

На правах рукописи

КОЗЛОВСКАЯ
Любовь Игоревна

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

1.5.10. – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва

2023

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном научном учреждении «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Научный консультант:

Ишмухаметов Айдар Айратович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН.

Официальные оппоненты:

Борисевич Сергей Владимирович – доктор биологических наук, профессор, академик РАН, начальник Федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации.

Поройков Владимир Васильевич – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник, заведующий отделом биоинформатики и лабораторией структурно-функционального конструирования лекарств Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Подколзин Александр Тихонович – доктор медицинских наук, заместитель директора по эпидемиологии Федерального государственного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Защита состоится «__» _____ 2023 года в __ час. на заседании диссертационного совета 24.1.255.01 на базе Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по адресу: 108819, Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корпус 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) и на сайте <https://chumakovs.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Белякова Алла Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Разработка лекарств — это рискованный, дорогостоящий и трудоёмкий процесс, зависящий от междисциплинарных методов для создания безопасных и эффективных препаратов. Существуют два принципиально различных подхода к поиску лекарств: мишень-направленный (Target-Based Drug Discovery, TDD) и фенотип-направленный (Phenotype-Based Drug Discovery, PDD). При использовании мишень-направленного подхода исследователь сосредоточен на конкретных молекулярных мишенях, определяющих патогенез заболевания, тогда как при фенотипическом подходе рассматриваются условия развития комплекса признаков (фенотипа) заболевания и способы его предотвратить.

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 TDD имеет свои ограничения ввиду множественности 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 средств терапии сложных заболеваний с ограниченным пониманием механизма. Прогресс в области создания клеточных моделей и технологий детекции *in vitro* 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 в клеточной тест-системе. Новое понимание фенотипического подхода требует создания собственных методов и технологий, в том числе, разработки новых модельных систем и методик оценки изменения их фенотипических признаков. 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 патологического фенотипа.

PDD обладает более высоким потенциалом для трансляции результатов в модели *in vivo* и в клиническую практику, чем мишень-ориентированные подходы, ввиду 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. Большинство одобренных лекарств, открытых с помощью PDD, являются антиинфекционными (противовирусными, антибактериальными) или антипролиферативными препаратами. При поиске противовирусных препаратов во многих случаях фенотипический подход предпочтителен ввиду отсутствия знаний о конкретных мишенях и молекулярных особенностях развития патогенеза вирусной инфекции.

В современной классификации вирусов выделяют более одиннадцати тысяч видов, среди которых 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 лишь для пары десятков вирусных инфекций применяется специфическая терапия [Encyclopedia of Virology. 2021:121-30]. Это инфекции, вызванные вирусами иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатита В (ВГВ) и С (ВГС), гриппа А, простого герпеса и ветряной оспы, SARS-CoV-2 и некоторыми другими вирусами. Мутации и появление новых вариантов давно известных вирусов, а также вспышки вирусных инфекций, вызванных 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 патогенов человека. С другой стороны, информация об активности неравномерно распределена по химическим классам соединений. Как правило, наиболее изученными являются известные лекарственные препараты и их аналоги [Database (Oxford). 2019;2019:bay139]. Таким образом, требуется расширение знаний о спектрах активности известных соединений против различных вирусов, дизайн 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.

Наиболее прямым способом поиска новых противовирусных соединений является 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 препаратов. 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 концентрация 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 [Известия Академии наук. Серия химическая. 2019;(12):2381-95]. Методики, используемые в различных лабораториях, позволяют получить значения вышеописанных характеристик для активных соединений. Однако, часто значения, полученные разными лабораториями, сильно расходятся ввиду различий условий 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 такие стадии, как отбор активных соединений-хитов из исследуемой серии, 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 [Nat Rev Drug Discov. 2014;13(8):577-87; Expert Opin Drug Discov. 2016;11(2):121-5]. В последние два десятилетия активное развитие технологий позволило перевести многие вирусологические методы из разряда искусства в разряд рутинных экспериментов. На настоящий момент разработаны десятки методик определения противовирусной активности в клеточных или биохимических тестах [Biotechnol Adv. 2018;36(3):557-76]. 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 другие). Однако показатели активности 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.

Все вышеизложенное определило цель и задачи данного диссертационного исследования.

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 противовирусной 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.

Научная новизна

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

Впервые выявлены низкомолекулярные ингибиторы переносимых клещами ортофлавивирусов (ВКЭ, ПОВ, ВОГЛ) 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 (ЭВ) видов А, В и С сем. *Picornaviridae*).

Разработаны подходы к стандартизации методик фенотипического скрининга противовирусной активности *in vitro* в отношении литических РНК-содержащих вирусов на основании сравнительных исследований показателей активности (значений EC_{50}), полученных с помощью различных методик фенотипической оценки противовирусной активности в культурах клеток.

