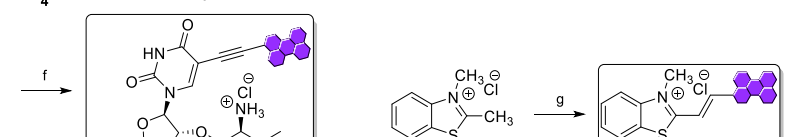
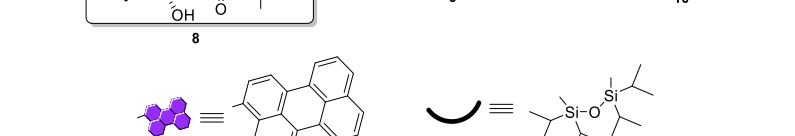
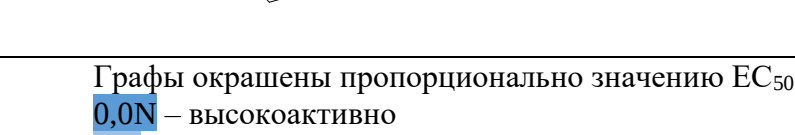
1-20 – низкоактивно

>100 – неактивно

Соединения с гидрофобными заместителями N¹-положении, в том числе **6a** и **6f**, в целом обладали меньшей активностью. Соединения с двумя гидроксильными группами (**6g/cm3pUY11**, **6h/cm22pUY11**) были заметно более активны, что позволяет предположить наличие у них оптимальных заместителей. Наиболее гидрофильное соединение с тремя гидроксильными группами (**7c/cm18pUY11**) имело значительно сниженную активность [Chistov et al., 2023].

Далее была проанализирована серия производных RAFI с различными заряженными заместителями (Таблица 47), повышающими их растворимость и потенциальную применимость *in vivo* (тестирование против ЧИКВ приведено в разделе 3.5.3.2).

Таблица 47 – Цитотоксичность и активность производных периленовых нуклеотидов с заряженными заместителями на репродукцию SARS-CoV-2 (по подавлению ЦПД)

Структура	Шифр	SARS-CoV-2, EC ₅₀ ± SD, мкМ	Vero, CC ₅₀ ± SD, мкМ
	2a	11 ± 2	>100
	2b	>100	>100
	3a	1,9 ± 0,9	>100
	3b	9 ± 4	>100
	5	>100	>100
	6	>100	>100
	7	0,075 ± 0,018	98 ± 17
	8	1,3 ± 0,4	>100
	10	1,5 ± 0,9	>100
	Контроль (NHC)	7,4 ± 3,6	>100

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,0N – высокоактивно

0,N – активно

1-20 – низкоактивно

>100 – неактивно

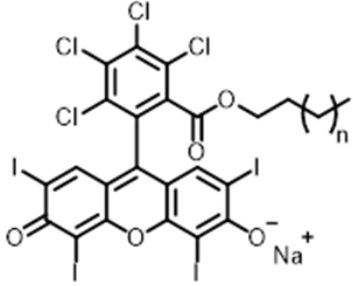
Заряженные соединения проявили противовирусную активность против SARS-CoV-2 со значениями EC_{50} в диапазоне низких микромолярных-субмикромолярных концентраций практически без признаков цитотоксичности (Таблица 47). Однако некоторые их незаряженные интермедиаты не проявляли активности против SARS-CoV-2 (**2b**, **5**, **6**). Более того, заряженные производные имели сравнимую или более высокую противовирусную активность, чем положительный контроль NHC. Замена этилового линкера между периленилтриазолильным и морфолиновым остатками на пропиловый привела к полной потере активности против SARS-CoV-2 в морфолиновой серии, но соответствующее N-метилированное производное **3b** уже обладало противовирусной активностью. Удаление силоксановой 5',3'-О-защитной группы восстановило активность **7**, сделав его наиболее активным против SARS-CoV-2 с $EC_{50} 0,075 \pm 0,018$ мкМ, что свидетельствует о важности сохранения липофильного периленового остатка и полярных, в нашем случае гидроксильных, групп для максимальной активности [Shtro et al., 2022; Svetlova et al., 2022].

3.7.4.6. Производные Бенгальского розового

Как уже описывалось ранее, мы провели скрининг ряда производных бенгальского розового (анионный ксантеновый краситель, производное флуоресцеина) с различными гидрофобными n-алкильными цепями против нескольких оболочечных вирусов: ЧИКВ (раздел 3.5.3.3), ВИЧ-1 (раздел 3.6.2.2) и SARS-CoV-2. Предполагаемый механизм действия данных соединений – разрушение мембраны вириона за счёт генерации соединениями синглетного кислорода 1O_2 , катализируемой воздействием света.

Все протестированные соединения были активны в отношении SARS-CoV-2 (Таблица 48). Более того, **2a** имел наномолярное значение EC_{50} и превосходил бенгальский розовый **1** по активности, что указывает на оптимальную длину алкильного заместителя C_4 (n-бутил) для этого вируса. При дальнейшем увеличении длины алкильного заместителя в серии наблюдается снижение активности [Rubekina et al., 2022].

Таблица 48 – Цитотоксичность и активность производных бенгальского розового на репродукцию SARS-CoV-2 (по подавлению ЦПД)

Структура	Шифр	SARS-CoV-2, EC ₅₀ ± SD, мкМ	Vero, CC ₅₀ ± SD, мкМ
 n = 1 (2a); 3 (2b); 5 (2c); 7 (2d); 9 (2e)	1	0,5 ± 0,2	43 ± 10
	2a	0,05 ± 0,02	8 ± 1
	2b	0,4 ± 0,3	60 ± 15
	2c	5,3 ± 1,3	53 ± 25
	2d	6,6 ± 3,1	60 ± 15
	2e	43 ± 10	> 100
	Контроль (ННС)	4,7 ± 2,9	> 100

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,0N – высокоактивно

0,N – активно

1-50 – низкоактивно

>100 – неактивно

3.7.4.7. Эпигаллокатехин галат (EGCG)

Эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG) является основным компонентом экстракта зелёного чая. Показана его выраженная ингибирующая активность против различных вирусов, особенно с геномами, представленными одноцепочечной РНК положительной полярности [Mhatre et al., 2021].

Мы провели серию экспериментов и оценили влияние EGCG на SARS-CoV-2-индуцированную гибель клеток (ЦПД). По схеме В1 вирус предварительно инкубировали с EGCG в течение 1 ч, а затем добавляли к клеткам Vero. По схеме В2 клетки предварительно инкубировали с EGCG в течение 1 ч, а затем добавляли вирус. В качестве положительного контроля использовали ННС, действующий во время репродукции вируса в клетке (Таблица 49 и Рисунок 34).

Таблица 49 – Цитотоксичность и активность EGCG на репродукцию SARS-CoV-2 (по подавлению ЦПД) при различной схеме добавления соединения

Соединение	EC ₅₀ ± SD, мкМ		CC ₅₀ ± SD, мкМ
	Преинкубация с вирусом (В1)	Преинкубация с клетками (В2)	
EGCG	5 ± 1	43 ± 11	33 ± 6
ННС	5,0 ± 0,6	2,5 ± 0,7	>100

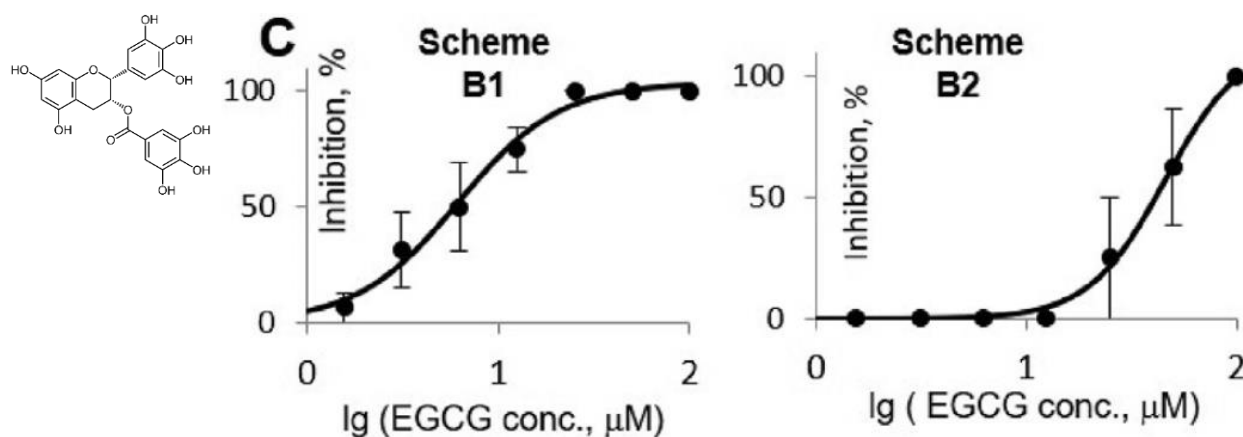


Рисунок 34 – Кривые ингибирования SARS-CoV-2-индуцированной гибели клеток (ЦПД) при разных схемах внесения EGCG: преинкубация с вирусом (B1) и преинкубация с клетками (B2).

Контрольное соединение NHC проявило сходную активность при добавлении к клеткам и к вирусу, поскольку соединение попадает в клетки и действует после проникновения вируса в клетку. Тестируемое соединение EGCG было достоверно более активно при добавлении к вирусу перед внесением к клеткам: схема B1 явно превосходила B2 (значения EC_{50} 5 ± 1 мкМ и >40 мкМ, соответственно). Таким образом, EGCG проявило микромолярную активность против SARS-CoV-2 [Tsvetkov et al., 2021].

3.7.4.8. Растительные экстракты

Было проведено исследование ингибиторной активности 64 экстрактов растительного происхождения, полученных путём экстракции органическими растворителями и хроматографическим фракционированием, на развитие признаков SARS-CoV-2-индуцированного ЦПД в клетках Vero (Таблица 50). Наибольшую активность проявили экстракты борщевика, дуба, мари, папоротника орляка и таволги вязолистной. При этом, для большинства растений активны были как экстракты, полученные с применением органических растворителей, так и белково-пептидные. А для дуба – водные, с очевидным возрастанием активности при увеличении процентности экстракта: с 21 ± 20 мкг/мл у 3-4%, до $1,17 \pm 0,99$ мкг/мл у 50%. Эти данные указывают на наличие в данных экстрактах различных

по химической природе молекул, способных ингибировать репродукцию SARS-CoV-2. Активные экстракты были отобраны для дальнейшего фракционирования.

Таблица 50 – Цитотоксичность и активность растительных экстрактов на репродукцию SARS-CoV-2 (по подавлению ЦПД)

Растение	Характер образца	EC ₅₀ ± SD, мкг/мл
Адамов корень (<i>Dioscorea communis</i>)	Ацетон	>500
	Бутанол	>500
	Этилацетат	70 ± 35
Амарант	БПЭ	>500
Амброзия (<i>Ambrosia</i> sp.)	Ацетон	>500
	БПЭ	>500
	Бутанол	>500
	Гексан	>500
	Этилацетат	>500
Борщевик (<i>Heracleum sphondylium</i>)	Ацетон	5 ± 2
	БПЭ	>500
	Бутанол	8 ± 6
Дуб (<i>Quercus robur</i> cortex)	Водный экстракт 3-4%	21 ± 20
	Водный экстракт 10%	2,7 ± 0,7
	Водный экстракт 50%	1,2 ± 0,9
	Бутанол	>500
	Этилацетат	78 ± 20
Ежа сборная (<i>Dactylis glomerata</i>)	Ацетон	>500
	БПЭ	>500
	Бутанол	>500
	Гексан	330 ± 190
	Этилацетат	>500
Ежовник	БПЭ	>500
Канатник	БПЭ	>500
Колосняк (<i>Leymus arenarius</i>)	Ацетон	>500
	БПЭ	>500
	Бутанол	>500
	Этилацетат	>500
Мальва	БПЭ	>500
Марь (<i>Chenopodium acerifolium</i>)	Ацетон	9 ± 7
	БПЭ	213 ± 52
	Бутанол	>500
	Этилацетат	2,1 ± 0,9
Мокрица	БПЭ	>500
Одуванчик (<i>Araxacum officinále</i>), семена	Ацетон	>500
	БПЭ	>500
	Бутанол	>500
	Гексан	120 ± 75
	Этилацетат	>500
Одуванчик, (<i>Araxacum officinále</i>), цветки	БПЭ	>500

Растение	Характер образца	EC ₅₀ ± SD, мкг/мл
Папоротник орляк (<i>Pteridium aquilinum</i>)	Ацетон	1,6 ± 1,1
	БПЭ	1,6 ± 0,9
	Бутанол	7 ± 3
	Этилацетат	5,1 ± 3,4
Пырей удлиненный (<i>Agropyron elongate</i>)	Ацетон	>500
	БПЭ	>500
	Бутанол	>500
	Этилацетат	160 ± 50
Свербига восточная	БПЭ	>500
Солодка	БПЭ	>500
Таволга вязолистная (<i>Filipendula ulmaria</i>)	Ацетон	3,3 ± 1,6
	БПЭ	6,1 ± 2,4
	Бутанол	17 ± 5
	Гексан	>500
	Гексан	>500
	Этилацетат	>500
Тимофеевка	БПЭ	>500
Тутовник	БПЭ	>500
Укроп	БПЭ	>500
Чернушка посевная (<i>Nigella sativa</i>) (Йемен)	БПЭ	>500
Чернушка посевная (<i>Nigella sativa</i>) (Крым)	Ацетон	>500
	БПЭ	>500
	Бутанол	>500
Чернушка посевная (<i>Nigella sativa</i>) (Крым), обезжир.	БПЭ	>500
Чернушка посевная (<i>Nigella sativa</i>) (Турция)	БПЭ	>500
N ⁴ -hydroxycytidine (контроль)	ДМСО	5,3 ± 1,6

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0–10 – высокоактивно

10–100 – активно

100–500 – низкоактивно

>500 – неактивно

3.7.4.9. Лекарственные препараты местного действия – неспецифическая активность

В качестве средств этиотропной патогенетической терапии лёгких форм COVID-19 можно рассмотреть применение местных антисептиков широкого спектра действия. В связи с этим был протестирован спрей для местного применения дозированный Лизобакт Комплит (АО Босналек, Босния и Герцеговина) и таблетки для рассасывания Лизобакт (растворённые в воде). Лизобакт комплит является комбинированным средством и содержит лизоцим, обладающий противовирусным, антибактериальным и противогрибковым

действием, антисептик цетилпиридиния хлорид и анестетик лидокаин. Таблетки для рассасывания Лизобакт содержат лизоцим и лидокаин [Горелов и др., 2021].

Препарат Лизобакт комплит ингибировал репродукцию SARS-CoV-2 в разведении более чем 1:1000 (Таблица 51), в то время как раствор таблеток не оказывал ингибирующего действия в минимально возможном разведении. Из этого можно заключить, что цетилпиридиния хлорид обладает некоторым ингибирующим эффектом на репродукцию SARS-CoV-2 в клетках [Горелов и др., 2021].

Таблица 51 – Активность препаратов Лизобакт на репродукцию SARS-CoV-2 (по подавлению ЦПД)

Препарат	EC ₅₀ , разведение
Лизобакт Комплит	1:1090
Лизобакт таблетки	<1:8

Для рекомендации препарата Лизобакт Комплит для профилактики или лечения COVID-19 требуются дальнейшие клинические исследования.

3.8. Методики фенотипической оценки вирулицидной активности соединений

Вирулицидная активность – это способность соединений инактивировать высокие дозы вируса, необходимое свойство дезинфектантов, инактивирующих агентов для вакцин и т.п.

3.8.1. Методика оценки вирулицидной активности соединений против высоких доз ортофлавивирусов

Вирулицидная активность RAFI периленового ряда (раздел 3.3.3.1) против ВКЭ была оценена в клетках СПЭВ, в которых данные соединения не обладают токсичностью в достаточно высоких концентрациях. Исследование выполнено к.х.н. Орловым А.А. под руководством автора данной работы.

Соединения **7** (dUY11) и **8** (dUY12) в концентрации 1000×EC₅₀ (25 и 500 мкМ соответственно) добавляли к 10-кратным разведениям вирусосодержащей суспензии

и инкубировали 1 ч, после чего смеси добавляли в лунку к клеткам СПЭВ на 24-луночных пластинах для выявления остаточного вируса (Таблица 52). Соединения полностью останавливали образование бляшек при дозе вируса от 2 до 2.2×10^3 БОЕ и почти полностью (оставались лишь единичные бляшки) при $2.2 \times 10^4 - 2.2 \times 10^5$ БОЕ. Таким образом, добавление соединения снижало количество вируса на 5 lg [Orlov et al., 2016].

Таблица 52 – Снижение титра вируса при обработке периленовыми нуклеозидами 7 и 8

Доза вируса (БОЕ)	Ингибирование (%)	
	7 (dUY11)	8 (dUY12)
2	100	100
22	100	100
2.2×10^2	100	100
2.2×10^3	100	100
2.2×10^4	99.9988 ± 0.0017	99.9988 ± 0.0017
2.2×10^5	99.9995 ± 0.00022	99.9965 ± 0.0025

Использование оценки вирулицидной активности в такой постановке с прямым внесением соединения в высокой концентрации возможно только для соединений с низкой цитотоксичностью.

3.8.2. Методика оценки вирулицидной активности соединений против высоких доз SARS-CoV-2

Одним из средств предотвращения COVID-19 является неспецифическая профилактика, включающая социальное дистанцирование, ношение масок и использование дезинфектантов для обеззараживания кожи и поверхностей. Однако, дезинфектанты часто являются высокотоксичными соединениями для тестирования в культуре клеток по стандартной методике, а с другой стороны, должны нейтрализовать значительно бóльшие дозы вируса.

Для этого была разработана специальная методика биологического тестирования дезинфектантов против SARS-CoV-2 и проведено тестирование трёх препаратов на основе разветвленного олигогексаметиленгуанидина гидрохлорида (ОГМГ-ГХ): субстанции, средства для обработки поверхностей и спрея для рук. В качестве контроля использовали ННС.

Инактивация SARS-CoV-2 препаратами имело прямую зависимость от концентрации препарата и, соответственно, действующего вещества ОГМГ-ГХ, т.е. процент ингибирования увеличивался с увеличением концентрации действующего вещества. При этом 100% инактивация вируса наблюдалось при концентрациях выше 10% для водного раствора субстанции ОГМГ-ГХ, что соответствует 0,1% действующего вещества ОГМГ-ГХ, и выше 1% для средства для обработки поверхностей из ОГМГ-ГХ, что соответствует 0,09% действующего вещества ОГМГ-ГХ. 10% раствор спрея с ОГМГ-ГХ (0,08% действующего вещества ОГМГ-ГХ) инактивировал более 90% инфекционного вируса, что позволяет полагать 100% эффективность у исходного препарата. На основании полученных данных были рассчитаны EC_{50} , показывающие концентрацию ОГМГ-ГХ в препарате, необходимую для нейтрализации 50% добавленного вируса (Таблица 53) [Shatalov et al., 2021].

Таблица 53 – Расчётная концентрация исследуемых препаратов, вызывающая инактивацию 50% вирионов шт. ПИК35 вируса SARS-CoV-2

Препарат	EC_{50} (% ОГМГ-ГХ)
Водный раствор субстанции ОГМГ-ГХ	0,03
Средство для обработки поверхностей, водный раствор	0,02
Спрей	0,02

Также была рассчитана EC_{50} для субстанции в пересчёте на чистое вещество (Таблица 54).

Таблица 54 – Вирулицидная активность субстанции ОГМГ-ГХ против SARS-CoV-2

Соединение	$EC_{50} \pm SD$, мкМ
ОГМГ-ГХ	60 ± 22
NHC	438 ± 10

Таким образом, метод позволяет определять вирулицидную активность цитотоксичных соединений против SARS-CoV-2.

3.9. Методики фенотипического определения механизма действия соединений

Целью данных исследований является определение стадии репликативного цикла вируса, ингибируемой активным соединением. Для этого были разработаны методики определения активности соединения в зависимости от времени добавления к инфицированным клеткам, т.е. так называемого эксперимента Time-of-Addition.

3.9.1. Методика оценки активности соединений от времени добавления для ортофлавириусов – по снижению урожая

Эксперимент был проведен для выяснения стадии репликативного цикла ортофлавириусов на примере ВКЭ, ингибируемого соединениями на основе изоксазола (раздел 3.3.3.5). Исследование выполнено автором данной работы. Во время этого эксперимента соединения добавляли к инфицированным клеткам на разных стадиях репликативного цикла вируса, чтобы выяснить стадию, на которую больше всего влияет соединение. Для этого клетки СПЭВ заражали ВКЭ после предварительной обработки клеток растворами соединений с концентрацией $5 \times EC_{50}$, предварительной инкубации вируса с соединениями или при добавлении раствора соединения в начале синтеза вирусных белков через 2 часа после инфицирования (ч п.и.) или в начале репликации генома вируса через 5 ч п.и. После 1 репликативного цикла размножения вируса вирусный урожай собирали, титровали по бляшкам в культуре клеток СПЭВ и сравнивали с ДМСО-контролем (Рисунок 35).

Добавление раствора соединения на 2 или 5 ч п.и. очень незначительно ингибирует репродукцию вируса. Воздействие соединения на вирус перед взаимодействием с клетками значительно снижало рост вируса по сравнению с контролем, обработанным ДМСО. Эффект был наиболее выражен при преинкубации вируса с соединением, что предполагает прямое взаимодействие соединения с вирионом. Однако предварительная инкубация клеток с соединением также снижает выход вируса, но вдвое меньше. Таким образом, мы можем

заклучить, что соединения взаимодействует с вирионом и/или клеточными мишенями, участвующими в прикреплении и проникновении вируса [Vasilenko et al., 2019].

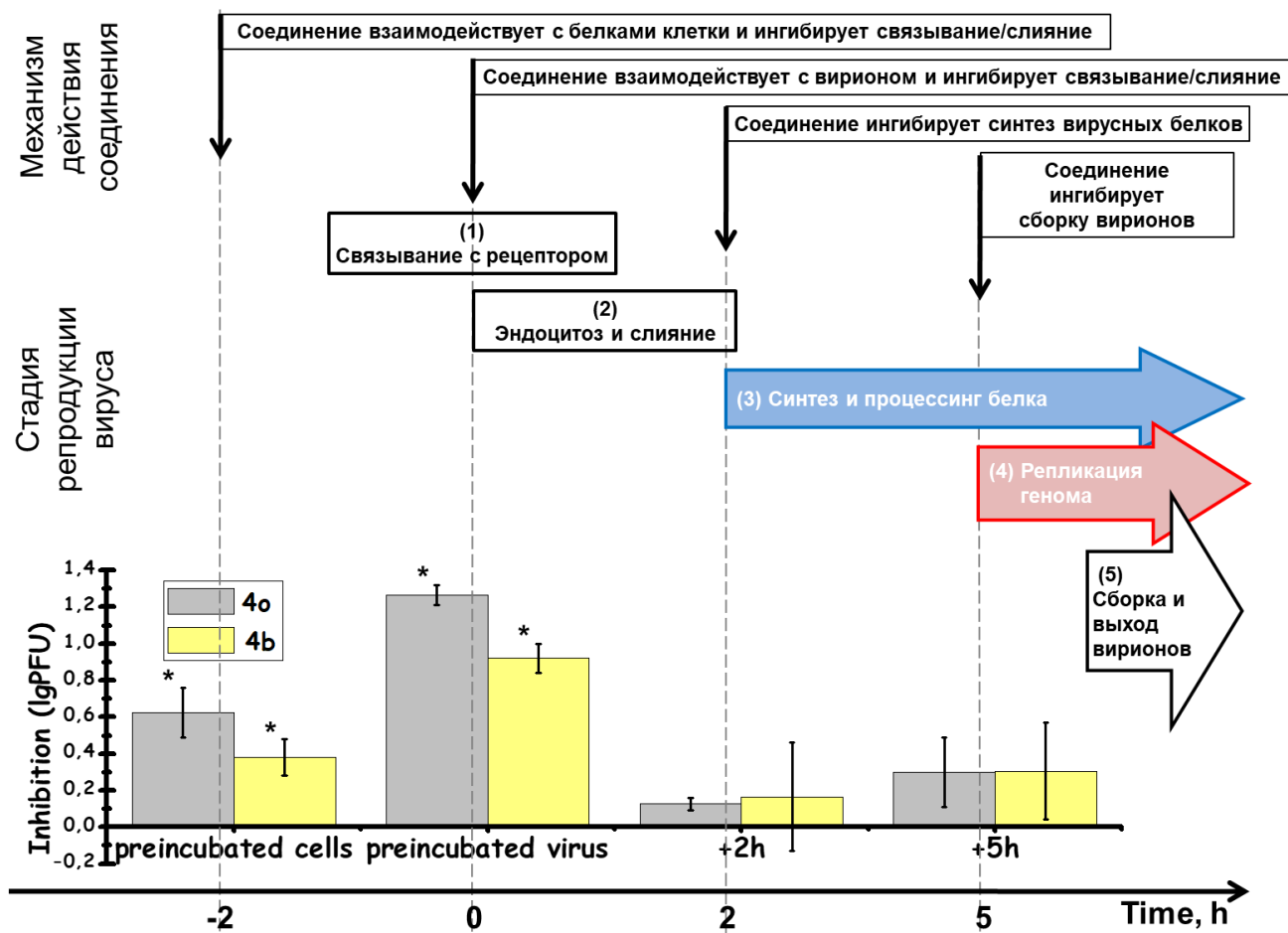


Рисунок 35 – Сравнение урожая вируса в контрольных (ДМСО) клетках после заражения ВКЭ (MOI 0,1 БОЕ/клетку) с урожаем вируса на клетках, обработанных соединениями **4b** или **4a** ($5 \times EC_{50}$, 95 и 18,5 мкМ ч соответственно) на различных стадиях репликативного цикла вируса. (* $p < 0.05$)

3.9.2. Методика оценки активности соединений от времени добавления для энтеровирусов – по снижению урожая

Для подтверждения релевантности и специфичности тест-системы оценки противовирусной активности против энтеровирусов мы провели исследования зависимости активности от времени добавления ННС (эксперимент Time-of-Addition) для ЭВ-А71 и ПВ1 (Рисунок 36). Клетки RD инкубировали с ННС или ДМСО в течение 1 ч, затем добавляли предварительно инкубированный с ННС или ДМСО вирус и оставляли на 1 ч для сорбции и внесения, а затем добавляли

культуральную среду с ННС или ДМСО. Вирус собирали после одного цикла репликации вируса (около 7 ч п.и.) и определяли общий урожай вируса методом титрования по ЦПД в культуре клеток RD. Значительное снижение урожая вируса наблюдалось при схемах 3, 4 и 5, что свидетельствует о том, что ННС действует на внутриклеточной стадии репликативного цикла вируса после проникновения, т.е. репликацию генома, экспрессию белков и/или сборку вириона [Kozlovskaya et al., 2018], что соответствует данным, полученным для ННС в других исследованиях [Hadj Hassine et al., 2022].

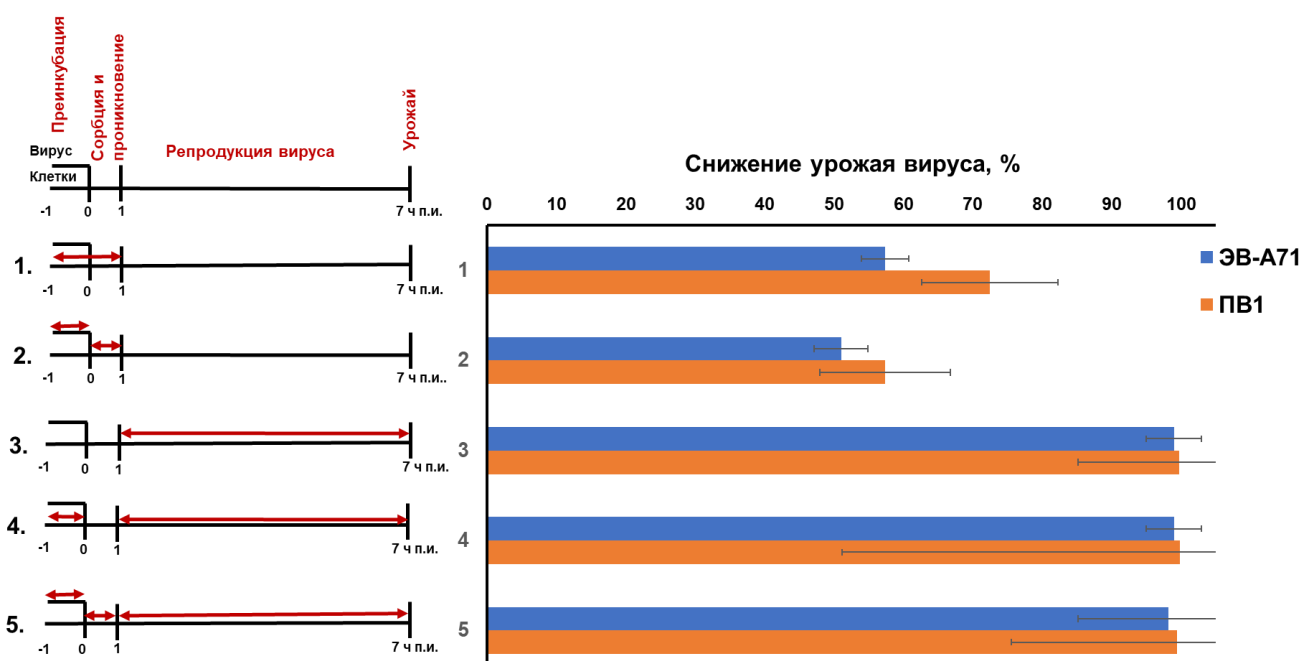


Рисунок 36 – Снижение урожая энтеровирусов (ЭВ-А71 и ПВ1) в зависимости от схемы добавления ННС.

Далее, эксперимент для выяснения стадии цикла репликации энтеровирусов, ингибируемого N^6 -(3,4-дихлорбензил)аденозином был проведен Золотаревой (Голинец) А.Д. под руководством автора данной работы.

Клетки RD инфицировали ЭВ-А71, Е30 и ПВ1 с MOI 0,1-1 ТЦД₅₀/клетку, после чего каждый час к клеткам добавляли 10 мкМ (5-25 EC_{50} для разных ЭВ) раствор соединения, начиная с 1 ч п.и. Выход вируса после 1 цикла репликации (7 ч) определяли методом титрования по ЦПД в культуре клеток RD и сравнивали с контролем, обработанным ДМСО (Рисунок 37). Добавление N^6 -(3,4-

дихлорбензил)аденозина более эффективно ингибировало репродукцию ЭВ-А71 и Е30 по сравнению с ПВ1, хотя значения EC_{50} для Е30 и ПВ1 были сходны. При этом максимальное снижение выхода вируса наблюдалось при добавлении соединения на 2-3 ч п.и. Это означает, что N⁶-(3,4-дихлорбензил)аденозин ингибирует жизненный цикл вируса на стадии репликации.

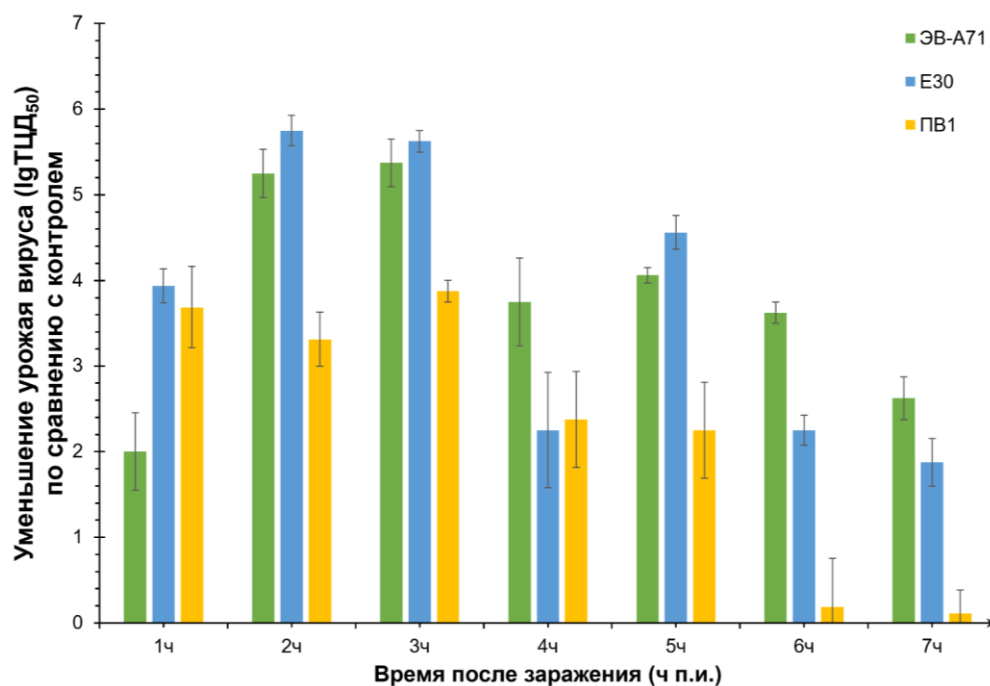


Рисунок 37 – Урожай энтеровирусов при добавлении N⁶-(3,4-дихлорбензил)аденозина на разные сроки после заражения клеток RD. Урожай вируса собран после 1 цикла репликации (7 ч п.и.)

3.9.3. Методика оценки активности соединений от времени добавления для SARS-CoV-2 – по снижению урожая и подавлению бляшкообразования

Эксперимент для выяснения стадии цикла репликации SARS-CoV-2, ингибируемого RAFI был двумя методами. Поскольку предположительный МоА для RAFI предполагает ингибирование слияния, то в эксперименте процесс заражения разделяли на предобработку клеток и/или вирионов, адсорбцию вируса (при 4°C, при этой температуре возможна сорбция вируса на рецепторах, но невозможны изменения конформации белков и мембран, необходимые для проникновения вируса) и проникновение (первый час после заражения при 37°C) и репродукцию вируса (1 до 20 часов после инфицирования, ч п.и.). Соединения (тестовый периленовый нуклеозид cm11dUY11, ННС и контроль ДМСО)

добавляли на различных стадиях, согласно схеме (Рисунок 38А) и в конце стадии удаляли и клетки отмывали. Количество остаточного вируса определяли по количеству образовавшихся бляшек (Рисунок 38С) после заливки клеток метицеллюлозным покрытием, а урожай вируса после 1 цикла репликации определяли в культуральной жидкости титрованием по ЦПД (Рисунок 38В).

ННС, действующее на стадии репликации, оказывало значимое снижение урожая вируса или подавляло появление бляшек, только когда оно присутствовало с клетками после заражения вирусом (постановки 1 и 7), что соответствует механизму действия соединения. Интересно, что исследуемое соединение cm11dYU11 подавляло образование бляшек при одновременном присутствии в системе растворов вируса и соединения (постановки 1, 3 и 4), что вероятно связано с прямым действием на вирионы, а также при преинкубации клеток с соединением (постановка 2), что вероятно связано с воздействием сорбированного в мембранах клетки соединения на вирионы до проникновения в клетку. Данные анализа эксперимента по подавлению образования бляшек (Рисунок 38С) демонстрируют резкое различие между постановками 4 и 5, указывая на то, что соединение оказывает незначительное влияние или не оказывает никакого действия во время фазы адсорбции. Эксперимент по оценке урожая вируса по постановкам 5 и 7 (Рисунок 38В) показал практически полное исчезновение инфекционных частиц из вторичного урожая вируса, несмотря на очевидное инфицирование исследуемых клеток. Мы полагаем, что это связано с повреждением вторичных вирионов во время постановки реакции титрования соединением, которое находилось в клеточном супернатанте ввиду того, что его невозможно отмыть от клеток.

Таким образом, предполагаемый механизм действия тестируемого соединения cm11dUY11 заключается в накоплении исследуемых соединений в липидной оболочке вириона [Chistov et al., 2023].

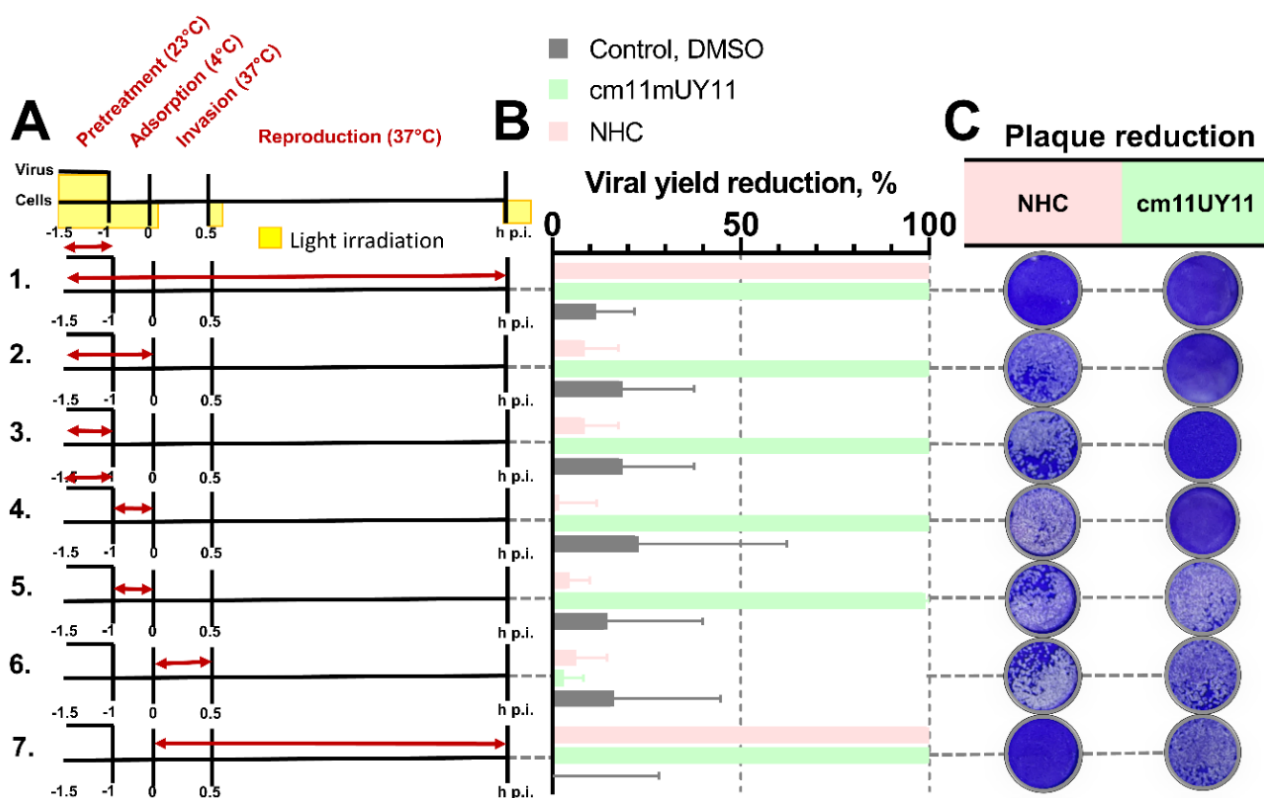


Рисунок 38 – Анализ активности соединения от времени добавления. Клетки и вирус обрабатывали 0,5 мкМ cm11UY11, или 5 мкМ NHC (положительный контроль), или ДМСО (отрицательный контроль) по схеме (A). Выход вируса (собранный 20 ч п.и.) определяли путем титрования по ЦПД в клетках Vero. Снижение выхода вируса рассчитывали как процент (%) по отношению к контролю ДМСО (B). Бляшки окрашивали и подсчитывали через 5 сут. инкубации при 37°C (C).

При этом методика оценки остаточного вируса по ингибированию образования бляшек показала более чёткие результаты, по сравнению со сравнительной оценкой урожаев вируса, при которой не удалось измежать действия соединения на вторичные вирионы.

Стоит отметить неприменимость старой терминологии, принятой в русскоязычных публикациях для описания экспериментов по зависимости активности соединения от времени добавления к заражённым клеткам, а именно профилактическая, лечебная и лечебно-профилактическая схемы по отношению ко времени внесения соединения в тесте *in vitro*. Такие термины применимы в рамках доклинического исследования на животных и клинического применения препарата, но не на стадии моделирования вирусной инфекции в культуре клеток. Препараты, действующие после заражения клеток вирусом, нацеленные на стадии

реализации генома вируса и сборку/выход вирионов, могут применяться для до- и постконтактной профилактики вирусной инфекции в рамках макроорганизма. А препараты, действующие на первых стадиях вирусного репликативного цикла на связывание с рецептором и проникновение вируса в клетку, могут применяться для лечения вирусных инфекций, и даже успешно применяются (например, все препараты антител).

3.10. Подходы к выбору штамма для фенотипического скрининга по ингибированию репродукции вируса в культуре клеток

Выбор штамма важен для осуществления фенотипического скрининга, поскольку мы хотим найти соединения, которые можно бы использовать на практике в актуальной эпидемиологической ситуации. Но вопрос о важности рассмотрения нескольких штаммов и критериях выбора штамма остаётся открытым.

Сама используемая для фенотипического скрининга тест-система накладывает ограничения на выбор штамма. В рассматриваемых методиках выбранный штамм должен вызывать ЦПД в используемых клетках в сравнительно короткий временной промежуток.

Для выявления других ограничений были проведены сравнительные эксперименты для разных вирусов при использовании разработанных методик.

3.10.1. Сравнение противовирусной активности 4-аминопиримидинов против разных штаммов ВКЭ

Способность ингибировать репродукцию нескольких вариантов ВКЭ, принадлежащих к разным филогенетическим линиям, имеет решающее значение для хорошего противовирусного средства. ВКЭ подразделяют на три основных подтипа: европейский, сибирский, и дальневосточный. Европейский подтип наиболее распространен в континентальной Европе; сибирский – на территории России, дальневосточный – на Дальнем Востоке России, а также в Китае, Японии и

Монголии [Ruzek et al., 2019]. Подтипы довольно тесно связаны генетически, вариация полипротеиновых последовательностей между подтипами составляет около 2-7% [Demina et al., 2010; Lindebach et al., 2013].

Мы показали противовирусную активность N-оксидов 4-аминопиримидина (раздел 3.3.3.4), действующих наиболее вероятно на карман связывания н-октил- β -D-глюкозида (β -ОГ) [Modis et al., 2003] в белке оболочки ВКЭ.

Для оценки спектра противовирусной активности N-оксидов 4-аминопиримидина была выбрана панель штаммов (Таблица 55), различающихся подтипом, временем и местом выделения и пассажной историей, отсеквенированных автором работы [Kozlovskaya et al., 2010]. Эксперименты проведены к.х.н. Дугево́й Е.В. под руководством и непосредственным участии автора данной работы.

Таблица 55 – Штаммы ВКЭ, использованные для определения спектра активности N-оксидов 4-аминопиримидина

Штамм ВКЭ	Место и год выделения	Источник выделения	Пассажи	GenBank
Европейский подтип				
Absettarov	Ленинградская обл., Россия, 1951	кровь пациента с КЭ	МхМ5V1	KU885457
256	Беларусь, 1940	<i>I. ricinus</i>	МхМ2P1	AF091014
Сибирский подтип				
Vasilchenko	Новосибирская обл., Россия, 1961	кровь пациента с КЭ	МхМ2V1	L40361
ЕК-328	Эстония, 1971	<i>I. persulcatus</i>	М6P1М5P1	DQ486861
Lesopark11	Новосибирск, Россия, 1986	<i>I. persulcatus</i>	МхМ2P3	KJ701416
TV08-T2546	Республика Тыва, Россия, 2008	<i>I. persulcatus</i>	М2V1	KU052690
Дальневосточный подтип				
205KGG	Хабаровский край, Россия, 1973	<i>I. persulcatus</i>	МхМ1P3	DQ989336 GU121964
DV936k	Приморский край, Россия, 1975	<i>I. persulcatus</i>	М3P2	GU125722

М – пассажи через мозг мышей (Мх – пассажи, сделанные до получения штамма в лаборатории)

V – пассажи в клетках Vero

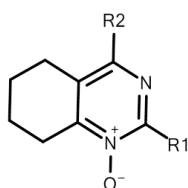
P – пассажи в клетках СПЭВ

Для выбранных штаммов была проведена оценка противовирусной активности 9 N-оксидов 4-аминопиримидина в реакции ингибирования

бляшкообразования в культуре клеток СПЭВ под метилцеллюлозным покрытием (Таблица 56). Большинство исследованных соединений проявляли широкий спектр действия, подавляя репродукцию штаммов всех подтипов ВКЭ. Соединение **7с**, слабо подавлявшее репродукцию штамма Абсеттаров, оказалось неактивным и в отношении других штаммов. Общая тенденция заключалась в том, что соединения с самой высокой активностью против шт. Абсеттаров имели наиболее устойчивый профиль ингибирования репродукции и других штаммов [Dueva et al., 2020].

Таким образом, как подтиповые, так и уникальные аминокислотные замены оказывают незначительное влияние на измерение противовирусной активности соединений в отношении ВКЭ.

Таблица 56 – Противовирусная активность N-оксидов 4-аминопиримидина против различных штаммов ВКЭ при оценке по подавлению образования бляшек в культуре клеток СПЭВ



Шифр	R1	R2	EC ₅₀ ± SD, мкМ							
			Европейский		Сибирский				Дальневосточный	
			Абсеттаров	256	Васильченко	TV08-T2546	Лесопарк11	ЭК-328	205 KGG	ДВ936к
7a	Me	NHBu	31 ± 5	>50	>50	18 ± 4	>50	>50	>50	18 ± 3
7c	<i>t</i> -Bu	NHCH ₂ Ph	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
7o	Me	NH(2-OH-C ₆ H ₄)	8 ± 3	21 ± 2	3,4 ± 0,2	4,0 ± 0,4	6,5 ± 0,1	12 ± 1	7,0 ± 0,2	7,4 ± 0,3
7t	Et	NH(CH ₂) ₂ (1-Ad)	35 ± 2	>50	>50	25 ± 3	>50	>50	>50	>50
7u	<i>t</i> -Bu	NH(CH ₂) ₂ (1-Ad)	6 ± 2	>50	13 ± 2	7 ± 2	6,0 ± 1,5	9,7 ± 0,7	6,9 ± 0,8	6,5 ± 0,6
7w	<i>t</i> -Bu	NH(CH ₂) ₂ (2-Ad)	6 ± 3	>50	16 ± 2	11,4 ± 0,9	4,4 ± 0,2	7,5 ± 0,6	8,3 ± 0,4	5 ± 2
7x	Me	NHCH(1-Ad)Ph	8 ± 3	>50	16 ± 2	15 ± 2	23 ± 4	15,0 ± 0,2	10,9 ± 0,5	14,7 ± 0,1
7y	<i>t</i> -Bu	NHCH(1-Ad)Ph	4 ± 1	26 ± 2	4,3 ± 0,3	3,3 ± 0,4	9 ± 1	10,1 ± 0,9	4,1 ± 0,3	4,3 ± 0,1
7ab	<i>t</i> -Bu		23 ± 6	>50	>50	29 ± 1	35 ± 5	39 ± 2	37 ± 1	12 ± 2

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0–10 – высокоактивно

10–20 – активно

20–50 – низкоактивно

>50 – неактивно

Из всей серии соединений, только соединения **7o** и **7y** со значениями EC_{50} в отношении шт. Абсеттаров 8 и 4 мкМ, соответственно, ингибировали репродукцию шт. 256, относящегося вместе со шт. Абсеттаров к европейскому подтипу ВКЭ. Учитывая 100% идентичность аминокислотной последовательности белков Е штаммов Абсеттаров и 256, можно было бы ожидать сходную эффективность соединения против них, но результаты оказались сильно различными.

Поскольку показано, что соединения, вероятно, взаимодействуют с белком Е, то мы определили концентрацию инфекционных вирионов (БОЕ, титрование по бляшкам в клетках СПЭВ), геном-содержащих частиц (GCP, количественная ОТ-ПЦР) и количество белка Е (количественный ИФА) в использованных в экспериментах вирусных препаратах (Таблица 57). Концентрация геном-содержащих частиц для всех препаратов была выше, чем концентрация инфекционных вирионов (БОЕ): самое высокое отношение наблюдалось у шт. 256, а самое низкое – у шт. Абсеттаров. Таким образом, препараты всех штаммов содержат неинфекционные частицы, число которых на 1-4 порядка превышает количество инфекционных частиц.

Таблица 57 – Количественная характеристика препаратов штаммов ВКЭ, использованных для определения спектра противовирусно активности 4-аминотетрагидрохиназолинов

Штамм	Концентрация вирионов (инфекционных и геном-содержащих) mean $\pm$ SD		Общее количество белка Е (mean $\pm$ SD, мг/мл)
	IgБОЕ/мл	IgGCP/мл	
Absettarov	7,1 $\pm$ 0,4**	8,3 $\pm$ 0,2*	54 $\pm$ 31
256	6,0 $\pm$ 0,1	10,5 $\pm$ 0,8	51 $\pm$ 28
Vasilchenko	7,8 $\pm$ 0,3**	9,3 $\pm$ 0,3	40 $\pm$ 11
TV08-T2546	7,3 $\pm$ 0,5**	9,3 $\pm$ 0,4	23 $\pm$ 9*
Lesopark11	6,3 $\pm$ 0,6	8,4 $\pm$ 0,5**	34 $\pm$ 11*
EK-328	6,3 $\pm$ 0,6	9,4 $\pm$ 0,5	21 $\pm$ 7*
DV 936k	6,9 $\pm$ 0,4**	9,7 $\pm$ 0,5	65 $\pm$ 25

Уровень отличия со штаммом 256: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Соотношение между количеством белка Е и количеством инфекционных вирионов у шт. 256 наибольшее, по сравнению со всеми другими штаммами. При пересчёте количества белка Е, которое должно содержаться в инфекционных вирионах и геном-содержащих частицах (Рисунок 39). Таким образом, в препарате

шт. 256 содержится большое количество белка Е, не ассоциированного с инфекционными вирионами (содержащегося в неинфекционных вирионах, агрегатах и т.п.) [Dueva et al., 2020].

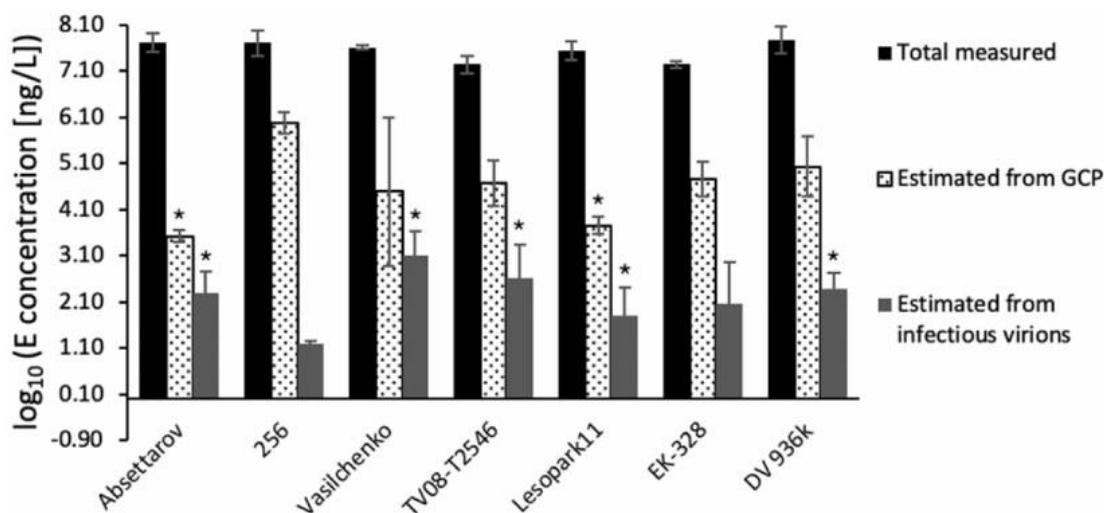


Рисунок 39 – Концентрация белка Е в вирусных препаратах: измеренная в ИФА, рассчитанная из количества БОЕ и РНК (ОТ-ПЦР) из расчёта при средней молекулярной массы белка Е ВКЭ 53 кДа и 180 молекул белка на вирусную частицу. *Соответствует значимой разнице со штаммом 256 при 0,05.

Исходя из данных результатов, можно сделать вывод, что исследуемые соединения расходуются на связывание с молекулами белка Е в неинфекционных вирионах, агрегатах и др. в препарате шт. 256 и для ингибирования того же количества инфекционных вирионов, что и у других штаммов, требуется на порядки больше молекул соединения. Это бесполезное расходование соединения делает его неактивным в исследуемых концентрациях, в которых оно активно против других штаммов [Dueva et al., 2020].

Это исследование показало, что при детекции по инфекционности, расходование соединения на неинфекционные частицы может приводить к искажению результатов определения ЕС₅₀.

Дальнейшее исследование данного феномена представлено в разделе 3.12 Результаты.

3.10.2. Сравнение противовирусной активности производных N⁶-бензиладенозина против разных штаммов ЭВ-А71

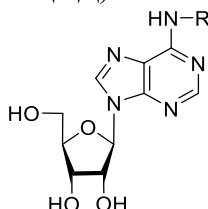
Для проведения сравнительной оценки были выбраны актуальный штамм 46973 китайского генотипа С4, который используется для постановки фенотипического скрининга, и прототипный штамм BrCr генотипа А, который многие лаборатории используют для своих исследований противовирусных препаратов (Таблица 58). Сравнение проводили по стандартной методике на растущих клетках RD против 100 ТЦД₅₀ каждого штамма ЭВ-А71 (Таблица 59).

В основном, соединения, неактивные против шт. 46973 были неактивны и против шт. BrCr, а активные были активны. При этом, в подавляющем большинстве случаев, различия между значениями ЕС₅₀ были незначимы (критерий Стьюдента, $p > 0,05$). Однако, значения активности для нескольких соединений значимо различались между штаммами ($p < 0,05$). Монозамещённые галоген-производные заместителем -CF₃ (**5p** и **5r**) или двузамещённые (**6f** и **6g**) производные обладали большей ингибирующей активностью в отношении шт. BrCr. Соединение **3c** было активно только против шт. BrCr, а **8c** – только против шт. 46973.

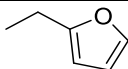
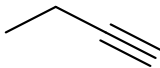
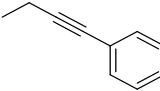
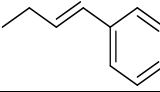
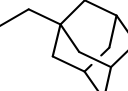
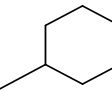
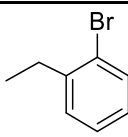
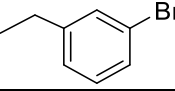
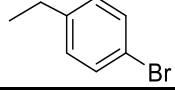
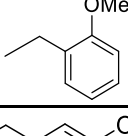
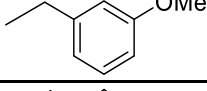
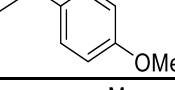
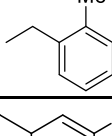
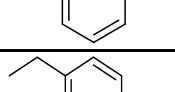
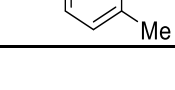
Таблица 58 – Штаммы ЭВ-А71, использованные для сравнения противовирусной активности производных N⁶-бензиладенозина

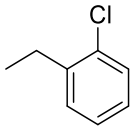
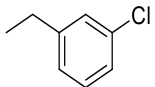
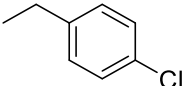
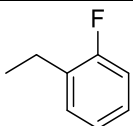
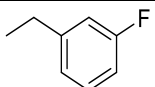
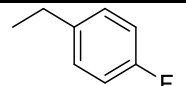
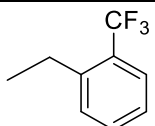
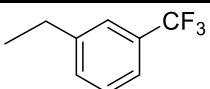
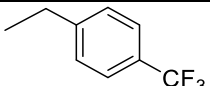
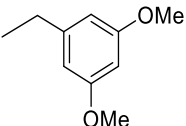
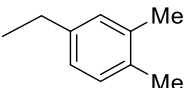
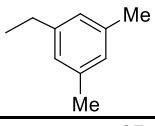
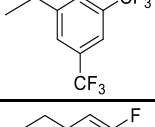
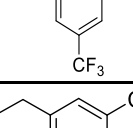
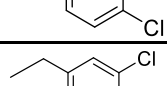
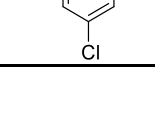
Характеристика	шт. 46973	шт. BrCr
Место выделения	Россия	США
Год выделения	2013	1973
Генотип	С4	А
GenBank ID	KJ645808	U22521.1

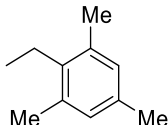
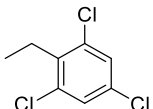
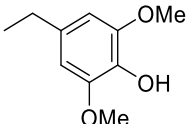
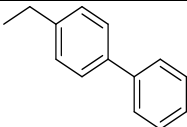
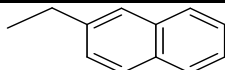
Таблица 59 – Цитотоксичность и активность производных N⁶-бензиладенозина на репродукцию энтеровирусов (по подавлению признаков ЦПД)



Шифр	Заместитель (R)	EC ₅₀ ± SEM, мкМ		p*
		46973	BrCr	
Природные цитокининовые нуклеозиды				
3b		3,6 ± 0,9	2,12 ± 0,18	0,205

Шифр	Заместитель (R)	EC ₅₀ ± SEM, мкМ		p*
		46973	BrCr	
3c		n/a**	10,4 ± 2,6	0,003***
Производные с алифатическими заместителями				
4a	Me	n/a	n/a	—****
4b	OMe	n/a	n/a	—
4d		n/a	n/a	—
4g		7,2 ± 1,6	6,2 ± 1,6	0,738
4h		5,6 ± 1,3	4,9 ± 1,6	0,790
4n		n/a	n/a	—
4o		n/a	n/a	—
Однозамещённые производные				
5a		1,50 ± 0,13	1,37 ± 0,08	0,556
5b		0,60 ± 0,05	0,58 ± 0,21	0,934
5c		6,3 ± 1,5	3,1 ± 1,5	0,229
5d		1,20 ± 0,29	0,54 ± 0,06	0,112
5e		2,02 ± 0,18	1,91 ± 0,42	0,825
5f		n/a	n/a	—
5g		4,7 ± 0,7	2,91 ± 0,47	0,123
5h		1,18 ± 0,36	1,0 ± 0,30	0,727
5i		9,7 ± 3,7	2,63 ± 0,53	0,155

Шифр	Заместитель (R)	EC ₅₀ ± SEM, мкМ		p*
		46973	BrCr	
5j		1,83 ± 0,47	1,41 ± 0,28	0,499
5k		0,85 ± 0,08	0,6 ± 0,18	0,294
5l		3,2 ± 0,6	1,37 ± 0,35	0,078
5m		1,99 ± 0,59	1,55 ± 0,35	0,567
5n		1,44 ± 0,53	1,06 ± 0,12	0,535
5o		1,43 ± 0,52	1,01 ± 0,18	0,501
5p		n/a	32 ± 13	0,025
5q		0,45 ± 0,19	0,43 ± 0,15	0,939
5r		74 ± 21	6,6 ± 1,1	0,049
Двухзамещённые производные				
6b		n/a	n/a	—
6c		0,66 ± 0,11	0,34 ± 0,14	0,229
6d		n/a	n/a	—
6e		n/a	n/a	—
6f		22 ± 4	2,52 ± 0,28	0,030
6g		0,43 ± 0,04	0,81 ± 0,05	0,009
6h		29 ± 2	2,52 ± 0,21	0,001

Шифр	Заместитель (R)	EC ₅₀ ± SEM, мкМ		p*
		46973	BrCr	
Тризамещённые производные				
7a		n/a	n/a	—
7b		n/a	n/a	—
7c		n/a	n/a	—
Производные с большими боковыми заместителями				
8a		n/a	n/a	—
8c		14 ± 4	n/a	0,004

*р считали по критерию Стьюдента. Для расчёта n/a считали как 100 ± 10; количество повторов эксперимента – 3 для обеих групп

*n/a – неактивны в нетоксичных концентрациях

*** различия статистически значимы

**** – р не рассчитывали

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,0N – высокоактивно

0,N

1-10

10–20

20–50

50–100 – низкоактивно

>100 – неактивно

Данные различия, скорее всего, связаны с индивидуальными особенностями штаммов, т.е. аминокислотными мутациями, которые их отличают. Штаммы различаются по 108 а.к. позициям, из которых 78 находятся в области, кодирующей белки репликации вируса. И 29 из этих мутаций можно назвать неконсервативными, т.е. мутантная аминокислота отличается по свойствам от исходной. Таким образом, локальные свойства белков репликативного комплекса между штаммами могут отличаться.

Ввиду того, что серотип и генотип вируса определяются по последовательности белков капсида, типовая принадлежность вируса при тестировании нуклеозидов, направленных на репликацию, вероятно, не имеет

принципиального значения. Однако, длительная эволюция активно циркулирующих в человеческой популяции энтеровирусов сильно изменила и последовательность генома в областях Р2 и Р3. Поэтому, использование актуальных штаммов является обоснованным при оценке (скрининге) противовирусной активности соединений.

Стоит отметить, что так сказать «обратная эволюция» энтеровирусов невозможна, несмотря на повторную циркуляцию вариантов и рекомбинантов генотипа А ЭВ-А71 в Китае в 2008-2010 гг., спустя 40 лет после исходного описания генотипа и выделения прототипного штамма BrCr [Liu et al., 2015]. Методами Баессовой филогении было показано искусственное попадание лабораторного вируса (т.е. штамма BrCr) в природную популяцию вируса с дальнейшей реадаптацией лабораторного штамма к естественной циркуляции [Vakulenko et al., 2019].

3.10.3. Сравнение противовирусной активности фавипиравира против разных вариантов SARS-CoV-2

Фавипиравир позиционируется как ингибитор РНК-зависимой РНК полимеразы широкого спектра РНК-содержащих вирусов, включая бетакоронавирусы [Gowen et al., 2007; Julander et al., 2009; Mendenhall et al., 2011; Rocha-Pereira et al., 2012; Shannon et al., 2020]. Попадая в клетку, фавипиравир метаболизируется до трифосфата, который распознаётся RdRp как нуклеозид и встраивается в растущую цепь РНК и далее подавляет размножение вируса по двум возможным механизмам: остановка синтеза РНК или индукция летального мутагенеза, что наиболее вероятно.

Мы провели сравнительное исследование субстанции фавипиравира против шт. ПИК35 прототипной линии В.1.1, шт. 4724d варианта Дельта и шт. 79950 варианта Омикрон линии ВА.1 (Таблица 60) по методике уменьшения урожая вируса при заражении клеток Vero с одинаковым MOI 0,01 ТЦД₅₀/клетку.

Таблица 60 – Штаммы SARS-CoV-2, использованные для сравнения противовирусной активности фавипиравира

Характеристика	шт. ПИК35	шт. 4724d	шт. 7995o
Вариант	–	Дельта	Омикрон
Месяц и год выделения	04.2020	08.2021	12.2021
Линия Pango	B.1.1	B.1.617	BA.1
GISAID	EPI_ISL_428852	EPI_ISL_8799478	EPI_ISL_9613539

Фавипиравир ингибировал репродукцию всех трёх исследованных вариантов SARS-CoV-2 в сходных и сравнительно высоких концентрациях ($EC_{50} > 300$ мкМ) (Таблица 61). При этом можно заметить, что ингибирование штамма прототипной линии B.1.1 ПИК35 было в 1,5 раза более эффективным, тем не менее, показатели ингибирования штаммов разных вариантов статистически достоверно не различались. Такими значениями можно пренебречь при подборе дозы в рамках доклинических и клинических испытаний.

Таблица 61 – Активность субстанции фавипиравира против различных штаммов SARS-CoV-2 (по подавлению признаков ЦПД)

Штамм		ПИК35	4724d	7995o
Вариант SARS-CoV-2		–	Дельта	Омикрон
$EC_{50} \pm SD$, мкМ	Фавипиравир	309 ± 149	460 ± 64	489 ± 10
	ННС	<3,125	<3,125	<3,125

Эти данные соответствуют генетическим различиям данных штаммов, которые незначительны в области репликазно-транскриптного комплекса, с белками которого непосредственно взаимодействует фавипиравир. Основные различия вариантов SARS-CoV-2 относятся к структурной области и последовательности белка S. Поэтому, любой из данных штаммов может быть использован для скрининга соединений, предположительно направленных на неструктурные белки.

Однако, ввиду активной циркуляции и эволюции SARS-CoV-2, возможна следующая тактика выбора штамма для фенотипического скрининга:

- если нет различий в области взаимодействия с лекарством, выбрать можно любой штамм, но стоит отдавать предпочтение актуальным вариантам;
- если есть замены в области взаимодействия с лекарством или механизм неизвестен, выбор отдавать актуальным вариантам;
- если генетически различные варианты циркулируют параллельно, то обязательно определять спектр активности против нескольких вариантов.

3.11. Подходы к выбору дозы вируса для фенотипического скрининга по ингибированию репродукции вируса в культуре клеток

3.11.1. Активность препаратов против 50 и 200 ТЦД₅₀ SARS-CoV-2 при оценке по подавлению ЦПД в культуре клеток Vero

Сравнительный эксперимент был проведён на шт. ПИК35 SARS-CoV-2 и нескольких соединениях, включая X (оригинальная молекула, представляющая собой гибридный белок, который состоит из внеклеточного домена человеческого ACE2 и Fc-фрагмента человеческого IgG), препарата молнупиравир (пролекарство ННС) и ННС в качестве контрольного препарата. Ещё 3 препарата приводятся без описания. Использовали стандартную методику фенотипического скрининга по ингибированию ЦПД с использованием 2 доз вируса – минимально (50 ТЦД₅₀) и максимально (200 ТЦД₅₀) приемлемых для использования метода Кербера для расчёта ЕС₅₀. Эксперимент был поставлен 2 раза с 4-мя репликатами в каждой постановке, для увеличения точности определения ЦПД в каждом разведении соединения. На основании полученных данных были построены кривые ингибирования и рассчитаны значения ЕС₅₀ (Рисунок 40 и Таблица 62).

Обе использованные дозы вируса (50 и 200 ТЦД₅₀) дают 100% ЦПД во всех 8 лунках с клетками Vero на 5 сутки после заражения. Только титрование рабочего

разведения вируса позволяет зафиксировать различие в добавленном количестве вируса. Однако, кривые ингибирования X и соединения №1 довольно сильно сдвигаются в сторону высоких концентраций при увеличении дозы вируса (Рисунок 40).

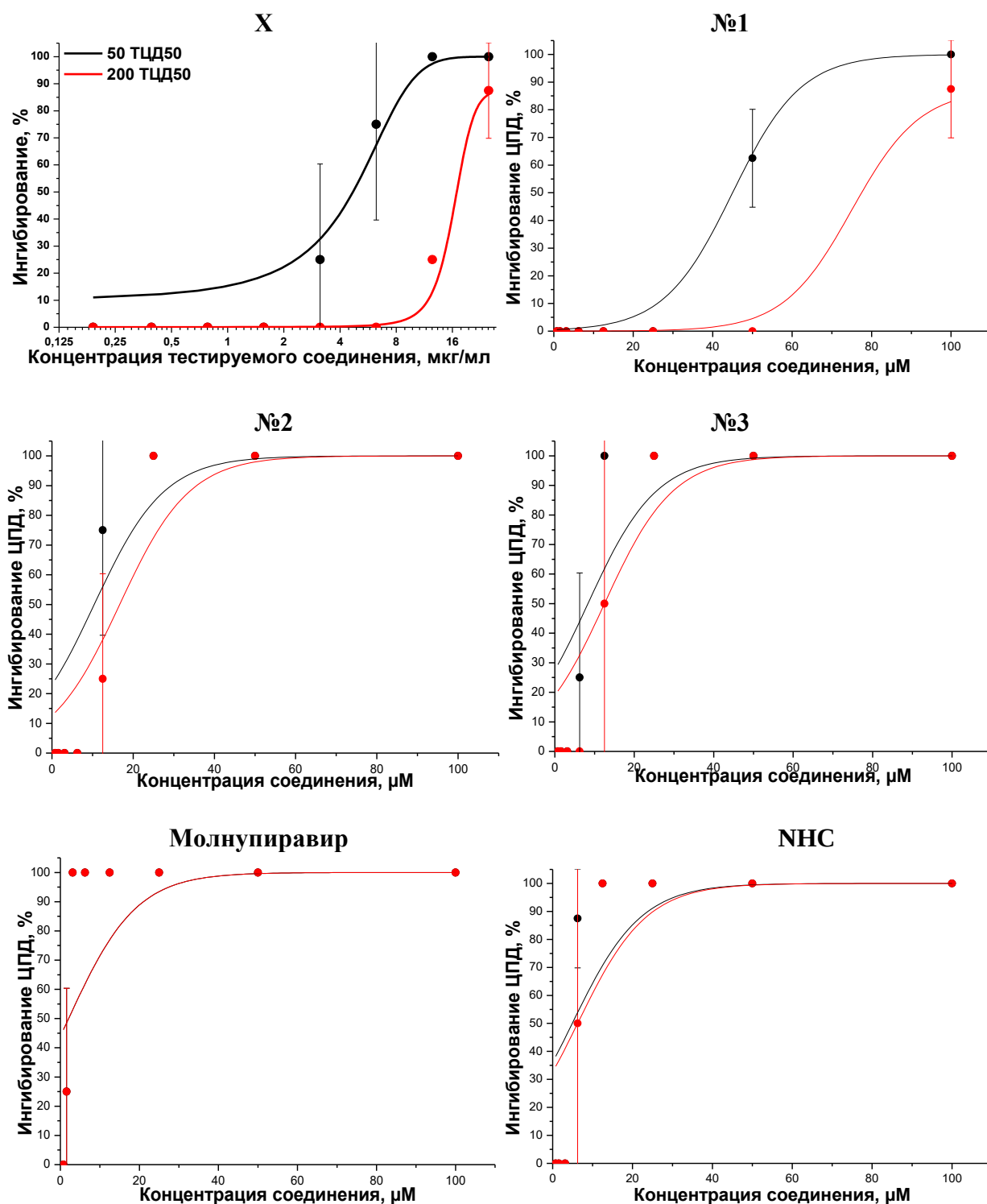


Рисунок 40 – Кривые ингибирования SARS-CoV-2-индуцированного ЦПД тестируемыми соединениями в клетках Vero. Точки представлены как $M \pm SD$. Чёрные точки и кривые – значения при дозе 50 ТЦД₅₀; красные точки и кривые – значения при дозе 200 ТЦД₅₀.

Таблица 62 – Активность тестируемых соединений против репродукции шт. ПИК35 вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero (по подавлению ЦПД)

Соединение	Предполагаемый механизм действия	EC ₅₀ ±SEM, мкМ		p (тест Стьюдента)*
		50 ТЦД ₅₀	200 ТЦД ₅₀	
X	ингибирования связывания с рецептором	0,021 ± 0,007	0,738 ± 0,006	0,003**
№1	неизвестно	55 ± 7	77 ± 7	0,077
№2	неизвестно	10,7 ± 2,6	15,1 ± 2,6	0,285
№3	неизвестно	7,5 ± 1,8	13,3 ± 6,3	0,417
Молнупиравир	летальный мутагенез	1,90 ± 0,46	1,90 ± 0,46	1
NHC	летальный мутагенез	4,10 ± 0,50	6,60 ± 3,10	0,462

* количество экспериментов 4

**различия статистически значимы

При этом, рассчитанные по кривым значения EC₅₀ достоверно различаются для X (p=0,003) и почти достоверно – для соединения №1 (p=0,077). Расхождение кривых ингибирования для соединений №2 и №3 заметно, но не значимо; для молнупиравира и NHC – кривые почти полностью совпадают. Активность соединений с малыми (микромольными) значениями EC₅₀ меньше изменялась с повышением дозы вируса. Однако X имело наномольное значение EC₅₀ при 50 ТЦД₅₀, которое возросло в 35 раз при увеличении дозы вируса в 4 раза, что можно объяснить механизмом его действия и расходом соединения на большее количество вирионов. Тогда как соединения, действующие на стадии репликации и транскрипции вируса менее подвержены такому эффекту.

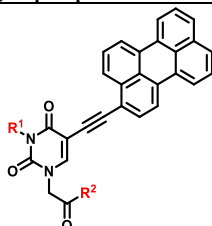
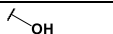
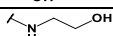
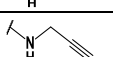
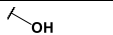
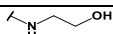
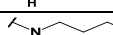
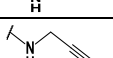
Таким образом, в зависимости от свойств (например, механизма действия) ингибитора даже незначительные колебания дозы вируса могут приводить к статистически значимым различиям значений EC₅₀.

3.11.2. Активность препаратов против 25 и 200 ТЦД₅₀ (25 и 72 БОЕ) ЧИКВ при оценке по подавлению ЦПД и бляшкообразования в культуре клеток Vero

Сравнение активности соединений в зависимости от дозы ЧИКВ проводили с использованием RAFI – производных периленовых нуклеотидов. Зависимость активности EC₅₀ соединений от дозы вируса сравнивали в одном эксперименте по

подавлению признаков ЦПД и бляшкообразования: готовили смеси ЧИКВ с последовательными разведениями ингибиторов, после чего смеси параллельно добавляли к клеткам Vero с последующей детекцией ЦПД и бляшек. ННС использовали в качестве контрольного препарата (Таблица 63 – Активность производных периленовых нуклеотидов на репродукцию ЧИКВ (по подавлению ЦПД и бляшкообразования)).

Таблица 63 – Активность производных периленовых нуклеотидов на репродукцию ЧИКВ (по подавлению ЦПД и бляшкообразования) при разной дозе вируса

					
Тест подавления бляшкообразования ЧИКВ					
Шифр	R ¹	R ²	25 БОЕ, EC ₅₀ ± SEM, мкМ	72 БОЕ, EC ₅₀ ± SEM, мкМ	р (тест Стьюдента)*
cm1pUY11	POM		0,0170 ± 0,0002	0,088 ± 0,002	0,0000**
cm6pUY11			0,0036 ± 0,0003	0,094 ± 0,032	0,037**
cm5pUY11			0,0017 ± 0,0002	0,079 ± 0,026	0,031**
Тест подавления признаков ЦПД ЧИКВ					
Шифр	R ¹	R ²	25 ТЦД ₅₀ , EC ₅₀ ± SEM, мкМ	178 ТЦД ₅₀ , EC ₅₀ ± SEM, мкМ	р (тест Стьюдента)*
cm1pUY11	POM		0,027 ± 0,005	0,27 ± 0,09	0,043**
cm6pUY11			0,007 ± 0,001	0,68 ± 0,32	0,089
cm7pUY11			0,007 ± 0,001	0,53 ± 0,18	0,034**
cm5pUY11			0,003 ± 0,001	0,21 ± 0,04	0,004**
ННС			3,77 ± 0,65	2,65 ± 0,89	0,356

* количество экспериментов 4

** различия статистически значимы

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,0N – высокоактивно

0,N – активно

1-4 – низкоактивно

>4 – неактивно

*p < 0,05

Обе использованные дозы вируса дают 100% ЦПД во всех 8 лунках с клетками Vero на 3 сутки после заражения. Только титрование рабочего разведения

вируса позволяет зафиксировать различие в добавленном количестве вируса. Значения EC_{50} для RAFI, полученные по подавлению бляшкообразования, были ниже, чем значения, полученные по подавлению ЦПД, как уже было показано в разделе 3.5.2. При этом, для RAFI значения EC_{50} достоверно различались в экспериментах с разной дозой вируса в обеих тест-системах. Исключение стали значения активности соединения стбрUY11 в тесте подавления ЦПД, где различие между EC_{50} составляет 97 раз, однако статистически недостоверно из-за высокого значения ошибки среднего при высокой дозе вируса.

Однако для ННС значения EC_{50} в тесте подавления ЦПД составили $3,77 \pm 0,65$ мкМ и $2,65 \pm 0,89$ мкМ при низкой и высокой дозах вируса, что коррелирует с данными, полученными для ингибирования этим соединением разных доз SARS-CoV-2 (раздел 3.11.1).

Таким образом, увеличение дозы вируса привело к статистически достоверному увеличению значения EC_{50} для RAFI, действующих на вирионы при проникновении вируса, но не ННС, действующего на стадии репликации/транскрипции вирусного генома.

Суммируя полученные данные, можно сделать вывод, что в зависимости от свойств (например, механизма действия) ингибитора даже незначительные колебания дозы вируса могут приводить к статистически значимым различиям значений EC_{50} в тестах ингибирования ЦПД и бляшкообразования вирусов SARS-CoV-2 и ЧИКВ.

3.12. Влияние характеристик препарата вируса на результаты фенотипического скрининга по ингибированию репродукции вируса в культуре клеток на примере ВКЭ

Инфекционная вирусная частица – это вирион, который способен проникнуть в клетку и произвести продуктивную инфекцию с образованием полноценного инфекционного вирусного потомства. Для это у вириона должны быть интактные

поверхностные белки для связывания с рецепторами и проникновения в клетку, интактный геном, способный к трансляции и репликации, и кодирующий функциональные белки. Однако, у всех вирусов есть неинфекционные частицы, случайно или специально образующиеся в процессе жизненного цикла вируса. Это могут быть пустые капсиды без геномов, капсиды с неполным геномом, незрелые капсиды с поверхностными белками в неправильной конформации и т.п.

В жизненном цикле ортофлавириусов и ВКЭ, в частности, вирионы могут существовать в различных формах: фузогенной (перед слиянием мембран), незрелой (с нерасщеплёнными белками ргМ), частично зрелыми и зрелыми. Все эти частицы содержат геномы, но различаются конформацией основного поверхностного белка Е (раздел 1.4.1). Наличие большого количества таких частиц было показано электронной микроскопией в препаратах ВКЭ [Fuzik et al., 2018] и других ортофлавириусов [Junjhon et al., 2010].

Для выяснения влияния неинфекционных частиц на результаты фенотипического скрининга по ингибированию репродукции бляшкообразования ВКЭ в культуре клеток СПЭВ были получены препараты, обогащённые неинфекционными вирионами, и проведена сравнительная оценка противовирусной активности двух адамантилметилловых эфиров 5-аминоизоксазол-3-карбоновой кислоты, противовирусная активность которых была показана ранее (раздел 3.3.3.5). Эксперименты проводились к.б.н. Тучинской К.К. и Кучиной (Илларионовой) В.В. при участии автора данной работы.

Незрелые вирионы были получены путём добавления 20 мМ хлорида аммония через 1 и 5 ч после заражения клеток СПЭВ шт. ЭК-328 ВКЭ (МОИ 1 БОЕ/кл), который разрушает транспорт через АГ и блокирует протеолитическое расщепление ргМ в составе вирионов, что, в свою очередь, мешает правильной укладке белков Е и их переход в фузогенную форму, необходимую для заражения клеток. Препараты зрелого вируса шт. ЭК-328 ВКЭ были получены в процессе нормальной инфекции клеток СПЭВ с той же множественностью. Оба препарата были сконцентрированы ультрацентрифугированием для последующего

использования. Количество инфекционных частиц определяли в препаратах путём титрования по бляшкам под метилцеллюлозным покрытием в клетках СПЭВ, количество геном-содержащих частиц определяли в количественной ОТ-ПЦР (Таблица 64). В препаратах зрелых вирионов количество неинфекционных (GCP) к инфекционным (БОЕ) частиц составило $1:10^3$ - 10^4 , что является нормальным; а в препаратах незрелых вирионов на 5 порядков больше: $1:10^7$ - 10^8 . Результаты трансмиссионной электронной микроскопии также показали преобладание частиц диаметром 50-55 нм с гладкой поверхностью в препарате незрелых вирионов, которые были описаны ранее [Allison et al., 2003]. Таким образом, удалось обогатить препараты неинфекционными частицами, соответствующими описанным ранее.

Таблица 64 – Количество инфекционных (геном-содержащих, GCP) и инфекционных (БОЕ) частиц в используемых препаратах (исходных и концентрированных)

Препарат	Вирусная РНК, IgGCP/мл	Инфекционный титр, IgБОЕ/мл	Соотношение GCP к БОЕ (Ig)
Незрелый	10.1±0.1	3.0±0.1	7.0±0.2
Незрелый конц.	13.4±0.1	5.0±0.6	8.4±0.6
Зрелый	11.7±0.3	8.4±0.2	3.3±0.3
Зрелый конц.	14.0±0.6	9.5±0.3	4.4±0.7

Данные препараты были использованы для оценки противовирусной активности адамантилметиловых эфиров 5-аминоизоксазол-3-карбоновой кислоты **4j** и **4o** (раздел 3.3.3.5) в реакции ингибирования бляшкообразования против шт. ЭК-328 ВКЭ в культуре клеток СПЭВ – стандартной методике фенотипического скрининга против дозы вируса в 30-40 БОЕ (инфекционных вирионов). Оценку проводили против вирусных смесей с различным соотношением инфекционных и неинфекционных частиц (Рисунок 41 и Таблица 65).

Исходно оба соединения ингибируют образование бляшек с EC_{50} $39,56 \pm 0,44$ мкМ для **4j** и $7,00 \pm 1,4$ мкМ для **4o**, соответственно. При увеличении доли незрелых неинфекционных частиц ингибирующий эффект резко снижался: для соединения **4o** наблюдался дозозависимый эффект пропорционально доли незрелых частиц; соединение **4j** обладало менее выраженным ингибирующим

действием, которое уменьшалось до недетектируемого уровня при добавлении незрелых вирионов (Рисунок 41). Также, оба соединения оказались неактивными в исследуемом диапазоне концентраций против незрелого вируса [Tuchynskaya et al., 2021].

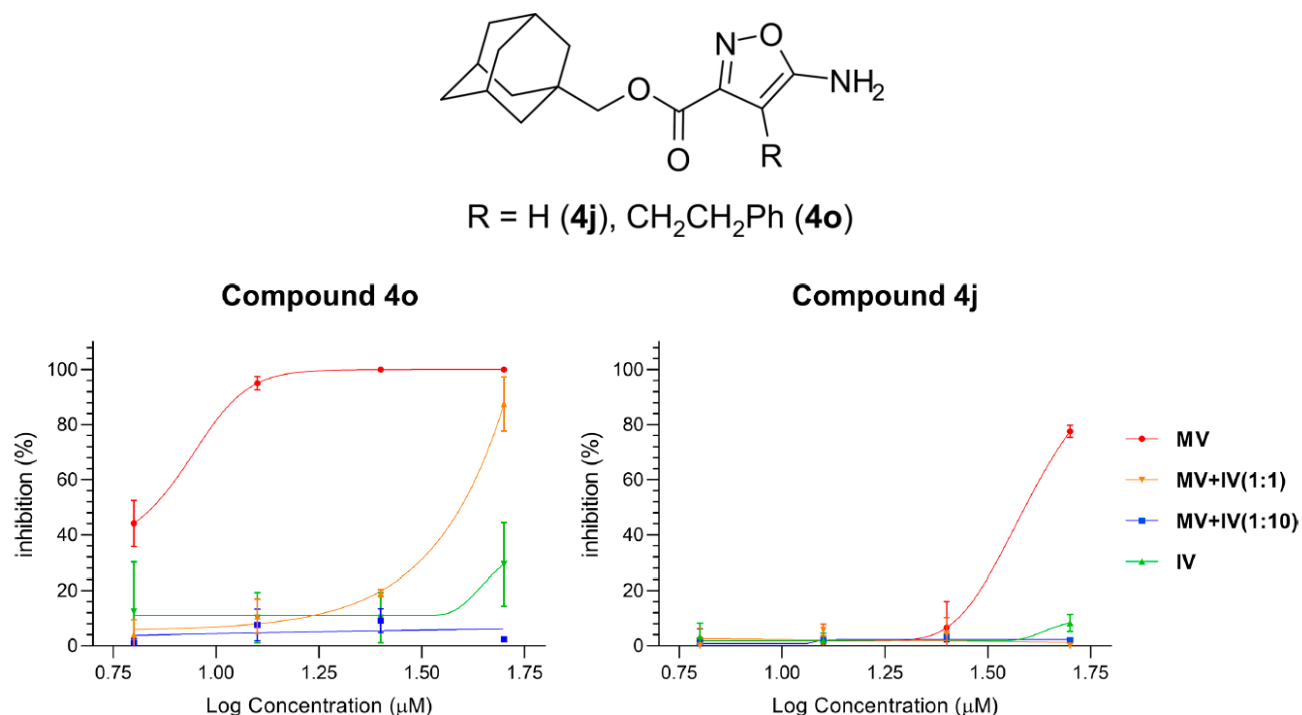


Рисунок 41 – Кривые ингибирования для соединений **4j** и **4o** против препаратов ВКЭ с различным содержанием незрелых частиц: MV – 5lgGCP/мл; MV+IV (1:1) – смесь MV 5lgGCP/мл и IV 6lgGCP/мл (1:1); MV+IV (1:10) – смесь MV 5lgGCP/мл и IV 6lgGCP/мл (1:10); IV – 6lgGCP/мл

Таблица 65 – Противовирусная активность соединений **4j** и **4o** в отношении препаратов ВКЭ с различным содержанием незрелых частиц при одинаковой дозе инфекционного вируса (БОЕ)

Препарат шт. ЭК-328		EC ₅₀ , мкМ	
зрелость	lg (геном-содержащие частицы /мл)	4j	4o
зрелые	5,0	39.56±0.4	7.00±1.4
незрелые	6,0	>50	>50
незрелые	6,7	>50	>50

Таким образом, было подтверждено высказанное ранее предположение, что соединение расходуется на неинфекционные вирионы, и его активность становится недетектируемой в исследуемом диапазоне концентраций.

3.13. Сравнение результатов фенотипического скрининга противовирусной активности в культуре клеток, проведённых разными методами

3.13.1. Сравнение результатов фенотипического скрининга активности против ЭВ-А71 в культуре клеток RD с оценкой по ЦПД и доле жизнеспособных клеток, полученных разными лабораториями

Исследование по скринингу противовирусной активности №6-бензиладенозинов было проведено параллельно двумя лабораториями: нами и лабораторией вирусологии и химиотерапии, Институт Рега, Лёвен, Бельгия (J. Neyts). Лаборатории оценивали активность против прототипного шт. BrCr генотипа А ЭВ-А71. При этом, лаборатории используют сходные клеточные тесты, оценивают активность соединения по способности ингибировать вирус-индуцированное ЦПД в клетках RD, но результат фиксируют по-разному: мы методом световой микроскопии с расчётом значения EC_{50} по методу Кербера, а Институт Рега – по жизнеспособности клеток в МТТ с расчётом значения EC_{50} путём построения кривой ингибирования (Таблица 66).

Подробности разработанной нами методики описаны выше (раздел 3.4), подробности для Института Рега почерпнуты из статей (ссылки приведены вместе с результатами скрининга). Также противовирусная активность части соединений была оценена нами в методике, сходной с описанной для Института Рега (раздел 3.4.2) (Таблица 67).

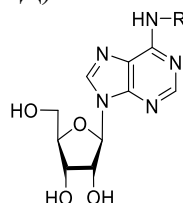
Значения активностей против шт. BrCr ЭВ-А71, в основном, согласуются между двумя лабораториями, при этом большинство неактивных соединений неизменно неактивны (всего 5 производных). Однако, 7 соединений не были активны в наших исследованиях, но были активны в тесте Института Рега, при этом значения EC_{50} сильно варьировали: >10 мкМ – 2 (**4n**, **8a**), 1-10 мкМ – 3 (**5f**, **6b**, **7a**), <1 мкМ – 2 (**7b**, **8c**) – и относились, в основном, к тризамещённым производным и производным с объёмными заместителями. Для 15 из 38 соединений значения EC_{50} достоверно отличались между лабораториями (Таблица 67). Значения pEC_{50} у Института Рега, как правило, на порядок выше и охватывают меньший диапазон

(1,05 единицы) по сравнению со значениями, полученными нами (1,24 единицы) (Рисунок 42).

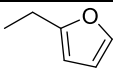
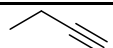
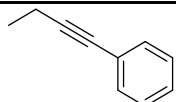
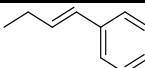
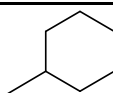
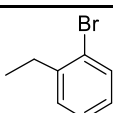
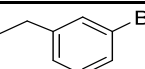
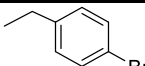
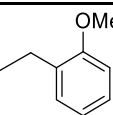
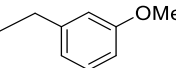
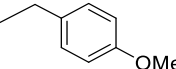
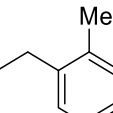
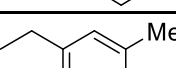
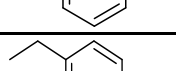
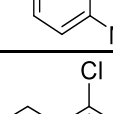
Таблица 66 – Сравнительный анализ схем постановки эксперимента: во ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) (Москва, Россия) и Институте Рега (Лёвен, Бельгия)

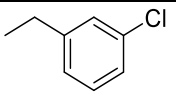
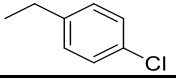
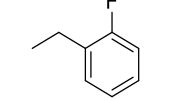
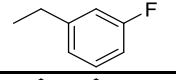
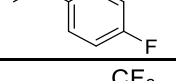
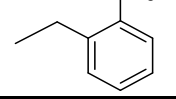
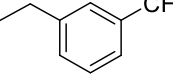
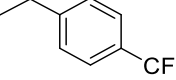
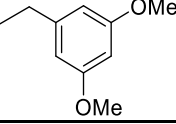
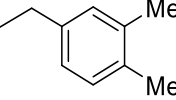
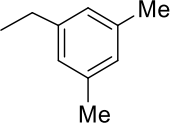
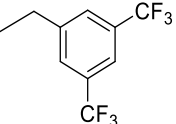
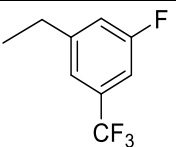
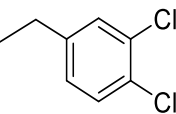
Характеристика	Институт полиомиелита		Институт Рега	Примечание
Культура клеток	RD		RD	у Реги неизвестен пассаж, Полио пассаж контролируется
Происхождение культуры клеток	NIBSC		?	?
Штамм	BrCr		BrCr	–
Генотип	А		А	–
Происхождение штамма	NIBSC (напрямую)		NIBSC (из NL RIVM, Нидерланды)	у Реги неизвестна пассажная история штамма, но вряд ли большая
Доза вируса в эксперименте	100 ТЦД ₅₀		100 ТЦД ₅₀	у Полио доза контролируется, у Реги – неизвестно
Определение действия вируса	Гибель клеток		Гибель клеток	–
Время учёта	5 сутки		при наступлении 100% ЦПД в контроле	у Реги может быть низкая доза вируса, но эксперимент всё равно будет учтён как валидный
Метод учёта	Микроскопия	Резаурин	МТТ	–
Расчет ЕС ₅₀	Метод Кербера	Аппроксимация	Аппроксимация	–

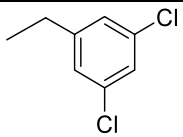
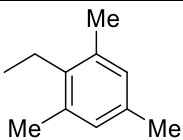
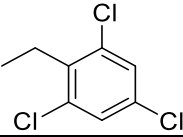
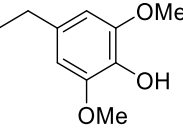
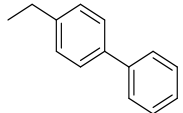
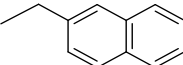
Таблица 67 – Цитотоксичность и активность производных N⁶-бензиладенозина на репродукцию энтеровирусов (по подавлению признаков ЦПД)



#	Заместитель (R)	EC ₅₀ ± SEM, мкМ			p (тест Стьюдента)*
		Институт полиомиелита		Институт Рега	
		По ЦПД	По метаболизму клеток		
		BrCr	BrCr	BrCr	
Природные цитокининовые нуклеозиды					
3b		2,12 ± 0,25	ND**	0,28 ± 0,04 ^a	0,005***

#	Заместитель (R)	EC ₅₀ ± SEM, мкМ			p (тест Стьюдента)*
		Институт полимиелита		Институт Рега	
		По ЦПД	По метаболизму клеток		
		BrCr	BrCr	BrCr	
3c		10,4 ± 3,7	ND	1,4 ± 0,2 ^a	0,094
Производные с алифатическими заместителями					
4b	OMe	n/a	ND	n/a ^d	—****
4d		n/a	ND	n/a ^b	—
4g		6,17 ± 2,2	4,60	0,58 ± 0,08 ^a	0,085
4h		4,9 ± 2,3	2,30	0,66 ± 0,08 ^a	0,163
4n		n/a	ND	40,5 ± 0,4 ^d	0,009
4o		n/a	ND	n/a ^d	—
Однозамещённые производные					
5a		1,37 ± 0,12	<0,81	2,527 ^d	0,679
5b		0,58 ± 0,3	<0,81	<0,078 ^d	0,204
5c		3,12 ± 2,1	ND	0,429 ^d	0,2984
5d		0,54 ± 0,08	<0,81	0,4 ± 0,3 ^d	0,683
5e		1,91 ± 0,6	2,30	0,188 ^d	0,071
5f		n/a	ND	7,1 ± 0,3 ^d	0,003
5g		2,91 ± 0,67	ND	0,49 ± 0,02 ^d	0,037
5h		1,0 ± 0,42	ND	0,28 ± 0,07 ^d	0,189
5i		2,63 ± 0,75	ND	0,39 ± 0,06 ^d	0,059
5j		1,41 ± 0,4	1,15	0,09 ^d	0,049

#	Заместитель (R)	EC ₅₀ ± SEM, мкМ			p (тест Стьюдента)*
		Институт полимиелита		Институт Рега	
		По ЦПД	По метаболизму клеток		
		BrCr	BrCr	BrCr	
5k		0,6 ± 0,25	<0,81	<0,07 ^d	0,134
5l		1,37 ± 0,5	ND	0,28 ^d	0,153
5m		1,55 ± 0,5	ND	0,30 ± 0,04 ^c	0,088
5n		1,06 ± 0,17	1,15	0,24 ± 0,06 ^c	0,020
5o		1,01 ± 0,25	ND	0,14 ± 0,04 ^c	0,041
5p		32,1 ± 19,0	9,21	1,0 ± 0,1 ^c	0,200
5q		0,43 ± 0,21	ND	0,068 ± 0,001 ^c	0,183
5r		6,6 ± 1,6	6,51	1,0 ± 0,1 ^c	0,040
Двухзамещённые производные					
6b		n/a	ND	5,8 ± 0,6 ^d	0,003
6c		0,34 ± 0,2	<0,81	0,52 ^d	0,768
6d		n/a	4,60	0,5 ± 0,2 ^d	0,439
6e		n/a	ND	n/a ^d	—
6f		2,52 ± 0,4	1,15	0,286 ^d	0,020
6g		0,81 ± 0,07	ND	1,21 ± 0,8 ^d	0,653

#	Заместитель (R)	EC ₅₀ ± SEM, мкМ			p (тест Стьюдента)*
		Институт полимиелита		Институт Рега	
		По ЦПД	По метаболизму клеток		
		BrCr	BrCr	BrCr	
6h		2,52 ± 0,3	ND	0,21 ^d	0,008
Тризамещённые производные					
7a		n/a	ND	4,2 ± 0,4 ^d	0,002
7b		n/a	ND	0,87 ± 0,06 ^d	0,002
7c		n/a	ND	n/a ^d	—
Производные с большими боковыми заместителями					
8a		n/a	ND	14 ± 6 ^d	0,005
8c		n/a	ND	0,33 ± 0,06 ^d	0,002

*p считали по критерию Стьюдента. Для расчёта n/a считали как 100 ± 10; количество экспериментов – 3 для обеих групп

**ND – не исследовали

*** различия статистически значимы

*n/a – неактивны в нетоксичных концентрациях

**** – p не рассчитывали

a – Drenichev et al., 2016

b – Tararov et al., 2015

c – Oslovsky et al., 2017

d – неопубликованные данные совместного исследования

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

0,0N – высокоактивно

0,N

1-10

10–20

20–50

50–100 – низкоактивно

>100 – неактивно

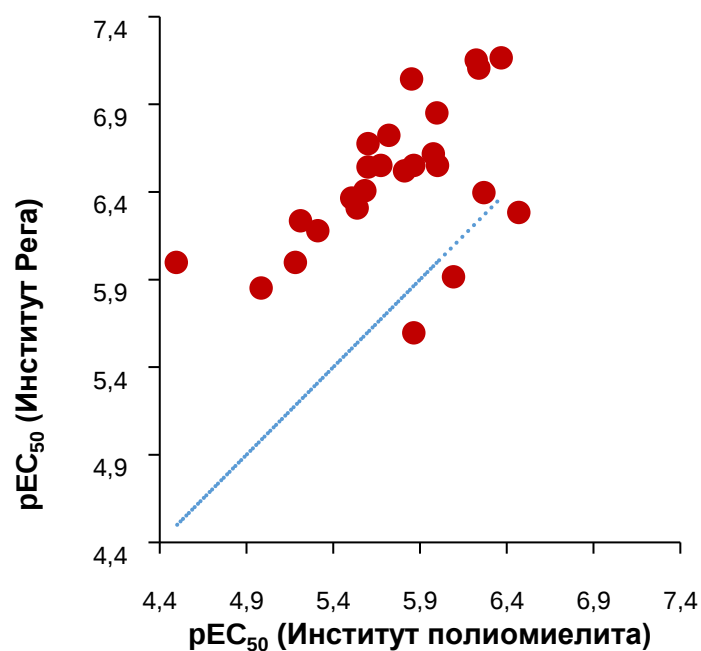


Рисунок 42 – Корреляция значений pEC_{50} ЭВ-А71 для соединений, идентифицированных как активные против обоих штаммов

Тенденция к более высокой активности соединений у Института Рега может быть результатом, например, отсутствия контроля дозы в эксперименте, поскольку учёт реакции проводится при наступлении 100% ЦПД в отрицательном контроле (как указано в методике в статьях). Эксперимент будет учтён как валидный независимо от времен наступления ЦПД (1 сутки п.и. или 3-4 сутки п.и.), хотя его позднее проявление может быть связано с низкой дозой вируса.

Однако, это не объясняет микромолярную и субмикромолярную активность у Института Рега соединений, неактивных в наших экспериментах. Возможно, это ложноположительные результаты, полученные для независимых репликатов в одной постановке в ходе высокопроизводительного скрининга без последующей проверки результатов.

Таким образом, возможно несовпадение результатов, полученных разными лабораториями в очень сходных клеточных тестах. Каждый такой случай требует отдельного рассмотрения и верификации.

3.13.2. Сравнение результатов фенотипического скрининга противовирусной активности в культуре клеток, проведённых разными методами, для одной серии производных периленовых нуклеозидов против оболочечных вирусов

Противовирусная активность серии производных периленовых нуклеозидов была оценена против ВКЭ в реакции подавления бляшкообразования (раздел 3.3.3.1), против ЧИКВ (раздел 3.5.3.2) и SARS-CoV-2 (раздел 3.7.3.5) в реакции подавления ЦПД. Обобщённые результаты представлены в виде pEC_{50} (Рисунок 43) [Chistov et al., 2023].

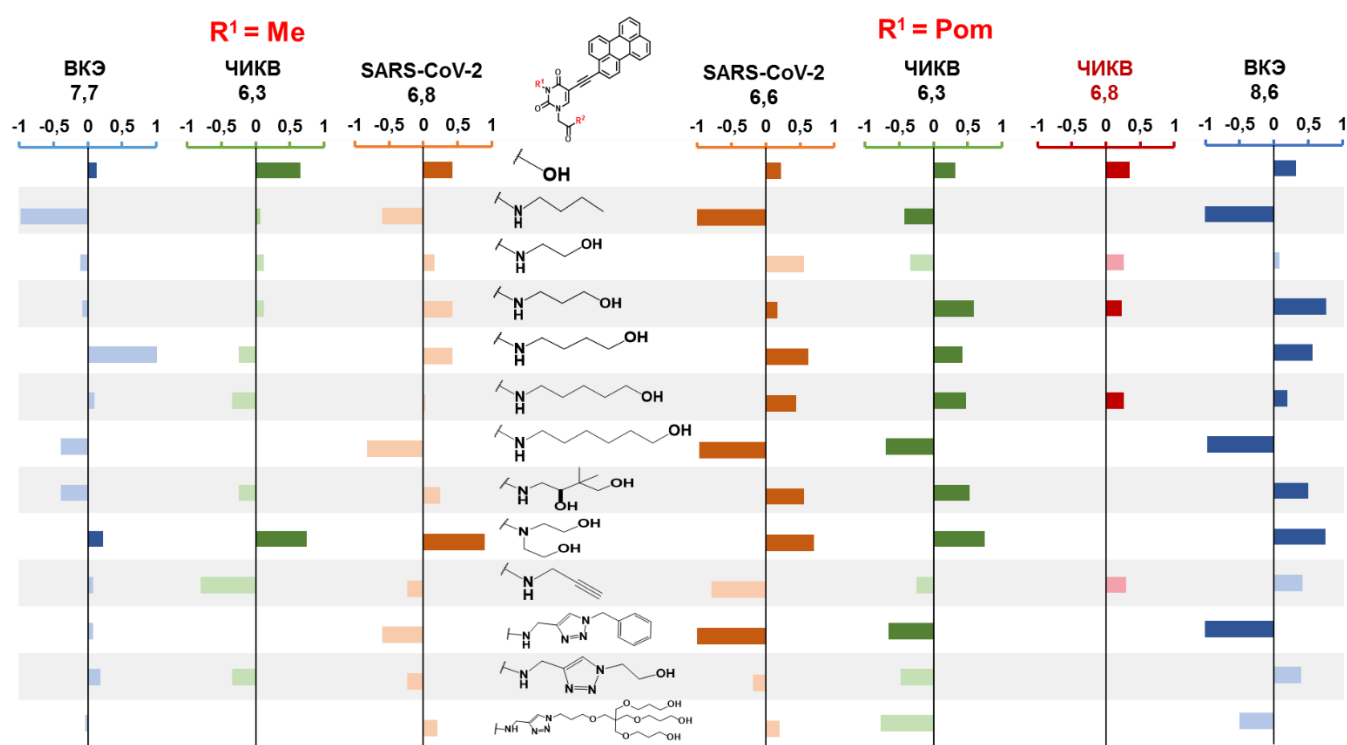


Рисунок 43 – Активность (pEC_{50}) производных периленовых нуклеозидов против ВКЭ (подавление бляшкообразования), ЧИКВ (подавление ЦПД и бляшек – **выделено красным**) и SARS-CoV-2 (подавление ЦПД). Каждая вертикальная ось соответствует средней противовирусной активности в ряду N^1 -заместителей (среднее значение pEC_{50}) показано над осью. Каждая полоса представляет собой отличие активности от среднего значения в зависимости от N^1 -заместителя. Каждая строка соответствует одному N^1 -заместитель, слева данные для ряда N^3 -Me, справа для ряда N^3 -Pom. Значения со сходными тенденциями показаны темным оттенком цвета.

В основном, соединения с повышенными и пониженными значениями активности коррелируют между вирусами, что особенно выражено в ряду с N^3 -Pom

заместителем. Значения $рЕС_{50}$ для ВКЭ, определённые по подавлению образования бляшек, на 1,5-2 ниже, чем таковые для ЧИКВ и SARS-CoV-2, определённые по подавлению ЦПД. Более того, для значения $рЕС_{50}$, полученные по подавлению бляшкообразования ЧИКВ, ниже, по сравнению со значениями $рЕС_{50}$, полученными по подавлению ЦПД на 0,5. Несмотря на то, что различия между различными методиками для ЧИКВ статистически незначимы (раздел 3.5.2), вместе с данными для ВКЭ, можно высказать предположение, что такое различие значений $ЕС_{50}$ скорее связано с особенностями методики подавления бляшкообразования, чем с большей чувствительностью ВКЭ к данным соединениям.

3.14. Подходы к стандартизации параметров фенотипической оценки противовирусной активности по ингибированию репродукции вируса в культуре клеток

Клеточный фенотип сложен, поскольку он является суммой состояния активности многих путей. Чтобы надёжно описать фенотип, необходимы мультиплексные измерения тех путей, которые могут различать фенотипы и на уровне производительности, которая требуется на ранней стадии разработки (обычно от сотен до тысяч соединений на скрининг). Часто существует обратная зависимость между уровнем мультиплексирования теста и производительностью теста: в то время как высокопроизводительный скрининг (HTS) с одним считыванием может отображать более миллиона соединений в неделю, высокомультиплексированные тесты с десятками тысяч считываемых параметров часто на много медленнее и дороже. При выборе подходящих технологий профилирования важно найти баланс между этими двумя характеристиками и рассмотреть, как полученные данные будут интерпретироваться и использоваться для комплексной стратификации. Например, сортировка хитов HTS на ранней стадии требует высокой производительности, тогда как исследования по определению механизма действия и токсичности соединения, для которых важна

механистическая информация, требуют большего диапазона считываний [Feng et al., 2009].

Выбор непосредственной методики фенотипической оценки противовирусной активности определяется целями исследования:

- для анализа больших библиотек соединений подходят скрининговые методики, с оценкой активности в одной концентрации;
- для получения значений активности необходимо определение зависимости активности и цитотоксичности от концентрации соединения и расчёта индекса селективности;
- при этом методики ингибирования бляшкообразования будут давать заведомо более низкие значения EC_{50} , чем ингибирования вирус-индуцированного ЦПД;
- для определения механизма действия целесообразно начать с анализа зависимости активности соединения от времени его добавления к заражённым клеткам (эксперимент Time-of-Addition).

Выбор клеток определяется достаточно очевидным параметром: клетки должны быть пермиссивны для исследуемого вируса. При этом выбор клеток неразделим с выбором метода детекции:

- ЦПД и бляшкообразование требует, чтобы вирус вызывал ЦПД в клеточной культуре
- детекцию вирусных антигенов или РНК можно проводить и на клетках, не погибающих при вирусной репродукции.

В дальнейшем выбор репортера, т.е. способа детекции репродукции вируса, должен быть наиболее дешёвым и наименее трудоёмким среди доступных. Однако любая система должна быть откалибрована с использованием референтных соединений для воспроизводимости результатов с отработкой параметров и контролей в каждом эксперименте (положительный, отрицательный, контроль дозы вируса и т.п.).

Также стоит помнить, что свойства соединений могут искажать результаты эксперимента: окрашенные или плохо растворимые при физиологических условиях соединения могут искажать данные колориметрических тестов; флуоресцентные соединения – искажать измерения флуоресценции репортеров. Как и для некоторых методик, описанных выше, если соединение может ингибировать жизнеспособность клеток, то таким образом будет снижаться вирусный урожай.

Выбор конкретного вида вирусов обычно определяется задачей и уровнем биобезопасности, доступным в лаборатории. Для нужд первичного скрининга возможно использование родственного низкопатогенного вируса с последующей проверкой активных соединений на патогенном вирусе для отбора соединения-лидера.

Выбор конкретного штамма вируса определяется параметрами размножения в культуре клеток: чёткое ЦПД или бляшки; хорошее свечение при проведении иммунохимического окрашивания и т.п. Для упрощения переноса данных *in vitro* исследований в доклинику и клинику, предпочтительнее использовать актуальные штаммы, минимально отличные от циркулирующих в природе. Либо схема оценки противовирусной активности должна включать оценку спектра противовирусной активности против различных природных вариантов вируса.

Доза вируса определяется схемой постановки и выбранным методом детекции и не должна выходить за рамки диапазона исследованных доз при отработке теста. На примере SARS-CoV-2 в данной работе показано, что для некоторых соединений даже небольшое увеличение дозы вируса с 50 до 200 ТЦД₅₀ может привести к статистически достоверному падению значения ЕС₅₀. Поэтому доза вируса должна контролироваться в каждом эксперименте для возможности проведения сравнения между экспериментами.

Выбор препарата вируса для проведения исследования является самым трудно контролируемым параметром, ввиду неочевидности его характеристик. На примере ВКЭ в данной работе показано, что при тестировании препаратов, связывающихся с поверхностными белками вириона важно следить за соотношением инфекционных и неинфекционных вирусных частиц, чтобы

избегать расходования препарата на неинфекционные вирионы, что сильно занижает EC_{50} .

При определении цитотоксичности исследуемых соединений при подборе конкретных условий проведения эксперимента стоит учитывать, что цитотоксичность рассматривается не сама по себе, а как характеристика для описания противовирусной активности и перспективности соединения для дальнейшей разработки. Поэтому важно рассматривать цитотоксичность соединений в сходной постановке, что и противовирусную активность.

3.15. Разработка схемы поиска лекарственных препаратов с использованием фенотипических тестов

Разработанные методы позволяют проводить различные варианты фенотипической оценки противовирусной активности соединений против вирусов рода *Orthoflavivirus* (БКЭ, ПОВ, ВОГЛ), рода *Enterovirus* (ЭВ-А, ЭВ-В, ЭВ-С), рода *Betacoronavirus* (SARS-CoV-2), рода *Alphavirus* (ЧИКВ) и рода *Lentivirus* (ВИЧ-1). При этом комбинируя методики можно не только скрининговать библиотеки химических соединений и выявлять соединения-хиты с противовирусной активностью, но и проводить исследования механизма их действия и поиска возможных мишеней (Рисунок 44).

Для проведения фенотипического скрининга наиболее хорошо подходят методики по определению вирус-индуцированной гибели клеток в случае, если это возможно. Для увеличения производительности теста можно рекомендовать проводить скрининговое исследование в одной концентрации: чаще всего активными считаются соединения с EC_{50} менее 10 мкМ, но для получения большего разнообразия химических структур для проведения SAR и последующей оптимизации молекулы-лидера концентрация может быть увеличена до 50 и даже 100 мкМ, в зависимости от растворимости и ожидаемой токсичности соединений. Для увеличения точности результатов количество повторов внутри эксперимента должно быть не менее трёх. Критерием отбора активных соединений будет

выраженный противовирусный эффект (подавление вирус-индуцированного фенотипа) в выбранной концентрации, при этом уровень эффекта также может варьироваться – 50-100%. В зависимости от эффективности метода фенотипического скрининга за одну постановку можно достаточно легко скринировать от 300 до 2500 соединений даже без применения роботизированных технологий.



Рисунок 44 – Возможная схема оценки противовирусной активности на основе различных фенотипических методов, разработанных в данной работе

После выбора активных соединений-хитов (их обычно несколько десятков) необходимо провести определение полумаксимальной эффективной концентрации

EC₅₀. Это может быть осуществлено с использованием той же методики, что и в фенотипическом скрининге, или другой, но с проведением оценки противовирусной активности в зависимости от концентрации соединения. При этом должно наблюдаться дозозависимое повышение противовирусного эффекта с ростом концентрации соединения, соответствующее фармакологической кривой активности. Для активных соединений должны быть определены цитотоксичности (CC₅₀). С использованием значений EC₅₀ и CC₅₀ рассчитывается значение индекса селективности SI. И именно это значение станет критерием перспективности соединения. SI должен быть как можно более большим числом, что будет говорить о различиях между активностью и токсичностью соединения. Соединения с SI менее и равно 2 считаются неперспективными ввиду высокой токсичности; SI не менее 8 считается перспективным для исследований на животных [Ершов и др., 2012]. Соединения с SI более 1000 – высокоперспективны. Обычно знание SI позволяет определиться с SAR или предложить дизайн новых соединений для повышения активности и/или снижения токсичности. Наиболее перспективные соединения-лидеры отбираются для исследований механизма действия.

Следующей стадией является определение стадии репликативного цикла вируса, на которой действуют соединения-лидеры. Обычно первой стадией таких исследований становятся эксперименты по оценке зависимости активности от времени добавления соединения (Time-of-Addition). Ввиду трудоёмкости данных экспериментов количество соединений необходимо по возможности сократить. Однако в случае, если соединения-лидеры относятся к нескольким химическим классам, то потребуется проведение данной стадии хотя бы для одного соединения из каждого класса, поскольку выбранные соединения могут действовать по разным механизмам. Исследования Time-of-Addition также можно производить с использованием фенотипических методик, наиболее подходят метод ингибирования бляшкообразования (или фокусообразования) для моделирования влияния на первые стадии и снижения урожая вируса (инфекционного, РНК, белки) для моделирования влияния на внутриклеточные стадии вирусного цикла.

ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка методологии проведения фенотипической оценки противовирусной активности соединений широко не проводится, ввиду интуитивной простоты моделирования вирусной инфекции в клеточных тестах, в отличие от моделирования соматических заболеваний. Показатели противовирусной активности, используемые для оценки эффективности и токсичности соединений, включают результаты количественного анализа ингибирования репродукции вируса различными методами. При этом детали методик, влияние отдельных параметров тестов и их выбор редко становятся темой для исследования. Однако с прогрессом технологии и понимания клеточных механизмов, фенотипический подход требует нового рассмотрения и методологической разработки.

В данной работе были разработаны методики различных вариантов фенотипической оценки противовирусной активности соединений различных химических классов: фенотипического скрининга, определения стадии репликативного цикла вируса, на которую действует ингибитор, и оценки вирулицидной активности – против возбудителей социально значимых инфекционных заболеваний (БКЭ, ПОВ и ВОГЛ сем. *Flaviviridae*; ЧИКВ сем. *Togaviridae*; SARS-CoV-2 сем. *Coronaviridae*; вирусов видов ЭВ-А, -В и -С сем. *Picornaviridae*; ВИЧ-1 сем. *Retroviridae*). При этом для проведения методик используются сходные подходы, позволяющие добиться достаточно точного определения активности и сравнительно высокой производительности методик без использования роботизированных систем. Более того, данные методики могут стать основой для автоматизированных систем высокопроизводительного скрининга.

В рамках данной работы разработанные методики использовали для оценки противовирусной активности соединений разных химических классов:

- 64 жёстких ингибиторов слияния (RAFI) – производных 5-(перилен-3-илэтинил)-2'-дезоксимурацила, большая часть которых обладала активностью против всех исследуемых оболочечных вирусов, некоторые с наномолярными значениями EC_{50} , при этом внутри отдельных серий удалось описать соотношения структура-активность (SAR);
- 9 фотосенсибилизирующих производных бенгальского розового с различными гидрофобными n-алкильными цепями против нескольких оболочечных вирусов, которые проявили высокую ($EC_{50} < 1$ мкМ) активность против ЧИКВ, ВИЧ-1 и SARS-CoV-2 *in vitro*;
- более 100 производных нуклеозидов, из которых для 87 производных N⁶-бензиладенозина проявили активность против 3-6 представителей энтеровирусов видов А, В и С с разработкой SAR, а среди 61 производного 5'-норкарбоциклических нуклеозидов было обнаружено 2 соединения с 50 мкМ активностью против SARS-CoV-2;
- две серии из 32 производных феноксазиновых нуклеозидов тестировали против исследуемых РНК-содержащих вирусов, 21 из них проявили микромолярную активность против переносимых клещами ортофлавивирусов, ЧИКВ и SARS-CoV-2;
- 28 новых 4-фторзамещенных пиримидиновых N-оксидов и пиримидинов, а также 18 новых N-оксидов 4-аминотетрагидрохиназолина тестировали против переносимых клещами ортофлавивирусов с выявлением 22 активных соединений – «первых в своём классе»;
- нескольких серий из 25 селенорганических и сероорганических соединений, полученных из цианотиоацетамида и цианоселеноацетамида, тестировали против ВКЭ с выявлением 19 новых ингибиторов репродукции вируса;
- смеси природного происхождения (гуминовые вещества и растительные экстракты) тестировали против РНК-содержащих вирусов с выявлением экстрактов, подавляющих репродукцию ЧИКВ, ВИЧ-1, SARS-CoV-2 и ЭВ-А71 для дальнейшего изучения.

Применение разработанных методик фенотипического скрининга позволило определить активность известных ингибиторов широкого спектра действия, таких как N-гидроксицитидин, против редко исследуемых, но социально-значимых вирусов: переносимых клещами ортофлавивирусов, включая ПОВ и ВОГЛ, и ЧИКВ. Таким образом, были получены новые знания об активности уже известных противовирусных препаратов.

С другой стороны, исследование противовирусной активности соединений различных химических классов, часто впервые синтезированных производных, позволило расширить химическое пространство возможных ингибиторов репродукции вирусов, дальнейшая разработка которых может привести к созданию противовирусных препаратов широкого спектра действия.

Тестирование противовирусной активности в клеточных фенотипических тестах проводилось во многих исследованиях, но часто результаты принципиально не соотносятся или значения активности различаются на порядок, хотя по описанию используемых методов результаты должны быть близкими по значению. Тем не менее, сравнительных исследований методик определения в одной лаборатории или между лабораториями не проводилось. Для заполнения этого пробела были проведены сравнения результатов разработанных методик с варьированием части параметров на одной серии соединений. А также сравнение результатов фенотипического скрининга, выполненного по схожим методикам, между двумя лабораториями. Это сравнение позволило выявить некоторые закономерности и показать, что

- значения EC_{50} , полученные в одинаковых условиях статистически достоверно не различаются: в реакциях ингибирования бляшкообразования и фокусообразования ВКЭ; в реакциях ингибирования энтеровирус-индуцированного ЦПД с расчётом EC_{50} по методу Кербера и по метаболизму резазурина с расчётом EC_{50} методом аппроксимации; реакциях ингибирования признаков ЦПД и бляшкообразования ЧИКВ, при этом значения в тесте ингибирования бляшкообразования ниже;

- значения EC_{50} , получаемое в фенотипическом тесте противовирусной активности *in vitro*, могут зависеть от характеристик вируса (выбранного штамма и дозы) и характеристик препарата вируса (например, соотношения инфекционных и неинфекционных частиц).

Фенотипический анализ противовирусной активности не заканчивается на стадии скрининга. С его помощью можно выявлять соединения-лидеры для доклинических и клинических исследований с определением общей схемы механизма их действия. Для проведения такого анализа была разработана схема поиска противовирусных соединений-лидеров на основе комбинации разработанных методик фенотипического определения противовирусной активности в культуре клеток.

Результаты проведённой работы создают основу для всестороннего фенотип-направленного анализа противовирусной активности соединений *in vitro* для решения такой социально-экономически важной проблемы как разработка лекарственных препаратов против РНК-содержащих вирусов.

Практические рекомендации

На основании проведённой работы можно сформулировать следующие рекомендации по подбору параметров и условий при разработке методики фенотипического скрининга в культуре клеток в отношении литического вируса:

- выбор конкретного штамма вируса определяется параметрами размножения в культуре клеток для получения чётко детектируемого «фенотипа заболевания». При этом, предпочтительнее использовать эпидемиологически актуальные штаммы. В случае невозможности или сочетанной циркуляции различных вариантов вируса, схема оценки противовирусной активности должна включать оценку спектра противовирусной активности;
- Доза вируса определяется выбранным методом детекции, и не должна выходить за рамки диапазона доз, исследованных при отработке теста. При

этом доза вируса должна контролироваться в каждом эксперименте для возможности проведения сравнения между экспериментами;

- Выбор препарата вируса для проведения исследования является самым трудно контролируемым параметром, ввиду неочевидности его характеристик. Для тестов, детектирующих литическое действие вируса, целесообразно учесть соотношение инфекционных и неинфекционных частиц в препаратах вируса при отработке методики, и проводить контроль данного соотношения для препаратов, используемых для скрининга;
- При определении цитотоксичности исследуемых соединений при подборе конкретных условий проведения эксперимента стоит учитывать, что цитотоксичность рассматривается не сама по себе, а как характеристика для описания противовирусной активности и перспективности соединения для дальнейшей разработки. Поэтому важно рассматривать цитотоксичность соединений в сходной постановке, что и противовирусную активность.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Естественным продолжением работы является продолжение разработки тест-систем фенотипической оценки активности соединений против других вирусов, ассоциированных с другими социально значимыми заболеваниями, с целью поиска средств терапии для актуальных проблем и подготовки к вспышкам новых инфекций. А также продолжение фенотипических скринингов с целью дальнейшего расширения химического пространства ингибиторов репродукции вирусов.

Несмотря на наличие множества различных способов детекции репродукции вируса, использование платформ с инфекционным вирусом и детекция вирус-индуцированного ЦПД продолжают считаться наиболее релевантными. Визуальная детекция морфологических изменений клеток также позволяет определять особенности токсичности соединения. Таким образом, разработка систем многопараметрового автоматизированного анализа микроскопических

изображений клеток в процессе фенотипического теста является логичным развитием данного подхода.

В работе проводится сравнение методов фенотипической оценки противовирусной активности, основанных на литическом действии вируса, с различными вариантами детекции вирус-индуцированной гибели клеток. Несомненно, интересным является сравнение между собой таких тест-систем и оценивающих ингибирование репродукции вируса по различным параметрам: детекция вирусных РНК, различных вирусных белков и др. – в одной линии клеток и разных, например, где вирус способен и не способен вызывать гибель клеток.

ГЛАВА 5. ВЫВОДЫ

1. Разработаны, апробированы и внедрены в лабораторное использование методики фенотипической оценки цитотоксичности и скрининга противовирусной активности соединений, начального определения механизма их действия как ингибируемой стадии репликативного цикла вируса, а также определения вирулицидной активности соединений в культуре клеток в отношении вирусов родов *Orthoflavivirus* (БКЭ, ПОВ, ВОГЛ), *Enterovirus* (ЭВ-А, ЭВ-В, ЭВ-С), *Betacoronavirus* (SARS-CoV-2), *Alphavirus* (ЧИКВ) и *Lentivirus* (ВИЧ-1). Разработанные методики позволяют определить полумаксимальную эффективную концентрацию (EC_{50}), полумаксимальную токсическую концентрацию (CC_{50}) и рассчитать индекс селективности (SI);
2. Разработанные методики можно применять для фенотипического определения (скрининга) противовирусной активности соединений различных химических классов, а также сложных смесей природного происхождения, таких как гуминовые субстанции и растительные экстракты. При этом получаемые значения активности достаточно различаются для структурно похожих соединений, чтобы провести анализ соотношений структура-активность (structure-activity relationship, SAR);
3. Выявлены новые, в том числе «первые в своём классе», низкомолекулярные ингибиторы представителей родов *Orthoflavivirus* (БКЭ, ПОВ, ВОГЛ), *Enterovirus* (виды ЭВ-А, ЭВ-В, ЭВ-С), *Betacoronavirus* (SARS-CoV-2), *Alphavirus* (ЧИКВ) и *Lentivirus* (ВИЧ-1) с использованием разработанных методик фенотипического скрининга противовирусной активности *in vitro*;
4. Количественные показатели противовирусной активности при фенотипическом скрининге *in vitro* определяются следующими параметрами тест-системы: выбранным методом скрининга, характеристиками вируса

(штамм, доза) и вирусного препарата (например, соотношением инфекционных и неинфекционных частиц) – которые необходимо контролировать при проведении исследований;

5. Количественные показатели противовирусной активности, полученные в одинаковых условиях в фенотипических тестах *in vitro*, статистически значимо не различаются:
 - в реакциях ингибирования бляшкообразования и фокусообразования вируса клещевого энцефалита;
 - в реакциях ингибирования энтеровирус-индуцированного ЦПД с расчётом показателя методом Кербера и по метаболизму резазурина с расчётом показателя методом аппроксимации нелинейной функцией;
 - в реакциях ингибирования вирус-индуцированного ЦПД и бляшкообразования вируса Чикунгунья, при этом значения показателя в тесте ингибирования бляшкообразования всегда ниже.
6. Предложена схема поиска потенциальных лекарственных препаратов против РНК-содержащих вирусов на основе комбинации разработанных методик фенотипической оценки противовирусной активности *in vitro* с выявлением соединений-лидеров для последующего исследования в доклинических и клинических испытаниях.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- +оцРНК – транслируемая одноцепочечная молекула матричной РНК, которая распознаётся рибосомами
- оцРНК – одноцепочечная молекула РНК, комплементарная молекуле матричной РНК, распознаваемой рибосомами
- 2×ЕМЕМ – среда Игла МЕМ с двойным набором аминокислот и витаминов
- АСЕ2 – ангиотензин-превращающий фермент 2
- AZT – азидотимидин (зидовудин)
- CC₅₀ – полумаксимальная токсическая концентрация
- COVID-19 – коронавирусная инфекция 19
- dUY11 – 5-(перилени-3-ил-этинил)-2'-дезоксимурацил
- EC₅₀ – полумаксимальная эффективная концентрация
- EGCG – эпигаллокатехин галат
- ERGIC – ER-Golgi intermediate compartment
- FBS – фетальная бычья сыворотка
- G4 – гуаниновый квадруплекс
- GCP – genome-containing particles, геном-содержащие частицы
- GFP – green fluorescent protein, зелёный флуоресцирующий белок
- Her2c – клетки эпидермальной карциномы человека (клон линии HeLa)
- HTS – high throughput screening, высокопроизводительный скрининг
- ICAM-1 – intercellular adhesion molecule 1, молекула межклеточной адгезии 1
- LTR – long terminal repeat, длинный концевой повтор
- MoA – mechanism of action, механизм действия
- MOI – multiplicity of infection, множественность заражения
- MT4 – клетки Т-клеточного лейкоза человека со встроенным в геном вирусом Т-клеточного лейкоза
- МТТ – бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия
- NHC – N⁴-гидроксицитидин

- PBS – phosphate-buffered saline, фосфатный буферный раствор
- PDD – phenotype-based drug discovery, фенотип-направленный поиск лекарств
- PKR – протеинкиназа R
- RAFI – rigid amphipathic fusion inhibitors, жёсткие амфипатические ингибиторы слияния
- RBD – receptor-binding domain, рецептор-связывающий домен
- RD – клетки рабдомиосаркомы человека
- RdRp – RNA-dependent RNA polymerase, РНК-зависимая РНК полимераз
- SAR – structure-activity relation, соотношение структура-активность
- SARS-CoV-2 – коронавирус острого респираторного синдрома 2
- SI – selectivity index, индекс селективности
- TDD – target-based drug discovery, мишень-направленный поиск лекарств
- TMPRSS2 – transmembrane protease serine 2, мембраносвязанная сериновая протеаза 2
- TOA – Time-of-Addition, т.е. зависимости активности от времени добавления соединения
- Vero – клетки почки зелёной мартышки
- β -ОГ – бета-октил-глюкозид
- АГ – аппарат Гольджи
- АТФ – аденозин-трифосфат
- АФК – активные формы кислорода
- БОЕ – бляшкообразующие единицы
- БПЭ – белково-пептидный экстракт
- ВВЗ – вирус Варицелла-Зостер
- ВГС – вирус гепатита С
- ВЖЛ – вирус жёлтой лихорадки
- ВЗН – вирус Западного Нила
- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
- ВКЭ – вирус клещевого энцефалита
- ВОГЛ – вирус омской геморрагической лихорадки

ВПГ – вирус простого герпеса

ДЕНВ – вирус Денге

ДМЕМ – минимальная достаточная среда, модифицированная Дульбекко

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дцДНК – двуцепочечная ДНК

ЕМЕМ – минимальная достаточная среда Игла

ЗИКВ – вирус Зика

ИФА – иммунофлуоресцентный анализ

кл/лунку – клеток на лунку

КПД – коэффициент полезного действия

КТ – компьютерная томография

мРНК – матричная РНК

НАД – никотинамид динуклеотид

НИОТ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

ННИОТ – ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы

нт – нуклеотид

НТО – нетранслируемая область

ОГМГ-ГХ – олигогексаметиленгуанидин гидрохлорид

ОП – оптическая плотность

ОРДС – обструктивный респираторный дистресс-синдром

ОРС – открытая рамка считывания

ОТ – обратная транскрипция и обратная транскриптаза

ОТ-ПЦР – обратная транскрипция, совмещённая с полимеразной цепной реакцией

оцРНК – одноцепочечная РНК

ПВ – полиовирус

ПОВ – вирус Повассан

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РГА – реакция гемагглютинации

РНК – рибонуклеиновая кислота

РТГА – реакция торможения гемагглютинации

сгРНК – субгеномная РНК

СИНВ – вирус Синдбис

СПЭВ – клетки почки эмбриона свиньи версенезированные

тРНК – транспортная РНК

ТЦД₅₀ – 50% тканевая цитотоксическая доза

ФОЕ – фокусобразующие единицы

ЦМВ – цитомегаловирус

ЦНС – центральная нервная система

ЦПД – цитопатическое действие (гибель клеток)

ч п.и. – час после инфицирования

ЧИКВ – вирус Чикунгунья

шт. – штамм

ЭВ-А, -В и -С – виды энтеровирусов А, В и С

ЭВИ – энтеровирусные инфекции

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андропова В.Л., Скоробогатый М.В., Манасова Е.В., Коршун В.А., Галегов Г.А. Противовирусная активность некоторых 5-арилэтинил производных 2'-дезоксинуридина. Биоорган. Хим. 2003;29(3):290-295.
2. Горелов А.В., Усенко Д.В., Антонова Л.П., Козловская Л.И., Шустова Е.Ю., Волок В.П. Перспективы применения комбинированных препаратов лизоцима при COVID-19. Эффективная фармакотерапия. 2021;17(24):12-17.
3. Ершов Ф.И., Тазулахова Э.Б., Наровлянский А.Н., Миронов А.Н., Меркулов В.А., Ленева И.А., Оспельникова Т.П., Васильев А.Н. методические рекомендации по доклиническому изучению специфической противовирусной активности лекарственных средств в Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств по ред.: Миронов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журавлева М.В., Лепяхин В.К., Коробов Н.В., Меркулов В.А., Орехов С.Н., Сакаева И.В., Утешев Д.Б., Яворский А.Н. Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздравсоцразвития России. Том Часть 1. Москва: Гриф и К, 2012., сс. 525-549.
4. Зефирова О.Н. , Балакин К.В. , Красавин М.Ю. , Палюлин В.А. , Поройков В.В. , Радченко Е.В. , Салахутдинов Н.Ф. , Спасов А.А. , Фисенко В.П. , Бачурин С.О. Глоссарий русскоязычных терминов в медицинской химии. Известия Академии наук. Серия химическая. 2019;(12):2381-2395.
5. Игнатьев Г.М., Козловская Л.И., Мефед К.М., Волок В.П., Беялетдинова И.Х., Еровиченков А.А., Даниленко Д.М., Алешенко Н.Л., Клотченко С.А., Максимов Н.Л., Артемов Е.К., Пиняева А.Н., Лиознов Д.А., Ишмухаметов А.А. Определение антител к вирусу SARS-CoV-2 у пациентов с новой коронавирусной инфекцией. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2022; 11(1):21–27.

6. Коршун В.А., Манасова Е.В., Балакин К.В., Прохоренко И.А., Бучатский А.Г., Берлин Ю.А. 5-(1-периленилэтинил)-2'-дезоксинуридин, новый флуоресцентный нуклеозидный аналог. *Биоорган. Хим.* 1996;22(12):923-925.
7. Ляпустин В.Н., Ворович М.Ф. Способ получения вирионного антигена вируса клещевого энцефалита. Патент RU 2402606, 2010.
8. Малахов А.Д., Манасова Е.В., Кузнецова С.В., Гречишникова И.В., Скоробогатый М.В., Коршун В.А., Берлин Ю.А. Синтез и флуоресцентные свойства 5-(1-периленилэтинил)-2'-дезоксинуридин-содержащих олигонуклеотидов. *Биоорган. Хим.* 2000;26(1):39-50.
9. Манасова Е.В., Малахов А.Д., Кузнецова С.В., Варнавский О.П., Кадуцкий А.П., Кожич Д.Т., Коршун В.А., Берлин Ю.А. Реактивы для введения флуоресцентного 2-фенилбензоксазольного производного дезоксиуридина в олигонуклеотиды. *Биоорган. Хим.* 1998;24(9):688-695.
10. Романова Л.Ю., Козловская Л.И., Шевцова А.С., Карганова Г.Г. Метод доказательства отсутствия РНК вируса клещевого энцефалита в биопробах. *Вопросы вирусологии.* 2006, №1, стр. 38-41.
11. Тучинская К.К., Волок В.П., Илларионова В.В., Ковалева О.И. Разработка метода оценки структурной гетерогенности популяции разных штаммов вируса клещевого энцефалита. *Патогенез* 2018;16(3):108-111.
12. Aggarwal SK, Gogu SR, Rangan SR, Agrawal KC. Synthesis and biological evaluation of prodrugs of zidovudine. *J Med Chem.* 1990;33(5):1505-10.
13. Aiello TF, García-Vidal C, Soriano A. Antiviral drugs against SARS-CoV-2. *Rev Esp Quimioter.* 2022;35 Suppl 3(Suppl 3):10-15.
14. Allison SL, Tao YJ, O'Riordain G, Mandl CW, Harrison SC, Heinz FX. Two distinct size classes of immature and mature subviral particles from tick-borne encephalitis virus. *J Virol.* 2003;77(21):11357-66.
15. Alzahrani KJ, Matyugina ES, Khandazhinskaya AL, Kochetkov SN, Seley-Radtke KL, Koning HP. Evaluation of the antiprotozoan properties of 5'-

norcarbocyclic pyrimidine nucleosides. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017;27(14):3081-3086.

16. Andreeva DV, Tikhomirov AS, Shchekotikhin AE. Ligands of G-Quadruplex Nucleic Acids. *Russ. Chem. Rev.* 2021;90:1–38.
17. Angusti A, Manfredini S, Durini E, Ciliberti N, Vertuani S, Solaroli N, Pricl S, Ferrone M, Fermeiglia M, Loddò R, Secci B, Visioli A, Sanna T, Collu G, Pezzullo M, La Colla P. Design, synthesis and anti flaviviridae activity of N(6)-, 5',3'-O- and 5',2'-O-substituted adenine nucleoside analogs. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2008;56(4):423-32.
18. Ankley GT, Bennett RS, Erickson RJ, Hoff DJ, Hornung MW, Johnson RD, Mount DR, Nichols JW, Russom CL, Schmieder PK, Serrano JA, Tietge JE, Villeneuve DL. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ Toxicol Chem.* 2010;29(3):730-41.
19. Anoopkumar-Dukie S, Carey JB, Conere T, O'sullivan E, van Pelt FN, Allshire A. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *Br J Radiol.* 2005;78(934):945-7.
20. Aralov AV, Proskurin GB, Orlov AA, Kozlovskaya LI, Chistov AA, Kutyaikov SV, Karganova GG, Palyulin VA, Osolodkin DI, Korshun VA. Perylenyltriazoles inhibit reproduction of enveloped viruses. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2017, 138:293e299.
21. Arrowsmith J. Trial watch: Phase II failures: 2008-2010. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(5):328-9.
22. Arrowsmith J. Trial watch: phase III and submission failures: 2007-2010. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(2):87.
23. Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(8):673-83.
24. Astrakhantseva IV, Ershova AE, Chuvpilo SA, Kruglova NA, Ishmukhametov AA, Drutskaya MS, Kozlovskaya LI, Nedospasov SA. SARS-CoV-2 Binding and

Neutralization Properties of Peptides Derived from N-Terminus of Human ACE2. *Int J Mol Sci.* 2023;24(9):8269.

25. Axfors C, Schmitt AM, Janiaud P, Van't Hooft J, Abd-Elsalam S, Abdo EF, Abella BS, Akram J, Amaravadi RK, Angus DC, Arabi YM, Azhar S, Baden LR, Baker AW, Belkhir L, Benfield T, Berrevoets MAH, Chen CP, Chen TC, Cheng SH, Cheng CY, Chung WS, Cohen YZ, Cowan LN, Dalgard O, de Almeida E Val FF, de Lacerda MVG, de Melo GC, Derde L, Dubee V, Elfakir A, Gordon AC, Hernandez-Cardenas CM, Hills T, Hoepelman AIM, Huang YW, Igau B, Jin R, Jurado-Camacho F, Khan KS, Kremsner PG, Kreuels B, Kuo CY, Le T, Lin YC, Lin WP, Lin TH, Lyngbakken MN, McArthur C, McVerry BJ, Meza-Meneses P, Monteiro WM, Morpeth SC, Mourad A, Mulligan MJ, Murthy S, Naggie S, Narayanasamy S, Nichol A, Novack LA, O'Brien SM, Okeke NL, Perez L, Perez-Padilla R, Perrin L, Remigio-Luna A, Rivera-Martinez NE, Rockhold FW, Rodriguez-Llamazares S, Rolfe R, Rosa R, Røsjø H, Sampaio VS, Seto TB, Shahzad M, Soliman S, Stout JE, Thirion-Romero I, Troxel AB, Tseng TY, Turner NA, Ulrich RJ, Walsh SR, Webb SA, Weehuizen JM, Velinova M, Wong HL, Wrenn R, Zampieri FG, Zhong W, Moher D, Goodman SN, Ioannidis JPA, Hemkens LG. Mortality outcomes with hydroxychloroquine and chloroquine in COVID-19 from an international collaborative meta-analysis of randomized trials. *Nat Commun.* 2021 Apr 15;12(1):2349. Erratum in: *Nat Commun.* 2021;12(1):3001.
26. Baba M, Nishimura O, Kanzaki N, Okamoto M, Sawada H, Iizawa Y, Shiraishi M, Aramaki Y, Okonogi K, Ogawa Y, Meguro K, Fujino M. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(10):5698-703.
27. Bagrov DV, Glukhov GS, Moiseenko AV, Karlova MG, Litvinov DS, Zaitsev PA, Kozlovskaya LI, Shishova AA, Kovpak AA, Ivin YY, Piniaeva AN, Oksanich AS, Volok VP, Osolodkin DI, Ishmukhametov AA, Egorov AM, Shaitan KV, Kirpichnikov MP, Sokolova OS. Structural characterization of β -

- propiolactone inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) particles. *Microsc Res Tech*. 2022;85(2):562-569.
28. Bai Y, Ye F, Feng Y, Liao H, Song H, Qi J, Gao GF, Tan W, Fu L, Shi Y. Structural basis for the inhibition of the SARS-CoV-2 main protease by the anti-HCV drug nardaprevir. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):51.
 29. Baudy AR, Otieno MA, Hewitt P, Gan J, Roth A, Keller D, Sura R, Van Vleet TR, Proctor WR. Liver microphysiological systems development guidelines for safety risk assessment in the pharmaceutical industry. *Lab Chip*. 2020;20(2):215-225.
 30. Bauer L, Lyoo H, van der Schaar HM, Strating JR, van Kuppeveld FJ. Direct-acting antivirals and host-targeting strategies to combat enterovirus infections. *Curr Opin Virol*. 2017;24:1-8.
 31. Behnam MA, Nitsche C, Boldescu V, Klein CD. The Medicinal Chemistry of Dengue Virus. *J Med Chem*. 2016;59(12):5622-49
 32. Berg EL, Denker SP, O'Mahony A. Development and validation of assays for phenotypic screening. In *Phenotypic Drug Discovery*, B. Isherwood and A. Augustin, eds. (Royal Society of Chemistry), 2020. doi: 10.1039/9781839160721-00020.
 33. Berg EL. Phenotypic chemical biology for predicting safety and efficacy. *Drug Discov Today Technol*. 2017;23:53-60
 34. Berg EL. Systems biology in drug discovery and development. *Drug Discov Today* 2014;19(2):113–25.
 35. Berg EL. The future of phenotypic drug discovery. *Cell Chem Biol*. 2021;28(3):424-430.
 36. Bernatchez JA, Yang Z, Coste M, Li J, Beck S, Liu Y, Clark AE, Zhu Z, Luna LA, Sohl CD, Purse BW, Li R, Siqueira-Neto JL. Development and Validation of a Phenotypic High-Content Imaging Assay for Assessing the Antiviral Activity of Small-Molecule Inhibitors Targeting Zika Virus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(10):e00725-18.

37. Bibilashvili RS, Sidorova MV, Dudkina US, Palkeeva ME, Molokoedov AS, Kozlovskaya LI, Egorov AM, Ishmukhametov AA, Parfyonova EV. Peptide Inhibitors of the Interaction of the SARS-CoV-2 Receptor-Binding Domain with the ACE2 Cell Receptor. *Biochem Mosc Suppl B Biomed Chem*. 2021;15(4):274-280.
38. Bodor N, Buchwald P. Recent advances in the brain targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 1999;36(2-3):229-254.
39. Bonnet A, Robins RK. Modulation of leukocyte genetic expression by novel purine nucleoside analogs. A new approach to antitumor and antiviral agents. , *J. Med. Chem*. 1993;36(6):635-653.
40. Boras B, Jones RM, Anson BJ, Arenson D, Aschenbrenner L, Bakowski MA, Beutler N, Binder J, Chen E, Eng H, Hammond H, Hammond J, Haupt RE, Hoffman R, Kadar EP, Kania R, Kimoto E, Kirkpatrick MG, Lanyon L, Lendy EK, Lillis JR, Logue J, Luthra SA, Ma C, Mason SW, McGrath ME, Noell S, Obach RS, O' Brien MN, O'Connor R, Ogilvie K, Owen D, Pettersson M, Reese MR, Rogers TF, Rosales R, Rossulek MI, Sathish JG, Shirai N, Steppan C, Ticehurst M, Updyke LW, Weston S, Zhu Y, White KM, García-Sastre A, Wang J, Chatterjee AK, Mesecar AD, Frieman MB, Anderson AS, Allerton C. Preclinical characterization of an intravenous coronavirus 3CL protease inhibitor for the potential treatment of COVID19. *Nat Commun*. 2021;12(1):6055.
41. Brooks SE, Kaza V, Nakamura T, Trousdale MD. Photoinactivation of herpes simplex virus by rose bengal and fluorescein. In vitro and in vivo studies. *Cornea*. 1994;13(1):43-50.
42. Brownjohn PW, Smith J, Portelius E, Serneels L, Kvartsberg H, De Strooper B, Blennow K, Zetterberg H, Livesey FJ. Phenotypic Screening Identifies Modulators of Amyloid Precursor Protein Processing in Human Stem Cell Models of Alzheimer's Disease. *Stem Cell Reports*. 2017;8(4):870-882.
43. Butchbach ME, Singh J, Thorsteinsdóttir M, Saieva L, Slominski E, Thurmond J, Andr sson T, Zhang J, Edwards JD, Simard LR, Pellizzoni L, Jarecki J, Burghes

- AH, Gurney ME. Effects of 2,4-diaminoquinazoline derivatives on SMN expression and phenotype in a mouse model for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2010;19(3):454-67.
44. Bychenko OS, Khrulev AA, Svetlova JI, Tsvetkov VB, Kamzeeva PN, Skvortsova YV, Tupertsev BS, Ivanov IA, Aseev LV, Khodarovich YM, Belyaev ES, Kozlovskaya LI, Zatsepin TS, Azhikina TL, Varizhuk AM, Aralov AV. Red light-emitting short Mango-based system enables tracking a mycobacterial small noncoding RNA in infected macrophages. *Nucleic Acids Res.* 2023 25:gkad100.
 45. Calisher CH, Gould EA. Taxonomy of the virus family Flaviviridae. *Adv Virus Res.* 2003;59:1-19.
 46. Cannalire R, Cerchia C, Beccari AR, Di Leva FS, Summa V. Targeting SARS-CoV-2 Proteases and Polymerase for COVID-19 Treatment: State of the Art and Future Opportunities. *J Med Chem.* 2022;65(4):2716-2746.
 47. Cao L, Goresnik I, Coventry B, Case JB, Miller L, Kozodoy L, Chen RE, Carter L, Walls AC, Park YJ, Strauch EM, Stewart L, Diamond MS, Veessler D, Baker D. De novo design of picomolar SARS-CoV-2 miniprotein inhibitors. *Science.* 2020;370(6515):426-431.
 48. Centonze M, Di Conza G, Lahn M, Fabregat I, Dituri F, Gigante I, Serino G, Scialpi R, Carrieri L, Negro R, Pizzuto E, Giannelli G. Autotaxin inhibitor IOA-289 reduces gastrointestinal cancer progression in preclinical models. *J Exp Clin Cancer Res.* 2023;42(1):197.
 49. Chatelain G, Debing Y, De Burghgraeve T, Zmurko J, Saudi M, Rozenski J, Neyts J, Van Aerschot A. In search of flavivirus inhibitors: evaluation of different tritylated nucleoside analogues. *Eur J Med Chem.* 2013;65:249-55.
 50. Chen B, Dodge ME, Tang W, Lu J, Ma Z, Fan CW, Wei S, Hao W, Kilgore J, Williams NS, Roth MG, Amatruda JF, Chen C, Lum L. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol.* 2009;5(2):100-7.
 51. Chen CZ, Southall N, Galkin A, Lim K, Marugan JJ, Kulakova L, Shinn P, van Leer D, Zheng W, Herzberg O. A homogenous luminescence assay reveals novel

- inhibitors for giardia lamblia carbamate kinase. *Curr Chem Genomics*. 2012;6:93-102.
52. Chen D, Zhao Y, Li M, Shang H, Li N, Li F, Wang W, Wang Y, Jin R, Liu S, Li X, Gao S, Tian Y, Li R, Li H, Zhang Y, Du M, Cao Y, Zhang Y, Li X, Huang Y, Hu LA, Li F, Zhang H. A general Fc engineering platform for the next generation of antibody therapeutics. *Theranostics*. 2021;11(4):1901-1917.
 53. Chen H, Liu L, Jones SA, Banavali N, Kass J, Li Z, Zhang J, Kramer LD, Ghosh AK, Li H. Selective inhibition of the West Nile virus methyltransferase by nucleoside analogs. *Antiviral Res*. 2013;97(3):232-9.
 54. Chen HJ, Zhou XB, Wang AL, Zheng BY, Yeh CK, Huang JD. Synthesis and biological characterization of novel rose bengal derivatives with improved amphiphilicity for sono-photodynamic therapy. *Eur J Med Chem*. 2018;145:86-95.
 55. Chen Y-L, Yokokawa F, Shi P-Y. The search for nucleoside/nucleotide analog inhibitors of dengue virus. *Antivir Res*. 2015;122:12–19.
 56. Chen YL, Yokokawa F, Shi PY. The search for nucleoside/nucleotide analog inhibitors of dengue virus. *Antiviral Res*. 2015;122:12-9.
 57. Chistov AA, Chumakov SP, Mikhnovets IE, Nikitin TD, Slesarchuk NA, Uvarova VI, Rubekina AA, Nikolaeva YV, Radchenko EV, Khvatov EV, Orlov AA, Frolenko VS, Sukhorukov MV, Kolpakova ES, Shustova EY, Galochkina AV, Streshnev PP, Osipov EM, Sapozhnikova KA, Moiseenko AV, Brylev VA, Proskurin GV, Dokukin YS, Kutyakov SV, Aralov AV, Korshun VA, Strelkov SV, Palyulin VA, Ishmukhametov AA, Shirshin EA, Osolodkin DI, Shtro AA, Kozlovskaya LI, Alferova VA, Ustinov AV. 5-(Perylen-3-ylethynyl)uracil as an antiviral scaffold: Potent suppression of enveloped virus reproduction by 3-methyl derivatives in vitro. *Antiviral Res*. 2023;209:105508.
 58. Chistov AA, Orlov AA, Streshnev PP, Slesarchuk NA, Aparin IO, Rathi B, Brylev VA, Kutyakov SV, Mikhura IV, Ustinov AV, Westman G, Palyulin VA, Jain N, Osolodkin DI, Kozlovskaya LI, Korshun VA. Compounds based on 5-(perylene-

- 3-ylethynyl)uracil scaffold: High activity against tick-borne encephalitis virus and non-specific activity against enterovirus A. *Eur J Med Chem.* 2019;171:93-103.
59. Cho MH, Niles A, Huang R, Inglese J, Austin CP, Riss T, Xia M. A bioluminescent cytotoxicity assay for assessment of membrane integrity using a proteolytic biomarker. *Toxicol In Vitro.* 2008;22(4):1099-106.
 60. Chu CK, Ma L, Olgen S, Pierra C, Du J, Gumina G, Gullen E, Cheng YC, Schinazi RF. Synthesis and antiviral activity of oxaselenolane nucleosides. *J Med Chem.* 2000;43(21):3906-12.
 61. Ciapetti P, Giethlen B in *The Practice of Medicinal Chemistry*, 3rd ed. (Ed: C. G. Wermuth), Academic Press/Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2008, Ch. 15.
 62. Clas SD, Sanchez RI, Nofsinger R. Chemistry-enabled drug delivery (prodrugs): recent progress and challenges. *Drug Discov Today.* 2014;19(1):79-87.
 63. Collier KE, Berger KL, Heaton NS, Cooper JD, Yoon R, Randall G. RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathog.* 2009;5(12):e1000702.
 64. Colpitts CC, Ustinov AV, Epand RF, Epand RM, Korshun VA, Schang LM. 5-(Perylen-3-yl)ethynyl-arabino-uridine (aUY11), an arabino-based rigid amphipathic fusion inhibitor, targets virion envelope lipids to inhibit fusion of influenza virus, hepatitis C virus, and other enveloped viruses. *J Virol.* 2013;87(7):3640-54.
 65. COVID Treatment, — URL: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/therapies/antivirals-including-antibody-products/summary-recommendations/> (дата обращения: 28.02.2023)
 66. Coyne CB, Oberste MS, Pallansch MA. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses in *Fields Virology: Emerging Viruses*, 7th Ed., Eds. Howley PM, Knipe DM, Whelan S, Wolters Kluwer, 2020:86-128.
 67. Curreli F, Kwon YD, Zhang H, Scacalossi D, Belov DS, Tikhonov AA, Andreev IA, Altieri A, Kurkin AV, Kwong PD, Debnath AK. Structure-Based Design of a

- Small Molecule CD4-Antagonist with Broad Spectrum Anti-HIV-1 Activity. *J Med Chem.* 2015;58(17):6909-6927.
68. Curreli F, Victor SMB, Ahmed S, Drelich A, Tong X, Tseng CK, Hillyer CD, Debnath AK. Stapled Peptides Based on Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Potently Inhibit SARS-CoV-2 Infection In Vitro. *mBio.* 2020;11(6):e02451-20.
 69. Darvas F, Dormán G, Krajcsi P, Puskás LG, Kovári Z, Lörincz Z, Urge L. Recent advances in chemical genomics. *Curr Med Chem.* 2004;11(23):3119-45.
 70. Das K, Arnold E. HIV-1 reverse transcriptase and antiviral drug resistance. Part 1. *Curr Opin Virol.* 2013;3(2):111-8.
 71. De Burghgraeve T, Selisko B, Kaptein S, Chatelain G, Leyssen P, Debing Y, Jacobs M, Van Aerschot A, Canard B, Neyts J. 3',5'Di-O-trityluridine inhibits in vitro flavivirus replication. *Antiviral Res.* 2013;98(2):242-7.
 72. De Clercq E, Li G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(3):695-747.
 73. De Clercq E. A 40-year journey in search of selective antiviral chemotherapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2011;51:1-24.
 74. De Clercq E. Dancing with chemical formulae of antivirals: a personal account. *Biochem Pharmacol.* 2013;86(6):711-25.
 75. De Clercq E. Highlights in antiviral drug research: antivirals at the horizon. *Med Res Rev.* 2013;33(6):1215-48.
 76. de Vries M, Mohamed AS, Prescott RA, Valero-Jimenez AM, Desvignes L, O'Connor R, Stepan C, Devlin JC, Ivanova E, Herrera A, Schinlever A, Loose P, Ruggles K, Koralov SB, Anderson AS, Binder J, Dittmann M. A comparative analysis of SARS-CoV-2 antivirals characterizes 3CLpro inhibitor PF-00835231 as a potential new treatment for COVID-19. *J Virol.* 2021;95(7):e01819-20.
 77. Demartis S, Obinu A, Gavini E, Giunchedi P, Rassu G. Nanotechnology-Based Rose Bengal: A Broad-Spectrum Biomedical Tool. *Dyes Pigm.* 2021;188:109236.

78. Demina TV, Dzhioev YP, Verkhovzina MM, Kozlova IV, Tkachev SE, Plyusnin A, Doroshchenko EK, Lisak OV, Zlobin VI. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes. *J Med Virol*. 2010 May;82(6):965-76.
79. Donzella GA, Schols D, Lin SW, Esté JA, Nagashima KA, Maddon PJ, Allaway GP, Sakmar TP, Henson G, De Clercq E, Moore JP. AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat Med*. 1998;4(1):72-7.
80. Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, Mori J, Rickett G, Smith-Burchnell C, Napier C, Webster R, Armour D, Price D, Stammen B, Wood A, Perros M. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(11):4721-32.
81. Doyon L, Tremblay S, Bourgon L, Wardrop E, Cordingley MG. Selection and characterization of HIV-1 showing reduced susceptibility to the non-peptidic protease inhibitor tipranavir. *Antiviral Res*. 2005;68(1):27-35.
82. Drenichev MS, Oslovsky VE, Sun L, Tijsma A, Kurochkin NN, Tararov VI, Chizhov AO, Neyts J, Pannecouque C, Leyssen P, Mikhailov SN. Modification of the length and structure of the linker of N(6)-benzyladenosine modulates its selective antiviral activity against enterovirus 71. *Eur J Med Chem*. 2016;111:84-94.
83. Drenichev MS, Oslovsky VE, Sun L, Tijsma A, Kurochkin NN, Tararov VI, Chizhov AO, Neyts J, Pannecouque C, Leyssen P, Mikhailov SN. Modification of the length and structure of the linker of N(6)-benzyladenosine modulates its selective antiviral activity against enterovirus 71. *Eur J Med Chem*. 2016;111:84-94.
84. Drews J. Genomic sciences and the medicine of tomorrow. *Nat Biotechnol*. 1996;14(11):1516-8.

85. Du J, Surzhykov S, Lin JS, Newton MG, Cheng YC, Schinazi RF, Chu CK. Synthesis, anti-human immunodeficiency virus and anti-hepatitis B virus activities of novel oxaselenolane nucleosides. *J Med Chem*. 1997;40(19):2991-3.
86. Dueva EV, Tuchynskaya KK, Kozlovskaya LI, Osolodkin DI, Sedenkova KN, Averina EB, Palyulin VA, Karganova GG. Spectrum of antiviral activity of 4-aminopyrimidine N-oxides against a broad panel of tick-borne encephalitis virus strains. *Antivir Chem Chemother*. 2020;28:2040206620943462
87. Eastman RT, Roth JS, Brimacombe KR, Simeonov A, Shen M, Patnaik S, Hall MD. Remdesivir: A Review of Its Discovery and Development Leading to Emergency Use Authorization for Treatment of COVID-19. *ACS Cent Sci*. 2020;6(5):672-683.
88. Eder J, Sedrani R, Wiesmann C. The discovery of first-in-class drugs: origins and evolution. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(8):577-87
89. Edwards TE, Cekan P, Reginsson GW, Shelke SA, Ferré-D'Amaré AR, Schiemann O, Sigurdsson ST. Crystal structure of a DNA containing the planar, phenoxazine-derived bi-functional spectroscopic probe C. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(10):4419-26.
90. Ehteshami M, Tao S, Zandi K, Hsiao HM, Jiang Y, Hammond E, Amblard F, Russell OO, Merits A, Schinazi RF. Characterization of β -d-N4-Hydroxycytidine as a Novel Inhibitor of Chikungunya Virus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(4):e02395-16
91. Eyer L, Šmídková M, Nencka R, Neča J, Kastl T, Palus M, De Clercq E, Růžek D. Structure-activity relationships of nucleoside analogues for inhibition of tick-borne encephalitis virus. *Antiviral Res*. 2016;133:119-29.
92. Eyer L, Šmídková M, Nencka R, Neča J, Kastl T, Palus M, De Clercq E, Růžek D. Structure-activity relationships of nucleoside analogs for inhibition of tick-borne encephalitis virus. *Antivir Res*. 2016;133:119–29.
93. Eyer L, Valdés JJ, Gil VA, Nencka R, Hřebabecký H, Šála M, Salát J, Černý J, Palus M, De Clercq E, Růžek D. Nucleoside inhibitors of tick-borne encephalitis virus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(9):5483-93.

94. Eyer L, Valdés JJ, Gil VA, Nencka R, Hřebabecký H, Šála M, Salát J, Černý J, Palus M, De Clercq E, Růžek D. Nucleoside inhibitors of tick-borne encephalitis virus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:5483–93.
95. Feng Y, Mitchison TJ, Bender A, Young DW, Tallarico JA. Multi-parameter phenotypic profiling: using cellular effects to characterize small-molecule compounds. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(7):567-78.
96. Ferreira AM, Carmagnola I, Chiono V, Gentile P, Fracchia L, Ceresa C, Georgiev G, Ciardelli G. Surface Modification of Poly(Dimethylsiloxane) by Two-Step Plasma Treatment for Further Grafting with Chitosan–Rose Bengal Photosensitizer. *Surf. Coat. Technol*. 2013;223:92–7.
97. Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, Shen Y, Smith WB, Fedorov O, Morse EM, Keates T, Hickman TT, Felletar I, Philpott M, Munro S, McKeown MR, Wang Y, Christie AL, West N, Cameron MJ, Schwartz B, Heightman TD, La Thangue N, French CA, Wiest O, Kung AL, Knapp S, Bradner JE. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*. 2010;468(7327):1067-73.
98. Fishman MC, Porter JA. Pharmaceuticals: a new grammar for drug discovery. *Nature*. 2005;437(7058):491-3.
99. Flint J, Racaniello V, Rall G, Skalka A. Principles of virology, 4th edition, American Society for Microbiology, 2015.
100. Frey G, Rits-Volloch S, Zhang XQ, Schooley RT, Chen B, Harrison SC. Small molecules that bind the inner core of gp41 and inhibit HIV envelope-mediated fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(38):13938-43.
101. Fu L, Ye F, Feng Y, Yu F, Wang Q, Wu Y, Zhao C, Sun H, Huang B, Niu P, Song H, Shi Y, Li X, Tan W, Qi J, Gao GF. Both Boceprevir and GC376 efficaciously inhibit SARS-CoV-2 by targeting its main protease. *Nat Commun*. 2020;11(1):4417.
102. Fuchi Y, Obayashi H, Sasaki S. Development of new 1,3-diazaphenoxazine derivatives (thioG-grasp) to covalently capture 8-thioguanosine. *Molecules*. 2015;20(1):1078-87.

103. Fuchi Y, Sasaki S. Efficient covalent capture of 8-nitroguanosine via a multiple hydrogen-bonded complex. *Org Lett*. 2014;16(6):1760-3.
104. Fuchi Y, Sasaki S. New NitroG-Grasp Molecules with Enhanced Capture Reactivity for 8-Nitroguanosine in the Aqueous Media. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2015;63(11):913-9.
105. Füzik T, Formanová P, Růžek D, Yoshii K, Niedrig M, Plevka P. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody. *Nat Commun*. 2018;9(1):436.
106. Gao M, Nettles RE, Belema M, Snyder LB, Nguyen VN, Fridell RA, Serrano-Wu MH, Langley DR, Sun JH, O'Boyle DR 2nd, Lemm JA, Wang C, Knipe JO, Chien C, Colonno RJ, Grasela DM, Meanwell NA, Hamann LG. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature*. 2010;465(7294):96-100.
107. Gardarsson H, Kale AS, Sigurdsson ST. Structure-function relationships of phenoxazine nucleosides for identification of mismatches in duplex DNA by fluorescence spectroscopy. *Chembiochem*. 2011;12(4):567-75.
108. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, Bode JG, Bolleyn J, Borner C, Böttger J, Braeuning A, Budinsky RA, Burkhardt B, Cameron NR, Camussi G, Cho CS, Choi YJ, Craig Rowlands J, Dahmen U, Damm G, Dirsch O, Donato MT, Dong J, Dooley S, Drasdo D, Eakins R, Ferreira KS, Fonsato V, Fraczek J, Gebhardt R, Gibson A, Glanemann M, Goldring CE, Gómez-Lechón MJ, Groothuis GM, Gustavsson L, Guyot C, Hallifax D, Hammad S, Hayward A, Häussinger D, Hellerbrand C, Hewitt P, Hoehme S, Holzhütter HG, Houston JB, Hrach J, Ito K, Jaeschke H, Keitel V, Kelm JM, Kevin Park B, Kordes C, Kullak-Ublick GA, LeCluyse EL, Lu P, Luebke-Wheeler J, Lutz A, Maltman DJ, Matz-Soja M, McMullen P, Merfort I, Messner S, Meyer C, Mwinyi J, Naisbitt DJ, Nussler AK, Olinga P, Pampaloni F, Pi J, Pluta L, Przyborski SA, Ramachandran A, Rogiers V, Rowe C, Schelcher C, Schmich K, Schwarz M, Singh B, Stelzer EH, Stieger B, Stöber R, Sugiyama Y, Tetta C, Thasler WE, Vanhaecke T, Vinken M, Weiss TS, Widera A, Woods CG, Xu JJ, Yarborough

- KM, Hengstler JG. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol.* 2013;87(8):1315-530.
109. Gonzalez RJ, Tarloff JB. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicol In Vitro* 2001;15:257–9.
 110. Goudgaon NM, Schinazi RF. Activity of acyclic 6-(phenylselenenyl)pyrimidine nucleosides against human immunodeficiency viruses in primary lymphocytes. *J Med Chem.* 1991;34(11):3305-9.
 111. Gowen BB, Wong MH, Jung KH, Sanders AB, Mendenhall M, Bailey KW, Furuta Y, Sidwell RW. In vitro and in vivo activities of T-705 against arenavirus and bunyavirus infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(9):3168–76.
 112. Grard G, Moureau G, Charrel RN, Lemasson JJ, Gonzalez JP, Gallian P, Gritsun TS, Holmes EC, Gould EA, de Lamballerie X. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology.* 2007;361(1):80-92.
 113. Griffin DE, Weaver SC. Alphaviruses in *Fields Virology: Emerging Viruses*, 7th Ed., Eds. Howley PM, Knipe DM, Whelan S, Wolters Kluwer, 2020:194-245.
 114. Gunst JD, Staerke NB, Pahus MH, Kristensen LH, Bodilsen J, Lohse N, Dalgaard LS, Brønnum D, Frøbert O, Hønge B, Johansen IS, Monrad I, Erikstrup C, Rosendal R, Vilstrup E, Mariager T, Bove DG, Offersen R, Shakar S, Cajander S, Jørgensen NP, Sritharan SS, Breining P, Jespersen S, Mortensen KL, Jensen ML, Kolte L, Frattari GS, Larsen CS, Storgaard M, Nielsen LP, Tolstrup M, Sædder EA, Østergaard LJ, Ngo HTT, Jensen MH, Højen JF, Kjolby M, Søgaard OS. Efficacy of the TMPRSS2 inhibitor camostat mesilate in patients hospitalized with Covid-19-a double-blind randomized controlled trial. *EClinicalMedicine.* 2021;35:100849.
 115. Guo Y, Huang L, Zhang G, Yao Y, Zhou H, Shen S, Shen B, Li B, Li X, Zhang Q, Chen M, Chen D, Wu J, Fu D, Zeng X, Feng M, Pi C, Wang Y, Zhou X, Lu M, Li Y, Fang Y, Lu YY, Hu X, Wang S, Zhang W, Gao G, Adrian F, Wang Q,

- Yu F, Peng Y, Gabibov AG, Min J, Wang Y, Huang H, Stepanov A, Zhang W, Cai Y, Liu J, Yuan Z, Zhang C, Lou Z, Deng F, Zhang H, Shan C, Schweizer L, Sun K, Rao Z. A SARS-CoV-2 neutralizing antibody with extensive Spike binding coverage and modified for optimal therapeutic outcomes. *Nat Commun.* 2021;12(1):2623.
116. Hadj Hassine I, Ben M'hadheb M, Menéndez-Arias L. Lethal Mutagenesis of RNA Viruses and Approved Drugs with Antiviral Mutagenic Activity. *Viruses.* 2022;14(4):841
 117. Hall SE. Chemoproteomics-driven drug discovery: addressing high attrition rates. *Drug Discov Today.* 2006;11(11-12):495-502.
 118. Han Y, Král P. Computational Design of ACE2-Based Peptide Inhibitors of SARS-CoV-2. *ACS Nano.* 2020;14(4):5143-5147.
 119. Hanna GJ, Lalezari J, Hellinger JA, Wohl DA, Nettles R, Persson A, Krystal M, Lin P, Colonna R, Grasela DM. Antiviral activity, pharmacokinetics, and safety of BMS-488043, a novel oral small-molecule HIV-1 attachment inhibitor, in HIV-1-infected subjects. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(2):722-8.
 120. Hatse S, Princen K, De Clercq E, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Hernandez-Abad PE, Skerlj RT, Bridger GJ, Schols D. AMD3465, a monomacrocyclic CXCR4 antagonist and potent HIV entry inhibitor. *Biochem Pharmacol.* 2005;70(5):752-61.
 121. Hattori SI, Higashi-Kuwata N, Hayashi H, Allu SR, Raghavaiah J, Bulut H, Das D, Anson BJ, Lendy EK, Takamatsu Y, Takamune N, Kishimoto N, Murayama K, Hasegawa K, Li M, Davis DA, Kodama EN, Yarchoan R, Wlodawer A, Misumi S, Mesecar AD, Ghosh AK, Mitsuya H. A small molecule compound with an indole moiety inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication. *Nat Commun.* 2021;12(1):668.
 122. Haviernik J, Eyer L, Yoshii K, Kobayashi S, Cerny J, Nougairède A, Driouich JS, Volf J, Palus M, de Lamballerie X, Gould EA, Ruzek D. Development and characterization of recombinant tick-borne encephalitis virus expressing mCherry

- reporter protein: A new tool for high-throughput screening of antiviral compounds, and neutralizing antibody assays. *Antiviral Res.* 2021;185:104968.
123. Hayashi K, Hayashi T, Tomoda A. Phenoxazine derivatives inactivate human cytomegalovirus, herpes simplex virus-1, and herpes simplex virus-2 in vitro. *J Pharmacol Sci.* 2008;106(3):369-75.
 124. Hézode C, Hirschfield GM, Ghesquiere W, Sievert W, Rodriguez-Torres M, Shafran SD, Thuluvath PJ, Tatum HA, Waked I, Esmat G, Lawitz EJ, Rustgi VK, Pol S, Weis N, Pockros PJ, Bourlière M, Serfaty L, Vierling JM, Fried MW, Weiland O, Brunetto MR, Everson GT, Zeuzem S, Kwo PY, Sulkowski M, Bräu N, Hernandez D, McPhee F, Wind-Rotolo M, Liu Z, Noviello S, Hughes EA, Yin PD, Schnittman S. Daclatasvir plus peginterferon alfa and ribavirin for treatment-naïve chronic hepatitis C genotype 1 or 4 infection: a randomised study. *Gut.* 2015;64(6):948-56
 125. Hitchcock MJ. In vitro antiviral activity of didanosine compared with that of other dideoxynucleoside analogs against laboratory strains and clinical isolates of human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis.* 1993;16 Suppl 1:S16-21.
 126. Hoffman RL, Kania RS, Brothers MA, Davies JF, Ferre RA, Gajiwala KS, He M, Hogan RJ, Kozminski K, Li LY, Lockner JW, Lou J, Marra MT, Mitchell LJ Jr, Murray BW, Nieman JA, Noell S, Planken SP, Rowe T, Ryan K, Smith GJ 3rd, Solowiej JE, Stepan CM, Taggart B. Discovery of Ketone-Based Covalent Inhibitors of Coronavirus 3CL Proteases for the Potential Therapeutic Treatment of COVID-19. *J Med Chem.* 2020;63(21):12725-12747.
 127. Holmes SC, Arzumanov AA, Gait MJ. Steric inhibition of human immunodeficiency virus type-1 Tat-dependent trans-activation in vitro and in cells by oligonucleotides containing 2'-O-methyl G-clamp ribonucleoside analogues. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(11):2759-68.
 128. Hopkins AL, Groom CR. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(9):727-30.

129. Horvath P, Aulner N, Bickle M, Davies AM, Nery ED, Ebner D, et al. Screening out irrelevant cell-based models of disease. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15(11):751–69.
130. Huang X, Pearce R, Zhang Y. De novo design of protein peptides to block association of the SARS-CoV-2 spike protein with human ACE2. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(12):11263-11276.
131. Huggins JW, Robins RK, Canonico PG, Synergistic antiviral effects of ribavirin and C-nucleoside analogs tiazofurin and selenazofurin against togaviruses, bunyaviruses and arenaviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1984;26:476-480.
132. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol* 2011;162(6):1239–49.
133. ICTV Taxonomy, 2022: URL: <https://ictv.global/taxonomy> (дата обращения 17.07.2023)
134. Imming P, Sinning C, Meyer A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(10):821-34. Erratum in: *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(2):126.
135. Jin Z, Du X, Xu Y, Deng Y, Liu M, Zhao Y, Zhang B, Li X, Zhang L, Peng C, Duan Y, Yu J, Wang L, Yang K, Liu F, Jiang R, Yang X, You T, Liu X, Yang X, Bai F, Liu H, Liu X, Guddat LW, Xu W, Xiao G, Qin C, Shi Z, Jiang H, Rao Z, Yang H. Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature.* 2020;582(7811):289-293.
136. Jordheim LP, Durantel D, Zoulim F, Dumontet C. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(6):447-64.
137. Julander JG, Shafer K, Smee DF, Morrey JD, Furuta Y. Activity of T-705 in a hamster model of yellow fever virus infection in comparison with that of a chemically related compound, T-1106. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(1):202–9.

138. Junjhon J, Edwards TJ, Utaipat U, Bowman VD, Holdaway HA, Zhang W, Keelapang P, Puttikhunt C, Perera R, Chipman PR, Kasinrerker W, Malasit P, Kuhn RJ, Sittisombut N. Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles. *J Virol.* 2010;84(16):8353-8.
139. Kang YL, Chou YY, Rothlauf PW, Liu Z, Soh TK, Cureton D, Case JB, Chen RE, Diamond MS, Whelan SPJ, Kirchhausen T. Inhibition of PIKfyve kinase prevents infection by Zaire ebolavirus and SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(34):20803-20813.
140. Karber. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.* 1931;162:480-483
141. Ke S, Li N, Ke T, Shi L, Zhang Z, Fang W, Zhang YN, Wang K, Zhou R, Wan Z, Yang Z, Zhang G, Wei Y. Synthesis and evaluation of steroidal thiazoline conjugates as potential antiviral agents. *Future Med Chem.* 2018;10(22):2589-2605.
142. Khan A, Benthin C, Zeno B, Albertson TE, Boyd J, Christie JD, Hall R, Poirier G, Ronco JJ, Tidswell M, Hards K, Powley WM, Wright TJ, Siederer SK, Fairman DA, Lipson DA, Bayliffe AI, Lazaar AL. A pilot clinical trial of recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care.* 2017;21(1):234.
143. Khandazhinskaya AL, Matyugina ES, Solyev PN, Wilkinson M, Buckheit KW, Buckheit RW Jr, Chernousova LN, Smirnova TG, Andreevskaya SN, Alzahrani KJ, Natto MJ, Kochetkov SN, de Koning HP, Seley-Radtke KL. Investigation of 5'-Norcarbocyclic Nucleoside Analogues as Antiprotozoal and Antibacterial Agents. *Molecules.* 2019;24(19):3433.
144. Khatri B, Pramanick I, Malladi SK, Rajmani RS, Kumar S, Ghosh P, Sengupta N, Rahisuddin R, Kumar N, Kumaran S, Ringe RP, Varadarajan R, Dutta S, Chatterjee J. A dimeric proteomimetic prevents SARS-CoV-2 infection by dimerizing the spike protein. *Nat Chem Biol.* 2022;18(10):1046-1055.

145. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. 9th report of International Committee on taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, 2012.
146. Kirsi JJ, McKernan PA, Burns NJ 3rd, North JA, Murray BK, Robins RK. Broad-spectrum synergistic antiviral activity of selenazofurin and ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1984;26(4):466-75.
147. Kirsi JJ, North JA, McKernan PA, Murray BK, Canonico PG, Huggins JW, Srivastava PC, Robins RK. Broad-spectrum antiviral activity of 2-beta-D-ribofuranosylselenazole-4-carboxamide, a new antiviral agent. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983;24(3):353-61.
148. Kishimoto Y, Fujii A, Nakagawa O, Nagata T, Yokota T, Hari Y, Obika S. Synthesis and thermal stabilities of oligonucleotides containing 2'-O,4'-C-methylene bridged nucleic acid with a phenoxazine base. *Org Biomol Chem.* 2017;15(38):8145-8152.
149. Klimenko AA, Matyugina ES, Logashenko EB, Solyev PN, Zenkova MA, Kochetkov SN, Khandazhinskaya AL. Novel 5'-Norcarbocyclic Derivatives of Bicyclic Pyrrolo- and Furano[2,3-d]Pyrimidine Nucleosides. *Molecules.* 2018;23(10):2654.
150. Korshun VA, Manasova EV, Balakin KV, Malakhov AD, Perepelov AV, Sokolova TA, MV, Berlin YuA. *Nucleosides & Nucleotides* 1998;17:1809.
151. Korshun VA, Prokhorenko IA, Gontarev SV, Skorobogatyi MV, Balakin KV, Manasova EV, Malakhov AD, Berlin YuA. New pyrene derivatives for fluorescent labeling of oligonucleotides. *Nucleosides & Nucleotides* 1997;16:1461-1464.
152. Kozal M, Aberg J, Pialoux G, Cahn P, Thompson M, Molina JM, Grinsztejn B, Diaz R, Castagna A, Kumar P, Latiff G, DeJesus E, Gummel M, Gartland M, Pierce A, Ackerman P, Llamoso C, Lataillade M; BRIGHT E Trial Team. Fostemsavir in Adults with Multidrug-Resistant HIV-1 Infection. *N Engl J Med.* 2020;382(13):1232-1243.

153. Kozlovskaya L, Piniaeva A, Ignatyev G, Selivanov A, Shishova A, Kovpak A, Gordeychuk I, Ivin Y, Berestovskaya A, Prokhortchouk E, Protsenko D, Rychev M, Ishmukhametov A. Isolation and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 variants collected in Russia during the COVID-19 outbreak. *Int J Infect Dis.* 2020;99:40-46
154. Kozlovskaya LI, Andrei G, Orlov AA, Khvatov EV, Koruchekov AA, Belyaev ES, Nikolaev EN, Korshun VA, Snoeck R, Osolodkin DI, Matyugina ES, Aralov AV. Antiviral activity spectrum of phenoxazine nucleoside derivatives. *Antiviral Res. (Q1)* 2019 163:117-124.
155. Kozlovskaya LI, Golinets AD, Eletskaia AA, Orlov AA, Palyulin AV, Kochetkov SN, Alexandrova LA, Osolodkin DI. Selective Inhibition of Enterovirus A Species Members' Reproduction by Furano[2, 3-d]pyrimidine Nucleosides Revealed by Antiviral Activity Profiling against (+)ssRNA Viruses. *Chemistry Select* 2018, 3:2321-2325.
156. Kozlovskaya LI, Osolodkin DI, Shevtsova AS, Romanova LIu, Rogova YV, Dzhivanian TI, Lyapustin VN, Pivanova GP, Gmyl AP, Palyulin VA, Karganova GG. GAG-binding variants of tick-borne encephalitis virus. *Virology* 2010, 398(2):262-272.
157. Kozlovskaya LI, Piniaeva AN, Ignatyev GM, Gordeychuk IV, Volok VP, Rogova YV, Shishova AA, Kovpak AA, Ivin YY, Antonova LP, Mefyod KM, Prokosheva LS, Sibirskina AS, Tarasova YY, Bayurova EO, Gancharova OS, Illarionova VV, Glukhov GS, Sokolova OS, Shaitan KV, Moysenovich AM, Gulyaev SA, Gulyaeva TV, Moroz AV, Gmyl LV, Ipatova EG, Kirpichnikov MP, Egorov AM, Siniugina AA, Ishmukhametov AA. Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in preclinical studies. *Emerg Microbes Infect.* 2021a;10(1):1790-1806.
158. Kozlovskaya LI, Volok VP, Shtro AA, Nikolaeva YV, Chistov AA, Matyugina ES, Belyaev ES, Jegorov AV, Snoeck R, Korshun VA, Andrei G, Osolodkin DI, Ishmukhametov AA, Aralov AV. Phenoxazine nucleoside derivatives with a

- multiple activity against RNA and DNA viruses. *Eur J Med Chem.* 2021b;220:113467.
159. Krut' VG, Chuvpilo SA, Astrakhantseva IV, Kozlovskaya LI, Efimov GA, Kruglov AA, Drutskaya MS, Nedospasov SA. Will Peptides Help to Stop COVID-19? *Biochemistry (Mosc).* 2022;87(7):590-604.
 160. Kuhn RJ. *Togaviridae: The Viruses and Their Replication in Fields Virology: Emerging Viruses*, 7th Ed., Eds. Howley PM, Knipe DM, Whelan S, Wolters Kluwer, 2020:170-193.
 161. Kunstek H, Vreken F, Keita A, Hamblin MR, Dumarçay F, Varbanov M. Aspects of Antiviral Strategies Based on Different Phototherapy Approaches: Hit by the Light. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022;15(7):858.
 162. Lakadamyali M, Rust MJ, Babcock HP, Zhuang X. Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(16):9280-5.
 163. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 2012;9:357–9.
 164. Lee JA, Berg EL. Neoclassic drug discovery: the case for lead generation using phenotypic and functional approaches. *J Biomol Screen* 2013;18(10):1143–55.
 165. Lenard J, Rabson A, Vanderoef R. Photodynamic inactivation of infectivity of human immunodeficiency virus and other enveloped viruses using hypericin and rose bengal: inhibition of fusion and syncytia formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(1):158-62.
 166. Leung JY, Ng MM, Chu JJ. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. *Adv Virol.* 2011;2011:249640.
 167. Li G, Jing X, Zhang P, De Clercq E. Antiviral Classification. *Encyclopedia of Virology.* 2021:121–30.
 168. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078-9.

169. Li W, Wu J, Zhan P, Chang Y, Pannecouque C, De Clercq E, Liu X. Synthesis, drug release and anti-HIV activity of a series of PEGylated zidovudine conjugates. *Int J Biol Macromol.* 2012;50(4):974-80
170. Li Z, Nakagawa O, Koga Y, Taniguchi Y, Sasaki S. Synthesis of new derivatives of 8-oxoG-clamp for better understanding the recognition mode and improvement of selective affinity. *Bioorg Med Chem.* 2010;18(11):3992-8.
171. Lin KY, Matteucci MD. A Cytosine Analogue Capable of Clamp-Like Binding to a Guanine in Helical Nucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* 1998;120(33):8531-8532.
172. Lindenbach BD, Randall G, Bartenschlager R, Rice CM. *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication in Fields Virology: Emerging Viruses*, 7th Ed., Eds. Howley PM, Knipe DM, Whelan S, Wolters Kluwer, 2020:246-301.
173. Lindenbach, B.; Murray, C.; Thiel, H.-J.; Rice, C. *Flaviviridae*. In *Fields virology*, 6th Edition, Fields, B., Knipe, D., Howley, P., Eds. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2013; pp. 712-746.
174. Linsky TW, Vergara R, Codina N, Nelson JW, Walker MJ, Su W, Barnes CO, Hsiang TY, Esser-Nobis K, Yu K, Reneer ZB, Hou YJ, Priya T, Mitsumoto M, Pong A, Lau UY, Mason ML, Chen J, Chen A, Berrocal T, Peng H, Clairmont NS, Castellanos J, Lin YR, Josephson-Day A, Baric RS, Fuller DH, Walkey CD, Ross TM, Swanson R, Bjorkman PJ, Gale M Jr, Blancas-Mejia LM, Yen HL, Silva DA. De novo design of potent and resilient hACE2 decoys to neutralize SARS-CoV-2. *Science.* 2020;370(6521):1208-1214.
175. Liu Y, Zhang F, Fu C, Wu S, Chen X, Shi Y, Zhou B, Zhang L, Zhang Y, Han S, Yin J, Peng B, He X, Liu W. Combination of intratypic and intertypic recombinant events in EV71: a novel evidence for the "triple-recombinant" strains of genotype A viruses in Mainland China from 2008 to 2010. *Virus Genes.* 2015;50(3):365-74.
176. Lokey RS. Forward chemical genetics: progress and obstacles on the path to a new pharmacopoeia. *Curr Opin Chem Biol.* 2003;7(1):91-6.

177. Lou C, Dallmann A, Marafini P, Gao R, Brown T. Enhanced H-bonding and π -stacking in DNA: a potent duplex-stabilizing and mismatch sensing nucleobase analogue. *Chem. Sci.* 2014;5(10):3836-3844.
178. MacCarthy PT. The Principles of Humic Substances. *Soil Sci.* 2001;166:738–751.
179. Maeda K, Nakata H, Koh Y, Miyakawa T, Ogata H, Takaoka Y, Shibayama S, Sagawa K, Fukushima D, Moravek J, Koyanagi Y, Mitsuya H. Spirodiketopiperazine-based CCR5 inhibitor which preserves CC-chemokine/CCR5 interactions and exerts potent activity against R5 human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *J Virol.* 2004;78(16):8654-62.
180. Mairiang D, Zhang H, Sodja A, Murali T, Suriyaphol P, Malasit P, Limjindaporn T, Finley RL Jr. Identification of new protein interactions between dengue fever virus and its hosts, human and mosquito. *PLoS One.* 2013;8(1):e53535.
181. Mandl CW, Holzmann H, Meixner T, Rauscher S, Stadler PF, Allison SL, Heinz FX. Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus. *J Virol.* 1998;72(3):2132-40.
182. Mariewskaya KA, Tyurin AP, Chistov AA, Korshun VA, Alferova VA, Ustinov AV. Photosensitizing Antivirals. *Molecules.* 2021;26(13):3971.
183. Marsden CJ, Eckersley S, Hebditch M, Kvist AJ, Milner R, Mitchell D, Warwicker J, Marley AE. The Use of Antibodies in Small-Molecule Drug Discovery. *J Biomol Screen.* 2014;19(6):829-38.
184. Maslova AA, Matyugina EC, Shustova EY, Volok VP, Kozlovskaya LI, Kochetkov SN, Khandazhinskaya AL. New Analogues of Uridine as Possible Anti-Viral Agents Specific to SARS-CoV-2. *Mol Biol.* 2022;56(3):469-473.
185. Matyugina E, Khandazhinskaya A, Chernousova L, Andreevskaya S, Smirnova T, Chizhov A, Karpenko I, Kochetkov S, Alexandrova L. The synthesis and antituberculosis activity of 5'-nor carbocyclic uracil derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2012a;20(22):6680-6.
186. Matyugina E, Novikov M, Babkov D, Ozerov A, Chernousova L, Andreevskaya S, Smirnova T, Karpenko I, Chizhov A, Murthu P, Lutz S, Kochetkov S, Seley-

- Radtke KL, Khandazhinskaya AL. 5-Arylaminoouracil Derivatives: New Inhibitors of Mycobacterium tuberculosis. *Chem Biol Drug Des.* 2015;86(6):1387-96.
187. Matyugina ES, Andreevskaya SN, Smirnova TG, Khandazhinskaya AL. Carbocyclic analogues of inosine-5'-monophosphate: synthesis and biological activity. *Acta Naturae.* 2012b;4(4):73-7.
 188. Matyugina ES, Novikov MS, Babkov DA, Valuev-Elliston VT, Vanpouille C, Zicari S, Corona A, Tramontano E, Margolis LB, Khandazhinskaya AL, Kochetkov SN. 5-Arylaminoouracil Derivatives as Potential Dual-Action Agents. *Acta Naturae.* 2015a;7(3):113-5.
 189. Matyugina ES, Novikov MS, Kozlovskaya LI, Volok VP, Shustova EY, Ishmukhametov AA, Kochetkov SN, Khandazhinskaya AL. Evaluation of the Antiviral Potential of Modified Heterocyclic Base and 5'-Norcarbocyclic Nucleoside Analogs Against SARS-CoV-2. *Acta Naturae.* 2021;13(4):78-81.
 190. Matyugina ES, Valuev-Elliston VT, Babkov DA, Novikov MS, Ivanov AV, Kochetkov SN, Balzarini J, Seley-Radtke KL, Khandazhinskaya AL. 5'-Norcarbocyclic nucleosides: unusual nonnucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Medchemcomm* 2013a;4:741-8.
 191. Matyugina ES, Valuev-Elliston VT, Babkov DA, Novikov MS, Ivanov AV, Kochetkov SN, Balzarini J, Seley-Radtke KL, Khandazhinskaya AL. Structure-activity evaluation of new uracil-based non-nucleoside inhibitors of HIV reverse transcriptase. *Medchemcomm* 2013b;4:1443-51.
 192. McGuigan C, Serpi M, Slusarczyk M, Ferrari V, Pertusati F, Meneghesso S, Derudas M, Farleigh L, Zanetta P, Bugert J. Anti-flavivirus Activity of Different Tritylated Pyrimidine and Purine Nucleoside Analogues. *ChemistryOpen.* 2016;5(3):227-35.
 193. Melroy J, Nair V. The antiviral activity, mechanism of action, clinical significance and resistance of abacavir in the treatment of pediatric AIDS. *Curr Pharm Des.* 2005; 11(29):3847-52.

194. Mendenhall M, Russell A, Juelich T, Messina EL, Smee DF, Freiberg AN, Holbrook MR, Furuta Y, de la Torre JC, Nunberg JH, Gowen BB. T-705 (favipiravir) inhibition of arenavirus replication in cell culture. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(2):782–7.
195. Menéndez CA, Byléhn F, Perez-Lemus GR, Alvarado W, de Pablo JJ. Molecular characterization of ebsele binding activity to SARS-CoV-2 main protease. *Sci Adv*. 2020;6(37):eabd0345.
196. Mhatre S, Srivastava T, Naik S, Patravale V. Antiviral activity of green tea and black tea polyphenols in prophylaxis and treatment of COVID-19: A review. *Phytomedicine*. 2021;85:153286.
197. Minutoli L, Squadrito F, Altavilla D, Marini H in *Selenium Chemistry, Analysis, Function and Effects* (Ed: V. R. Preedy), The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2015, Ch. 21.
198. Mitjà O, Corbacho-Monné M, Ubals M, Alemany A, Suñer C, Tebé C, Tobias A, Peñafiel J, Ballana E, Pérez CA, Admella P, Riera-Martí N, Laporte P, Mitjà J, Clua M, Bertran L, Sarquella M, Gavilán S, Ara J, Argimon JM, Cuatrecasas G, Cañadas P, Elizalde-Torrent A, Fabregat R, Farré M, Forcada A, Flores-Mateo G, López C, Muntada E, Nadal N, Narejos S, Nieto A, Prat N, Puig J, Quiñones C, Ramírez-Viaplana F, Reyes-Urueña J, Riveira-Muñoz E, Ruiz L, Sanz S, Sentís A, Sierra A, Velasco C, Vivanco-Hidalgo RM, Zamora J, Casabona J, Vall-Mayans M, González-Beiras C, Clotet B; BCN-PEP-CoV2 Research Group. A Cluster-Randomized Trial of Hydroxychloroquine for Prevention of Covid-19. *N Engl J Med*. 2021;384(5):417-427.
199. Modis, Y.; Ogata, S.; Clements, D.; Harrison, S. C. A Ligand-Binding Pocket in the Dengue Virus Envelope Glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2003;100:6986-6991.
200. Moffat JG, Vincent F, Lee JA, Eder J, Prunotto M. Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: an industry perspective. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(8):531-543.

201. Monteil V, Kwon H, Prado P, Hagelkrüys A, Wimmer RA, Stahl M, Leopoldi A, Garreta E, Hurtado Del Pozo C, Prosper F, Romero JP, Wirnsberger G, Zhang H, Slutsky AS, Conder R, Montserrat N, Mirazimi A, Penninger JM. Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. *Cell*. 2020;181(4):905-913.e7.
202. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
203. Mughesh G, du Mont WW, Sies H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. *Chem Rev*. 2001;101(7):2125-79.
204. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(1):13-22.
205. Nadysev GY, Tikhomirov AS, Lin MH, Yang YT, Dezhenkova LG, Chen HY, Kaluzhny DN, Schols D, Shtil AA, Shchekotikhin AE, Chueh PJ. Aminomethylation of heliomycin: Preparation and anticancer characterization of the first series of semi-synthetic derivatives. *Eur J Med Chem*. 2018;143:1553-1562.
206. Nakagawa O, Ono S, Tsujimoto A, Li Z, Sasaki S. Selective fluorescence detection of 8-oxoguanosine with 8-oxoG-clamp. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2007;26(6-7):645-9.
207. Nakane M, Kawai A. Focus formation by the human immunodeficiency virus (HIV) in the immobilized MT-4 cell culture and its application to the evaluation of anti-HIV agents. *Microbiol Immunol*. 1992;36(7):707-19.
208. Nasr T, Li Z, Nakagawa O, Taniguchi Y, Ono S, Sasaki S. Selective fluorescence quenching of the 8-oxoG-clamp by 8-oxodeoxyguanosine in ODN. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19(3):727-30.
209. Nebbioso A, Piccolo A. Basis of a humeomics science: chemical fractionation and molecular characterization of humic biosuprastructures. *Biomacromolecules*. 2011;12(4):1187-99.

210. Nikitin N, Trifonova E, Evtushenko E, Kirpichnikov M, Atabekov J, et al. Comparative study of non-enveloped icosahedral viruses size. *PLoS One* 2015;10:e0142415.
211. Nikitina AA, Orlov AA, Kozlovskaya LI, Palyulin VA, Osolodkin DI. Enhanced taxonomy annotation of antiviral activity data from ChEMBL. Database (Oxford). 2019;2019: bay139.
212. Nowicka-Sans B, Gong YF, McAuliffe B, Dicker I, Ho HT, Zhou N, Eggers B, Lin PF, Ray N, Wind-Rotolo M, Zhu L, Majumdar A, Stock D, Lataillade M, Hanna GJ, Matiskella JD, Ueda Y, Wang T, Kadow JF, Meanwell NA, Krystal M. In vitro antiviral characteristics of HIV-1 attachment inhibitor BMS-626529, the active component of the prodrug BMS-663068. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(7):3498-507.
213. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 2000;267:5421–6.
214. Ojwang JO, Ali S, Smee DF, Morrey JD, Shimasaki CD, Sidwell RW. Broad-spectrum inhibitor of viruses in the Flaviviridae family. *Antiviral Res*. 2005;68(2):49-55.
215. Orlov AA, Chistov AA, Kozlovskaya LI, Ustinov AV, Korshun VA, Karganova GG, Osolodkin DI. Rigid amphipathic nucleosides suppress reproduction of tick-borne encephalitis virus. *Medicinal Chemistry Communications* 2016;7:495-499.
216. Orlov AA, Drenichev MS, Oslovsky VE, Kurochkin NN, Solyev PN, Kozlovskaya LI, Palyulin VA, Karganova GG, Mikhailov SN, Osolodkin DI. New tools in nucleoside toolbox of tick-borne encephalitis virus reproduction inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2017;27(5):1267-1273.
217. Orlov AA, Eletskaia AA, Frolov KA, Golinets AD, Palyulin VA, Krivokolysko SG, Kozlovskaya LI, Dotsenko VV, Osolodkin DI. Probing chemical space of tick-borne encephalitis virus reproduction inhibitors with organoselenium compounds. *Arch Pharm (Weinheim)* 2018;351(6):e1700353.

218. Orlov AA, Zhrebker A, Eletskaia AA, Chernikov VS, Kozlovskaya LI, Zhernov YV, Kostyukevich Y, Palyulin VA, Nikolaev EN, Osolodkin DI, Perminova IV. Examination of molecular space and feasible structures of bioactive components of humic substances by FTICR MS data mining in ChEMBL database. *Sci Rep.* 2019;9(1):12066
219. Ortega JA, Blas JR, Orozco M, Grandas A, Pedroso E, Robles J. Binding affinities of oligonucleotides and PNAs containing phenoxazine and G-clamp cytosine analogues are unusually sequence-dependent. *Org Lett.* 2007;9(22):4503-6.
220. Oslovsky VE, Drenichev MS, Sun L, Kurochkin NN, Kunetsky VE, Mirabelli C, Neyts J, Leyssen P, Mikhailov SN. Fluorination of Naturally Occurring N⁶-Benzyladenosine Remarkably Increased Its Antiviral Activity and Selectivity. *Molecules.* 2017;22(7):1219.
221. Osolodkin DI, Kozlovskaya LI, Dueva EV, Dotsenko VV, Rogova YV, Frolov KA, Krivokolysko SG, Romanova EG, Morozov AS, Karganova GG, Palyulin VA, Pentkovski VM, Zefirov NS. Inhibitors of Tick-Borne Flavivirus Reproduction from Structure-Based Virtual Screening. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2013;4:869-874.
222. Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(12):993-6.
223. Pallansch M.A., Oberste M.S., Whitton J.L., Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses, in D.M. Knipe, P.M. Howley (Eds.), *Fields Virology*, sixth ed., Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013, pp. 490e530.
224. Pang L, Sager P, Yang X, Shi H, Sannajust F, Brock M, Wu JC, Abi-Gerges N, Lyn-Cook B, Berridge BR, Stockbridge N. Workshop Report: FDA Workshop on Improving Cardiotoxicity Assessment With Human-Relevant Platforms. *Circ Res.* 2019;125(9):855-867.
225. Paricharak S, IJerman AP, Jenkins JL, Bender A, Nigsch F. Data-driven derivation of an informer compound set for improved selection of active

- compounds in high-throughput screening. *J Chem Inf Model* 2016;56(9):1622–30.
226. Pchelintseva AA, Skorobogatyj MV, Petrunina AL, Andronova VL, Galegov GA, Astakhova IV, Ustinov AV, Malakhov AD, Korshun VA. Synthesis and evaluation of anti-HSV activity of new 5-alkynyl-2'-deoxyuridines. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2005;24(5-7):923-6.
227. Peng T. Strategies for antiviral screening targeting early steps of virus infection. *Virol Sin*. 2010;25(4):281-93.
228. Perlman S, Masters PS. Coronaviridae: The Viruses and Their Replication in *Fields Virology: Emerging Viruses*, 7th Ed., Eds. Howley PM, Knipe DM, Whelan S, Wolters Kluwer, 2020:410-448.
229. Perminova IV, Hatfield, K. In *Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice*. (Eds Perminova, I. V., Hatfield, K. & Hertkorn, N.) 3–36 (Springer Science & Business Media, 2005)
230. Perrone R, Doria F, Butovskaya E, Frasson I, Botti S, Scalabrin M, Lago S, Grande V, Nadai M, Freccero M, Richter SN. Synthesis, Binding and Antiviral Properties of Potent Core-Extended Naphthalene Diimides Targeting the HIV-1 Long Terminal Repeat Promoter G-Quadruplexes. *J Med Chem*. 2015;58(24):9639-52.
231. Pevear DC, Tull TM, Seipel ME, Groarke JM. Activity of pleconaril against enteroviruses. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(9):2109-15.
232. Pierson TC, Diamond MS in *Fields Virology*, Vol. 1 (Eds.: D. M. Knipe, P. Howley), LWW, Philadelphia, 2013, pp. 747-794
233. Pietka-Ottlik M, Potaczek P, Piasecki E, Mlochowski J. Crucial role of selenium in the virucidal activity of benzisoselenazol-3(2H)-ones and related diselenides. *Molecules*. 2010;15(11):8214-28.
234. Pietka-Ottlik M, Wójtowicz-Młochowska H, Kołodziejczyk K, Piasecki E, Młochowski J. New organoselenium compounds active against pathogenic bacteria, fungi and viruses. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2008;56(10):1423-7.

235. Pina AS, Hussain A, Roque AC. An historical overview of drug discovery. *Methods Mol Biol.* 2009;572:3-12.
236. Planken SP, Rowe T, Ryan K, Smith GJ 3rd, Solowiej JE, Stepan CM, Taggart B. Discovery of Ketone-Based Covalent Inhibitors of Coronavirus 3CL Proteases for the Potential Therapeutic Treatment of COVID-19. *J Med Chem.* 2020;63(21):12725-12747.
237. Plenge RM. Disciplined approach to drug discovery and early development. *Sci Transl Med.* 2016;8(349):349ps15.
238. Pletnev AG, Yamshchikov VF, Blinov VM. Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the polyprotein of tick-borne encephalitis virus. *Virology.* 1990;174(1):250-63.
239. Pomplun S. Targeting the SARS-CoV-2-spike protein: from antibodies to miniproteins and peptides. *RSC Med Chem.* 2020;12(2):197-202.
240. Postnikova E, Cong Y, DeWald LE, Dyllal J, Yu S, Hart BJ, Zhou H, Gross R, Logue J, Cai Y, Deiuliis N, Michelotti J, Honko AN, Bennett RS, Holbrook MR, Olinger GG, Hensley LE, Jahrling PB. Testing therapeutics in cell-based assays: Factors that influence the apparent potency of drugs. *PLoS One.* 2018;13(3):e0194880.
241. Proskurin GV, Orlov AA, Brylev VA, Kozlovskaya LI, Chistov AA, Karganova GG, Palyulin VA, Osolodkin DI, Korshun VA, Aralov AV. 3'-O-Substituted 5-(perylene-3-ylethynyl)-2'-deoxyuridines as tick-borne encephalitis virus reproduction inhibitors. *Eur J Med Chem* 2018;155:77-83.
242. Pruss RM. Phenotypic screening strategies for neurodegenerative diseases: a pathway to discover novel drug candidates and potential disease targets or mechanisms. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010;9(6):693-700.
243. PubChem 1. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Bioassay Record for AID 720532, Source: National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS) – URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/720532> (дата обращения: 17.03.2023)

244. PubChem 2. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Bioassay Record for AID 720533, Source: National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS) – URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/720533> (дата обращения: 17.03.2023)
245. Qi B, Fang Q, Liu S, Hou W, Li J, Huang Y, Shi J. Advances of CCR5 antagonists: From small molecules to macromolecules. *Eur J Med Chem.* 2020;208:112819.
246. Rabie AM, Abdalla M. Evaluation of a series of nucleoside analogs as effective anticoronaviral-2 drugs against the Omicron-B.1.1.529/BA.2 subvariant: A repurposing research study. *Med Chem Res.* 2023;32(2):326-341.
247. Rampersad SN. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel).* 2012;12(9):12347-60.
248. Rask-Andersen M, Almén MS, Schiöth HB. Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(8):579-90.
249. Reaume AG Drug repurposing through nonhypothesis driven phenotypic screening. *Drug Discov. Today. Ther. Strat.* 2011;8:85–88.
250. RECOVERY Collaborative Group; Horby P, Mafham M, Linsell L, Bell JL, Staplin N, Emberson JR, Wiselka M, Ustianowski A, Elmahi E, Prudon B, Whitehouse T, Felton T, Williams J, Faccenda J, Underwood J, Baillie JK, Chappell LC, Faust SN, Jaki T, Jeffery K, Lim WS, Montgomery A, Rowan K, Tarning J, Watson JA, White NJ, Juszczak E, Haynes R, Landray MJ. Effect of Hydroxychloroquine in Hospitalized Patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2020 Nov 19;383(21):2030-2040.
251. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology* 1938;27(3):493–497.
252. Reynard O, Nguyen XN, Alazard-Dany N, Barateau V, Cimorelli A, Volchkov VE. Identification of a New Ribonucleoside Inhibitor of Ebola Virus Replication. *Viruses.* 2015;7(12):6233-40. Erratum in: *Viruses.* 2016;8(5). pii: E137.

253. Rezende N, Ceron Jayme C, Brassesco MS, Claudio Tedesco A, de Oliveira HF. Standardization of a resazurin-based assay for the evaluation of metabolic activity in oral squamous carcinoma and glioblastoma cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;26:371-374.
254. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1458-61.
255. Riva L, Yuan S, Yin X, Martin-Sancho L, Matsunaga N, Pache L, Burgstaller-Muehlbacher S, De Jesus PD, Teriete P, Hull MV, Chang MW, Chan JF, Cao J, Poon VK, Herbert KM, Cheng K, Nguyen TH, Rubanov A, Pu Y, Nguyen C, Choi A, Rathnasinghe R, Schotsaert M, Miorin L, Dejosez M, Zwaka TP, Sit KY, Martinez-Sobrido L, Liu WC, White KM, Chapman ME, Lendy EK, Glynne RJ, Albrecht R, Ruppin E, Mesecar AD, Johnson JR, Benner C, Sun R, Schultz PG, Su AI, García-Sastre A, Chatterjee AK, Yuen KY, Chanda SK. Discovery of SARS-CoV-2 antiviral drugs through large-scale compound repurposing. *Nature.* 2020;586(7827):113-119.
256. Roat MI, Romanowski E, Araullo-Cruz T, Gordon YJ. The antiviral effects of rose bengal and fluorescein. *Arch Ophthalmol.* 1987;105(10):1415-7.
257. Robins MJ, Nowak I, Rajwanshi VK, et al. Synthesis and antiviral evaluation of 6-(alkyl-heteroaryl)furo[2,3-d]pyrimidin-2(3H)-one nucleosides and analogues with ethynyl, ethenyl, and ethyl spacers at C6 of the furopyrimidine core. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2007;50(16):3897-3905.
258. Rocha-Pereira J, Jochmans D, Dallmeier K, Leyssen P, Nascimento MSJ, Neyts J. Favipiravir (T-705) inhibits in vitro norovirus replication. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;424(4):777–80.
259. Rodgers BJ, Elsharif NA, Vashisht N, Mingus MM, Mulvahill MA, Stengel G, Kuchta RD, Purse BW. Functionalized tricyclic cytosine analogues provide nucleoside fluorophores with improved photophysical properties and a range of solvent sensitivities. *Chemistry.* 2014;20(7):2010-5.
260. Rojas-Luna L, Posadas-Modragón A, Avila-Trejo AM, Alcántara-Farfán V, Rodríguez-Páez LI, Santiago-Cruz JA, Pastor-Alonso MO, Aguilar-Faisal JL.

- Inhibition of chikungunya virus replication by N- ω -Chloroacetyl-L-Ornithine in C6/36, Vero cells and human fibroblast BJ. *Antivir Ther.* 2023;28(1):13596535231155263.
261. Romanova LIu, Gmyl AP, Dzhivanian TI, Bakmutov DV, Lukashev AN, Gmyl LV, Rumyantsev AA, Burenkova LA, Lashkevich VA, Karganova GG. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology.* 2007;362(1):75-84.
 262. Rosenfeld AB, Racaniello VR. Picornaviridae: The Viruses and Their Replication in *Fields Virology: Emerging Viruses*, 7th Ed., Eds. Howley PM, Knipe DM, Whelan S, Wolters Kluwer, 2020:30-85.
 263. Rottmann M, McNamara C, Yeung BK, Lee MC, Zou B, Russell B, Seitz P, Plouffe DM, Dharia NV, Tan J, Cohen SB, Spencer KR, González-Páez GE, Lakshminarayana SB, Goh A, Suwanarusk R, Jegla T, Schmitt EK, Beck HP, Brun R, Nosten F, Renia L, Dartois V, Keller TH, Fidock DA, Winzeler EA, Diagana TT. Spiroindolones, a potent compound class for the treatment of malaria. *Science.* 2010;329(5996):1175-80.
 264. Rubekina AA, Kamzeeva PN, Alferova VA, Shustova EY, Kolpakova ES, Yakovchuk EV, Karpova EV, Borodulina MO, Belyaev ES, Khrulev AA, Korshun VA, Shirshin EA, Kozlovskaya LI, Aralov AV. Hydrophobic Rose Bengal Derivatives Exhibit Submicromolar-to-Subnanomolar Activity against Enveloped Viruses. *Biomolecules.* 2022;12(11):1609.
 265. Rumlová M, Ruml T. In vitro methods for testing antiviral drugs. *Biotechnol Adv.* 2018;36(3):557-576.
 266. Ruzek D, Avšič Županc T, Borde J, Chrdle A, Eyer L, Karganova G, Kholodilov I, Knap N, Kozlovskaya L, Matveev A, Miller AD, Osolodkin DI, Överby AK, Tikunova N, Tkachev S, Zajkowska J. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Res.* 2019;164:23-51.
 267. Ryazantsev DY, Myshkin MY, Alferova VA, Tsvetkov VB, Shustova EY, Kamzeeva PN, Kovalets PV, Zaitseva ER, Baleeva NS, Zatsepin TS, Shenkarev

- ZO, Baranov MS, Kozlovskaya LI, Aralov AV. Probing GFP Chromophore Analogs as Anti-HIV Agents Targeting LTR-III G-Quadruplex. *Biomolecules*. 2021;11(10):1409.
268. Sadremomtaz A, Al-Dahmani ZM, Ruiz-Moreno AJ, Monti A, Wang C, Azad T, Bell JC, Doti N, Velasco-Velázquez MA, de Jong D, de Jonge J, Smit J, Dömling A, van Goor H, Groves MR. Synthetic Peptides That Antagonize the Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE-2) Interaction with SARS-CoV-2 Receptor Binding Spike Protein. *J Med Chem*. 2022;65(4):2836-2847.
269. Sams-Dodd F. Is poor research the cause of the declining productivity of the pharmaceutical industry? An industry in need of a paradigm shift. *Drug Discov Today*. 2013;18(5-6):211-7.
270. Sapozhnikova KA, Slesarchuk NA, Orlov AA, Khvatov EV, Radchenko EV, Chistov AA, Ustinov AV, Palyulin VA, Kozlovskaya LI, Osolodkin DI, Korshun VA, Brylev VA. Ramified derivatives of 5-(perylene-3-ylethynyl)uracil-1-acetic acid and their antiviral properties. *RSC Advances*. 2019;9:26014-26023.
271. Saudi M, Zmurko J, Kaptein S, Rozenski J, Neyts J, Van Aerschot A. In search of Flavivirus inhibitors part 2: tritylated, diphenylmethylated and other alkylated nucleoside analogues. *Eur J Med Chem*. 2014;76:98-109.
272. Scannell JW, Bosley J. When Quality Beats Quantity: Decision Theory, Drug Discovery, and the Reproducibility Crisis. *PLoS One*. 2016;11(2):e0147215.
273. Scarsi KK, Havens JP, Podany AT, Avedissian SN, Fletcher CV. HIV-1 Integrase Inhibitors: A Comparative Review of Efficacy and Safety. *Drugs*. 2020;80(16):1649-1676.
274. Schang LM. Biophysical approaches to entry inhibitor antivirals with a broad spectrum of action. *Future Virol*. 2014;9(3):283-299.
275. Seashore-Ludlow B, Rees MG, Cheah JH, Cokol M, Price EV, Coletti ME, Jones V, Bodycombe NE, Soule CK, Gould J, Alexander B, Li A, Montgomery P, Wawer MJ, Kuru N, Kotz JD, Hon CS, Munoz B, Liefeld T, Dančík V, Bittker JA, Palmer M, Bradner JE, Shamji AF, Clemons PA, Schreiber SL. Harnessing

- Connectivity in a Large-Scale Small-Molecule Sensitivity Dataset. *Cancer Discov.* 2015;5(11):1210-23.
276. Sedenkova KN, Dueva EV, Averina EB, Grishin YK, Osolodkin DI, Kozlovskaya LI, Palyulin VA, Savelyev EN, Orlinson BS, Novakov IA, Butov GM, Kuznetsova TS, Karganova GG, Zefirov NS. Synthesis and assessment of 4-aminotetrahydroquinazoline derivatives as tick-borne encephalitis virus reproduction inhibitors. *Org Biomol Chem* 2015, 13(11):3406-3415.
 277. Shannon A, Selisko B, Le NT, Huchting J, Touret F, Piorkowski G, Fattorini V, Ferron F, Decroly E, Meier C, Coutard B, Peersen O, Canard B. Rapid incorporation of Favipiravir by the fast and permissive viral RNA polymerase complex results in SARS-CoV-2 lethal mutagenesis. *Nat Commun.* 2020;11(1):4682.
 278. Shatalov DO, Kedik SA, Ivanov IS, Aydakova AV, Akhmedova DA, Minenkov DS, Beliakov SV, Herbst A, Greiner L, Kozlovskaya LI, Volok VP. Development of a Promising Method for Producing Oligomeric Mixture of Branched Alkylene Guanidines to Improve Substance Quality and Evaluate Their Antiviral Activity against SARS-CoV-2. *Molecules.* 2021;26(11):3472.
 279. Sheahan TP, Sims AC, Zhou S, Graham RL, Pruijssers AJ, Agostini ML, Leist SR, Schäfer A, Dinno KH 3rd, Stevens LJ, Chappell JD, Lu X, Hughes TM, George AS, Hill CS, Montgomery SA, Brown AJ, Bluemling GR, Natchus MG, Saindane M, Kolykhalov AA, Painter G, Harcourt J, Tamin A, Thornburg NJ, Swanstrom R, Denison MR, Baric RS. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. *Sci Transl Med.* 2020;12(541):eabb5883.
 280. Shtro AA, Garshina AV, Alferova VA, Kamzeeva PN, Volok VP, Kolpakova ES, Nikitin TD, Chistov AA, Belyaev ES, Korshun VA, Kozlovskaya LI, Aralov AV. Cationic Perylene Antivirals with Aqueous Solubility for Studies In Vivo. *Pharmaceuticals (Basel).* 2022;15(10):1178.
 281. Sidorova MV, Bibilashvili RS, Avdeev DV, Kozhokar US, Palkeeva ME, Ovchinnikov MV, Molokoedov AS, Shirokov DA, Semyonova AV, Uvarova VI,

- Kulyaev PO, Khvatov EV, Ignatova AA, Feofanov AV, Osolodkin DI, Porozov YB, Kozlovskaya LI, Ishmukhametov AA, Parfyonova YV, Egorov AM. Properties and Activity of Peptide Derivatives of ACE2 Cellular Receptor and Their Interaction with SARS-CoV-2 S Protein Receptor-Binding Domain. *Dokl Biochem Biophys.* 2022;29:1–5
282. Sidwell RW, Huffman JH, Call EW, Alaghamandan H, Cook PD, Robins RK. Activity of selenazofurin against influenza A and B viruses in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;28(3):375-7.
283. Skerlj RT, Bridger GJ, Kaller A, McEachern EJ, Crawford JB, Zhou Y, Atsma B, Langille J, Nan S, Veale D, Wilson T, Harwig C, Hatse S, Princen K, De Clercq E, Schols D. Discovery of novel small molecule orally bioavailable C-X-C chemokine receptor 4 antagonists that are potent inhibitors of T-tropic (X4) HIV-1 replication. *J Med Chem.* 2010;53(8):3376-88.
284. Skidmore AM, Bradfute SB. The life cycle of the alphaviruses: From an antiviral perspective. *Antiviral Res.* 2023;209:105476.
285. Skorobogatyi MV, Pchelintseva AA, Petrunina AL, Stepanova IA, Andronova VL, Galegov GA, Malakhov AD, Korshun VA. 5-Alkynyl-2'-deoxyuridines, containing bulky aryl groups: evaluation of structure–anti-HSV-1 activity relationship. *Tetrahedron* 2006(b);62(6):1279-1287.
286. Skorobogatyi MV, Ustinov AV, Stepanova IA, Pchelintseva AA, Petrunina AL, Andronova VL, Galegov GA, Malakhov AD, Korshun VA. 5-Arylethynyl-2'-deoxyuridines, compounds active against HSV-1. *Org Biomol Chem.* 2006(a);4(6):1091-6.
287. Slesarchuk NA, Khvatov EV, Chistov AA, Proskurin GV, Nikitin TD, Lazarevich AI, Ulanovskaya AA, Ulashchik EA, Orlov AA, Jegorov AV, Ustinov AV, Tyurin AP, Shmanai VV, Ishmukhametov AA, Korshun VA, Osolodkin DI, Kozlovskaya LI, Aralov AV. Simplistic perylene-related compounds as inhibitors of tick-borne encephalitis virus reproduction. *Bioorg Med Chem Lett.* 2020;30(10):127100
288. Sluis-Cremer N, Tachedjian G. Mechanisms of inhibition of HIV replication by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Virus Res.* 2008;134(1-2):147-56.

289. Smee DF, Evans WJ, Nicolaou KC, Tarbet EB, Day CW. Susceptibilities of enterovirus D68, enterovirus 71, and rhinovirus 87 strains to various antiviral compounds. *Antiviral Res.* 2016;131:61-5.
290. Sofia MJ, Chang W, Furman PA, Mosley RT, Ross BS. Nucleoside, nucleotide, and non-nucleoside inhibitors of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA-polymerase. *J Med Chem.* 2012;55(6):2481-531. Erratum in: *J Med Chem.* 2017;60(7):3219.
291. Spiegel J, Adhikari S, Balasubramanian S. The Structure and Function of DNA G-Quadruplexes. *Trends Chem.* 2020;2(2):123-136.
292. St Onge R, Schlecht U, Scharfe C, Evangelista M. Forward chemical genetics in yeast for discovery of chemical probes targeting metabolism. *Molecules.* 2012;17(11):13098-115.
293. St Vincent MR, Colpitts CC, Ustinov AV, Muqadas M, Joyce MA, Barsby NL, Epand RF, Epand RM, Khramyshev SA, Valueva OA, Korshun VA, Tyrrell DL, Schang LM. Rigid amphipathic fusion inhibitors, small molecule antiviral compounds against enveloped viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(40):17339-44.
294. Steinbrenner H, Al-Quraishy S, Dkhil MA, Wunderlich F, Sies H. Dietary selenium in adjuvant therapy of viral and bacterial infections. *Adv Nutr.* 2015;15;6(1):73-82.
295. Stephens ML, Andersen M, Becker RA, Betts K, Boekelheide K, Carney E, et al. Evidence-based toxicology for the 21st century: opportunities and challenges. *ALTEX* 2013;30(1):74–103.
296. Strizki JM, Tremblay C, Xu S, Wojcik L, Wagner N, Gonsiorek W, Hipkin RW, Chou CC, Pugliese-Sivo C, Xiao Y, Tagat JR, Cox K, Priestley T, Sorota S, Huang W, Hirsch M, Reyes GR, Baroudy BM. Discovery and characterization of vicriviroc (SCH 417690), a CCR5 antagonist with potent activity against human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(12):4911-9.

297. Stumpp MT, Dawson KM, Binz HK. Beyond Antibodies: The DARPin® Drug Platform. *BioDrugs*. 2020;34(4):423-433.
298. Stuyver LJ, Whitaker T, McBrayer TR, Hernandez-Santiago BI, Lostia S, Tharnish PM, Ramesh M, Chu CK, Jordan R, Shi J, Rachakonda S, Watanabe KA, Otto MJ, Schinazi RF. Ribonucleoside analogue that blocks replication of bovine viral diarrhea and hepatitis C viruses in culture. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(1):244-54.
299. Svetlova J, Knizhnik E, Manuvera V, Severov V, Shirokov D, Grafiskaia E, Bobrovsky P, Matyugina E, Khandazhinskaya A, Kozlovskaya L, Miropolskaya N, Aralov A, Khodarovich Y, Tsvetkov V, Kochetkov S, Lazarev V, Varizhuk A. Nucleoside Analogs and Perylene Derivatives Modulate Phase Separation of SARS-CoV-2 N Protein and Genomic RNA In Vitro. *Int J Mol Sci*. 2022;23(23):15281.
300. Swinney DC, Anthony J. How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(7):507-19.
301. Swinney DC, Lee JA. Recent advances in phenotypic drug discovery. *F1000Res*. 2020;9:F1000 Faculty Rev-944.
302. Taba P, Schmutzhard E, Forsberg P, Lutsar I, Ljøstad U, Mygland Å, Levchenko I, Strle F, Steiner I. EAN consensus review on prevention, diagnosis and management of tick-borne encephalitis. *Eur J Neurol*. 2017;24(10):1214-e61.
303. Tagat JR, McCombie SW, Nazareno D, Labroli MA, Xiao Y, Steensma RW, Strizki JM, Baroudy BM, Cox K, Lachowicz J, Varty G, Watkins R. Piperazine-based CCR5 antagonists as HIV-1 inhibitors. IV. Discovery of 1-[(4,6-dimethyl-5-pyrimidinyl)carbonyl]-4-[4-[2-methoxy-1(R)-4-(trifluoromethyl)phenyl]ethyl-3(S)-methyl-1-piperazinyl]-4-methylpiperidine (Sch-417690/Sch-D), a potent, highly selective, and orally bioavailable CCR5 antagonist. *J Med Chem*. 2004;47(10):2405-8.
304. Taguchi F, Imatani Y, Nagaki D, Nakagawa A, Omura S. Selective antiviral activity of the antibiotic 2'-amino-2'-deoxyribofuranosyl adenine. *J Antibiot (Tokyo)*. 1980;34(3):313-6.

305. Takenaka T. Classical vs reverse pharmacology in drug discovery. *BJU Int.* 2001;88 Suppl 2:7-10; discussion 49-50.
306. Tănase CI, Drăghici C, Cojocaru A, Galochkina AV, Orshanskaya JR, ZarubaeV VV, Shova S, Enache C, Maganu M. New carbocyclic N(6)-substituted adenine and pyrimidine nucleoside analogues with a bicyclo[2.2.1]heptane fragment as sugar moiety; synthesis, antiviral, anticancer activity and X-ray crystallography. *Bioorg Med Chem.* 2015;23(19):6346-54.
307. Taniguchi Y, Fukabori K, Kikukawa Y, Koga Y, Sasaki S. 2,6-diaminopurine nucleoside derivative of 9-ethyloxy-2-oxo-1,3-diazaphenoxazine (2-amino-Adap) for recognition of 8-oxo-dG in DNA. *Bioorg Med Chem.* 2014;22(5):1634-41.
308. Tararov VI, Tijsma A, Kolyachkina SV, Oslovsky VE, Neyts J, Drenichev MS, Leyssen P, Mikhailov SN. Chemical modification of the plant isoprenoid cytokinin N(6)-isopentenyladenosine yields a selective inhibitor of human enterovirus 71 replication. *Eur J Med Chem.* 2015;90:406-13.
309. Tararov VI, Tijsma A, Kolyachkina SV, Oslovsky VE, Neyts J, Drenichev MS, Leyssen P, Mikhailov SN. Chemical modification of the plant isoprenoid cytokinin N(6)-isopentenyladenosine yields a selective inhibitor of human enterovirus 71 replication. *Eur J Med Chem.* 2015;90:406-13.
310. Tegos GP, Hamblin MR. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(1):196-203.
311. Titus SA, Southall N, Marugan J, Austin CP, Zheng W. High-Throughput Multiplexed Quantitation of Protein Aggregation and Cytotoxicity in a Huntington's Disease Model. *Curr Chem Genomics.* 2012;6:79-86.
312. Torrence PF, Kinjo J, Lesiak K, Balzarini J, De Clercq E. AIDS dementia: synthesis and properties of a derivative of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) that may become 'locked' in the central nervous system. *FEBS Lett.* 1988;234(1):135-40.

313. Tosh DK, Paoletta S, Phan K, Gao ZG, Jacobson KA. Truncated Nucleosides as A(3) Adenosine Receptor Ligands: Combined 2-Arylethynyl and Bicyclohexane Substitutions. *ACS Med Chem Lett.* 2012;3(7):596-601.
314. Tsvetkov V, Varizhuk A, Kozlovskaya L, Shtro A, Lebedeva O, Komissarov A, Vedekhina T, Manuvera V, Zubkova O, Ereemeev A, Shustova E, Pozmogova G, Lioznov D, Ismukhametov A, Lazarev V, Lagarkova M. EGCG as an anti-SARS-CoV-2 agent: Preventive versus therapeutic potential against original and mutant virus. *Biochimie.* 2021;191:27-32.
315. Tsvetkov VB, Zatsepin TS, Belyaev ES, Kostyukevich YI, Shpakovski GV, Podgorsky VV, Pozmogova GE, Varizhuk AM, Aralov AV. i-Clamp phenoxazine for the fine tuning of DNA i-motif stability. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(6):2751-2764.
316. Tuchynskaya KK, Fomina AD, Nikitin NA, Illarionova VV, Volok VP, Kozlovskaya LI, Rogova AA, Vasilenko DA, Averina EB, Osolodkin DI, Karganova GG. Effect of immature tick-borne encephalitis virus particles on antiviral activity of 5-aminoisoxazole-3-carboxylic acid adamantylmethyl esters. *J Gen Virol.* 2021;102(9).
317. Vakulenko Y, Deviatkin A, Lukashev A. Using Statistical Phylogenetics for Investigation of Enterovirus 71 Genotype A Reintroduction into Circulation. *Viruses.* 2019;11(10):895.
318. van den Elsen K, Chew BLA, Ho JS, Luo D. Flavivirus nonstructural proteins and replication complexes as antiviral drug targets. *Curr Opin Virol.* 2023;59:101305.
319. van der Linden L, Wolthers KC, van Kuppeveld FJ. Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses.* 2015;7(8):4529-62.
320. van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, Smit JM. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog.* 2008;4(12):e1000244.
321. Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res.* 2003;110(5-6):255-8.

322. Varizhuk AM, Zatsepin TS, Golovin AV, Belyaev ES, Kostyukevich YI, Dedkov VG, Shipulin GA, Shpakovski GV, Aralov AV. Synthesis of oligonucleotides containing novel G-clamp analogue with C8-tethered group in phenoxazine ring: Implication to qPCR detection of the low-copy Kemerovo virus dsRNA. *Bioorg Med Chem*. 2017;25(14):3597-3605.
323. Vasilenko DA, Dueva EV, Kozlovskaya LI, Zefirov NA, Grishin YK, Butov GM, Palyulin VA, Kuznetsova TS, Karganova GG, Zefirova ON, Osolodkin DI, Averina EB. Tick-borne flavivirus reproduction inhibitors based on isoxazole core linked with adamantane. *Bioorg Chem*. 2019 16;87:629-637.
324. Vernekar SK, Qiu L, Zhang J, Kankanala J, Li H, Geraghty RJ, Wang Z. 5'-Silylated 3'-1,2,3-triazolyl Thymidine Analogues as Inhibitors of West Nile Virus and Dengue Virus. *J Med Chem*. 2015;58(9):4016-28.
325. Vigant F, Hollmann A, Lee J, Santos NC, Jung ME, Lee B. The rigid amphipathic fusion inhibitor dUY11 acts through photosensitization of viruses. *J Virol*. 2014;88(3):1849-53.
326. Vigant F, Jung M, Lee B. Positive reinforcement for viruses. *Chem Biol*. 2010;17(10):1049-51.
327. Vigant F, Lee J, Hollmann A, Tanner LB, Akyol Ataman Z, Yun T, Shui G, Aguilar HC, Zhang D, Meriwether D, Roman-Sosa G, Robinson LR, Juelich TL, Buczkowski H, Chou S, Castanho MA, Wolf MC, Smith JK, Banyard A, Kielian M, Reddy S, Wenk MR, Selke M, Santos NC, Freiberg AN, Jung ME, Lee B. A mechanistic paradigm for broad-spectrum antivirals that target virus-cell fusion. *PLoS Pathog*. 2013;9(4):e1003297.
328. Vincent F, Loria P, Pregel M, Stanton R, Kitching L, Nocka K, Doyonnas R, Stepan C, Gilbert A, Schroeter T, et al. Developing predictive assays: the phenotypic screening "rule of 3. *Sci Transl Med*. 2015;7:293ps15.
329. Vincent F, Loria PM, Weston AD, Stepan CM, Doyonnas R, Wang YM, Rockwell KL, Peakman MC. Hit Triage and Validation in Phenotypic Screening: Considerations and Strategies. *Cell Chem Biol*. 2020;27(11):1332-1346.

330. ViralZone, интернет-ресурс SIB Swiss Institute of Bioinformatics – URL: <https://viralzone.expasy.org/> (дата обращения 18.02.2023)
331. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(3):155-170.
332. Vogt A, Lazo JS. Chemical complementation: a definitive phenotypic strategy for identifying small molecule inhibitors of elusive cellular targets. *Pharmacol Ther.* 2005;107(2):212-21.
333. Wagner BK. The resurgence of phenotypic screening in drug discovery and development. *Expert Opin Drug Discov.* 2016;11(2):121-5.
334. Wainwright P, Maddaford A, Zhang X, Billington H, Leese D, Glen R, Pryde DC, Middleton DS, Stephenson PT, Sutton S. Synthesis and biological evaluation of acyclic phosphonic acid nucleoside derivatives. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2013;32(9):477-92.
335. Wang Q, Zhang Y, Wu L, Niu S, Song C, Zhang Z, Lu G, Qiao C, Hu Y, Yuen KY, Wang Q, Zhou H, Yan J, Qi J. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. *Cell.* 2020;181(4):894-904.e9.
336. Wang S, Wang W, Hao C, Yunjia Y, Qin L, He M, Mao W. Antiviral activity against enterovirus 71 of sulfated rhamnan isolated from the green alga *Monostroma latissimum*. *Carbohydr Polym.* 2018;200:43-53.
337. Wang YX, Yang L, Wang HQ, Zhao XQ, Liu T, Li YH, Zeng QX, Li YH, Song DQ. Synthesis and Evolution of Berberine Derivatives as a New Class of Antiviral Agents against Enterovirus 71 through the MEK/ERK Pathway and Autophagy. *Molecules.* 2018;23(8):2084.
338. Wang Z, Tu A, Tang D, Shan Y. Effectively preparing soluble ovomucin with high antiviral activity from egg white. *Int J Biol Macromol.* 2018;118(Pt A):504-510.
339. Weber IT, Wang YF, Harrison RW. HIV Protease: Historical Perspective and Current Research. *Viruses.* 2021 May 6;13(5):839.

340. Weglarz-Tomczak E, Tomczak JM, Talma M, Burda-Grabowska M, Giurg M, Brul S. Identification of ebselen and its analogues as potent covalent inhibitors of papain-like protease from SARS-CoV-2. *Sci Rep.* 2021;11(1):3640.
341. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugi J, Chen G, Jones S, Ren H, Moon YC, Corson D, Turpoff AA, Campbell JA, Conn MM, Khan A, Almstead NG, Hedrick J, Mollin A, Risher N, Weetall M, Yeh S, Branstrom AA, Colacino JM, Babiak J, Ju WD, Hirawat S, Northcutt VJ, Miller LL, Spatrack P, He F, Kawana M, Feng H, Jacobson A, Peltz SW, Sweeney HL. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature.* 2007;447(7140):87-91.
342. WHO, 2004. World Health Organization (WHO). Manual for the virological investigation of polio. 4th ed. Geneva, Switzerland, 2004 – URL: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68762/WHO_IVB_04.10.pdf (дата обращения 20.07.2023)
343. WHO, 2020. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19, 11 March 2020 – URL: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (дата обращения 21.02.2023)
344. Williams M. Systems and integrative biology as alternative guises for pharmacology: prime time for an iPharm concept? *Biochem Pharmacol.* 2005;70(12):1707-16.
345. Wójtowicz H, Chojnacka M, Młochowski J, Palus J, Syper L, Hudecova D, Uher M, Piasecki E, Rybka M. Functionalized alkyl and aryl diselenides as antimicrobial and antiviral agents: synthesis and properties. *Farmaco.* 2003;58(12):1235-42.
346. Wójtowicz H, Kloc K, Maliszewska I, Młochowski J, Pietka M, Piasecki E. Azaanalogues of ebselen as antimicrobial and antiviral agents: synthesis and properties. *Farmaco.* 2004 Nov;59(11):863-8.

347. Wray SK, Smith RH, Gilbert BE, Knight V. Effects of selenazofurin and ribavirin and their 5'-triphosphates on replicative functions of influenza A and B viruses. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;29(1):67-72.
348. Wu R, Smidansky ED, Oh HS, Takhampunya R, Padmanabhan R, Cameron CE, Peterson BR. Synthesis of a 6-methyl-7-deaza analogue of adenosine that potently inhibits replication of polio and dengue viruses. *J Med Chem.* 2010;53(22):7958-66.
349. Xia M, Huang R, Witt KL, Southall N, Fostel J, Cho MH, Jadhav A, Smith CS, Inglese J, Portier CJ, Tice RR, Austin CP. Compound cytotoxicity profiling using quantitative high-throughput screening. *Environ Health Perspect.* 2008;116(3):284-91.
350. Xiao T, Frey G, Fu Q, Lavine CL, Scott DA, Seaman MS, Chou JJ, Chen B. HIV-1 fusion inhibitors targeting the membrane-proximal external region of Env spikes. *Nat Chem Biol.* 2020;16(5):529-537.
351. Xu HT, Colby-Germinario SP, Hassounah SA, Fogarty C, Osman N, Palanisamy N, Han Y, Oliveira M, Quan Y, Wainberg MA. Evaluation of Sofosbuvir (β -D-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine) as an inhibitor of Dengue virus replication. *Sci Rep.* 2017;7(1):6345.
352. Yang J, Petitjean SJL, Koehler M, Zhang Q, Dumitru AC, Chen W, Derclaye S, Vincent SP, Soumillion P, Alsteens D. Molecular interaction and inhibition of SARS-CoV-2 binding to the ACE2 receptor. *Nat Commun.* 2020;11(1):4541. doi: 10.1038/s41467-020-18319-6. Erratum in: *Nat Commun.* 2021;12(1):2996.
353. Yang X, Kui L, Tang M, Li D, Wei K, Chen W, Miao J, Dong Y. High-Throughput Transcriptome Profiling in Drug and Biomarker Discovery. *Front Genet.* 2020;11:19.
354. Yao C, Xi C, Hu K, Gao W, Cai X, Qin J, Lv S, Du C, Wei Y. Inhibition of enterovirus 71 replication and viral 3C protease by quercetin. *Virology.* 2018;15(1):116.
355. Yao Y, Huo T, Lin YL, Nie S, Wu F, Hua Y, Wu J, Kneubehl AR, Vogt MB, Rico-Hesse R, Song Y. Discovery, X-ray Crystallography and Antiviral Activity

- of Allosteric Inhibitors of Flavivirus NS2B-NS3 Protease. *J Am Chem Soc.* 2019;141(17):6832-6836.
356. Yu F, Lu L, Liu Q, Yu X, Wang L, He E, Zou P, Du L, Sanders RW, Liu S, Jiang S. ADS-J1 inhibits HIV-1 infection and membrane fusion by targeting the highly conserved pocket in the gp41 NHR-trimer. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1838(5):1296-305.
 357. Yuan H, Myers S, Wang J, Zhou D, Woo JA, Kallakury B, Ju A, Bazylewicz M, Carter YM, Albanese C, Grant N, Shad A, Dritschilo A, Liu X, Schlegel R. Use of reprogrammed cells to identify therapy for respiratory papillomatosis. *N Engl J Med.* 2012;367(13):1220-7.
 358. Zakharova MY, Kuznetsova AA, Uvarova VI, Fomina AD, Kozlovskaya LI, Kaliberda EN, Kurbatskaia IN, Smirnov IV, Bulygin AA, Knorre VD, Fedorova OS, Varnek A, Osolodkin DI, Ishmukhametov AA, Egorov AM, Gabibov AG, Kuznetsov NA. Pre-Steady-State Kinetics of the SARS-CoV-2 Main Protease as a Powerful Tool for Antiviral Drug Discovery. *Front Pharmacol.* 2021 Dec 6;12:773198.
 359. Zaliani A, Vangeel L, Reinshagen J, Iaconis D, Kuzikov M, Keminer O, Wolf M, Ellinger B, Esposito F, Corona A, Tramontano E, Manelfi C, Herzog K, Jochmans D, De Jonghe S, Chiu W, Francken T, Schepers J, Collard C, Abbasi K, Claussen C, Summa V, Beccari AR, Neyts J, Gribbon P, Leyssen P. Cytopathic SARS-CoV-2 screening on VERO-E6 cells in a large-scale repurposing effort. *Sci Data.* 2022;9(1):405.
 360. Zenchenko AA, Oslovsky VE, Varizhuk IV, Karpova EV, Osolodkin DI, Kozlovskaya LI, Ishmukhametov AA, Drenichev MS. Cytotoxicity reduction by O-nicotinylation of antiviral 6-benzylaminopurine ribonucleosides. *Toxicol In Vitro.* 2022;82:105355.
 361. Zhan P, Liu X, Fang Z, Pannecouque C, De Clercq E. 1,2,3-Selenadiazole thioacetanilides: synthesis and anti-HIV activity evaluation. *Bioorg Med Chem.* 2009;17(17):6374-9.

362. Zhang C, Zhu R, Cao Q, Yang X, Huang Z, An J. Discoveries and developments of CXCR4-targeted HIV-1 entry inhibitors. *Exp Biol Med* (Maywood). 2020;245(5):477-485.
363. Zhang F, Chase-Topping M, Guo CG, Woolhouse MEJ. Predictors of human-infective RNA virus discovery in the United States, China, and Africa, an ecological study. *Elife*. 2022;11:e72123.
364. Zhang G, Zhou F, Gu B, Ding C, Feng D, Xie F, Wang J, Zhang C, Cao Q, Deng Y, Hu W, Yao K. In vitro and in vivo evaluation of ribavirin and pleconaril antiviral activity against enterovirus 71 infection. *Arch Virol*. 2012;157(4):669-79.
365. Zhang HX, Du GH, Zhang JT. Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25:385–9.
366. Zhao J, Guo S, Yi D, Li Q, Ma L, Zhang Y, Wang J, Li X, Guo F, Lin R, Liang C, Liu Z, Cen S. A cell-based assay to discover inhibitors of SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase. *Antiviral Res*. 2021;190:105078.
367. Zhao Q, Ma L, Jiang S, Lu H, Liu S, He Y, Strick N, Neamati N, Debnath AK. Identification of N-phenyl-N'-(2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-4-yl)-oxalamides as a new class of HIV-1 entry inhibitors that prevent gp120 binding to CD4. *Virology*. 2005;339(2):213-25.
368. Zheng W, Thorne N, McKew JC. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. *Drug Discov Today*. 2013;18(21-22):1067-73
369. Zhernov YV, Kremb S, Helfer M, Schindler M, Harir M, Mueller C, Hertkorn N, Avvakumova NP, Konstantinov AI, Brack-Werner R, Schmitt-Kopplindg P, Perminova IV. Supramolecular combinations of humic polyanions as potent microbicides with polymodal anti-HIV-activities. *New J. Chem*. 2017;41:212–224.
370. Zhou T, Tan L, Cederquist GY, Fan Y, Hartley BJ, Mukherjee S, Tomishima M, Brennand KJ, Zhang Q, Schwartz RE, Evans T, Studer L, Chen S. High-Content Screening in hPSC-Neural Progenitors Identifies Drug Candidates that Inhibit

Zika Virus Infection in Fetal-like Organoids and Adult Brain. *Cell Stem Cell*. 2017;21(2):274-283.e5.

371. Zhou X, Wang H, Ji Q, Du M, Liang Y, Li H, Li F, Shang H, Zhu X, Wang W, Jiang L, Stepanov AV, Ma T, Gong N, Jia X, Gabibov AG, Lou Z, Lu Y, Guo Y, Zhang H, Yang X. Molecular deconvolution of the neutralizing antibodies induced by an inactivated SARS-CoV-2 virus vaccine. *Protein Cell*. 2021;12(10):818-823.
372. Zhu G, Wu C, Wang Q, Deng D, Lin B, Hu X, Qiu F, Li Z, Huang C, Yang Q, Zhang D. Antiviral activity of the HSP90 inhibitor VER-50589 against enterovirus 71. *Antiviral Res*. 2023;211:105553.
373. Zhu Y, Yu D, Yan H, Chong H, He Y. Design of Potent Membrane Fusion Inhibitors against SARS-CoV-2, an Emerging Coronavirus with High Fusogenic Activity. *J Virol*. 2020;94(14):e00635-20.