Теоретическая и 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 (ВКЭ, ПОВ и ВОГЛ сем. *Flaviviridae*; вируса 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 профилактических и/или лекарственных противовирусных препаратов. Разработанные методики позволяют выявлять соединения с противовирусной активностью, определять количественные показатели активности и цитотоксичности, проводить анализ соотношений структура–активность (SAR) для серии активных соединений 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* (ВКЭ, ПОВ, ВОГЛ), *Enterovirus* (виды ЭВ-А, ЭВ-В, ЭВ-С), *Betacoronavirus* (SARS-CoV-2), *Alphavirus* (ЧИКВ) и *Lentivirus* (ВИЧ-1).

Проведено сравнение результатов методик фенотипической оценки противовирусной активности с разными способами оценки ингибирования репродукции вируса и показано, что количественные показатели активности (значения EC_{50}), 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.

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

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 высокопроизводительного 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

Исследование носило многолетний и комплексный характер. В работе использованы вирусологические, молекулярно-биологические, иммунологические (серологические), иммуногистохимические методы, а также трансмиссионная электронная микроскопия для описания структуры вирионов и статистические методы.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработаны, апробированы и внедрены в лабораторное использование методики фенотипической оценки цитотоксичности и скрининга противовирусной активности соединений, 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 вещества 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.

Личный вклад автора

Автором проведен анализ научной литературы, осуществлено планирование этапов исследования и разработка протоколов экспериментов, а также лично или под его руководством выполнены лабораторные исследования. Автором лично проведена систематизация и статистическая обработка экспериментальных данных с последующей их визуализацией для подготовки к печати публикаций и написания диссертации. Вклад автора заключается в непосредственной разработке методик фенотипической оценки противовирусной активности и проведения их валидации, а также внедрение в лабораторную практику для поиска новых противовирусных лекарственных средств.

Оценка цитотоксичности и противовирусной активности соединений проводилась при участии к.х.н. Дуевой Е.В., к.х.н. Орлова А.А., научных сотрудников Хватова Е.В., Шустовой Е.Ю., Волока В.П., студентов Золотаревой (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.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяется большим объёмом проанализированных данных, использованием адекватных статистических методов и современного программного обеспечения для обработки результатов проведённых экспериментов.

Материалы диссертационного исследования были доложены, обсуждены и рекомендованы к защите на заседании Научной экспертной комиссии ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

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 НИИЕМ, Нижний Новгород, Россия, 11-12 сентября 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 ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия, 11-12 сентября 2019 г.

Внедрение результатов исследования

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

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 РФ №2733945 «Замещённые изоксазолы, композиции на их основе, обладающие противовирусной активностью, и способ их применения».

Апробированные при проведении исследований методические подходы внедрены в научную и педагогическую работу по обучению дисциплине Вирусология студентов по направлению подготовки Биоинженерия/Биоинформатика ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) и в аспирантуре по специальности 1.5.10. – «Вирусология» в ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.10. – «Вирусология». Результаты проведенного исследования соответствуют пункту 10: Разработка мер предупреждения, диагностики и лечения вирусных заболеваний, совершенствование лабораторной диагностики, терапии, и иммунопрофилактики вирусных инфекций, проблемы санитарной вирусологии – паспорта специальности 1.5.10. – «Вирусология».

Публикации

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 следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы (включает 373 ссылки). Работа включает 44 рисунка и 67 таблиц. Общий объем диссертации 294 страницы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. ФЕНОТИП-НАПРАВЛЕННЫЙ ПОДХОД К ПОИСКУ НОВЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

1.1. Фенотип-направленный подход к поиску новых лекарственных препаратов

Для разработки современных фенотипических тестов используются клеточные характеристики, позволяющие различить нормальный и патологический фенотип, которые используют в качестве целевых показателей при скрининге библиотеки соединений для выявления активных соединений-хитов, подавляющих проявление патологического фенотипа. Далее из первичных активных соединений-хитов могут быть отобраны соединения-лидеры со знанием мишени или без него, хотя идентификация молекулярной мишени может существенно облегчить изучение SAR и дальнейшую оптимизацию лидера. Оптимизированная лидерная молекула направляется в доклинические и клинические исследования. Фенотипические тесты обычно физиологически релевантны, поскольку используются интактные клетки и клеточная среда. Многие лекарства были открыты с использованием фенотипического подхода и одобрены регулирующими органами до того, как были определены их точные механизмы действия или белковые мишени. Даже сегодня регулирующие органы по всему миру одобряют новые препараты, не требуя точного механизма действия или молекулярной мишени, если препарат эффективен и безопасен для пациентов.

Тем не менее, не следует отдавать предпочтение только фенотипическим или мишень-направленным тестам, поскольку оба подхода дополняют друга. 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, что увеличивает вероятность успеха на более поздних стадиях разработки лекарств [Expert Opin Drug Discov. 2016;11(2):121-5].

1.2. Фенотипические тесты *in vitro* для 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 1) [J Med Chem. 2016;59(12):5622-49].

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 количества жизнеспособных клеток. Эта детекция легко осуществляется современными методами и легко масштабируется. Репродукцию литического вируса можно также детектировать по эффективности инфицирования клеток, оцениваемой как урожай вируса по количеству бляшкообразующих единиц (БОЕ), титру вируса в цитопатических дозах или другими доступными способами.

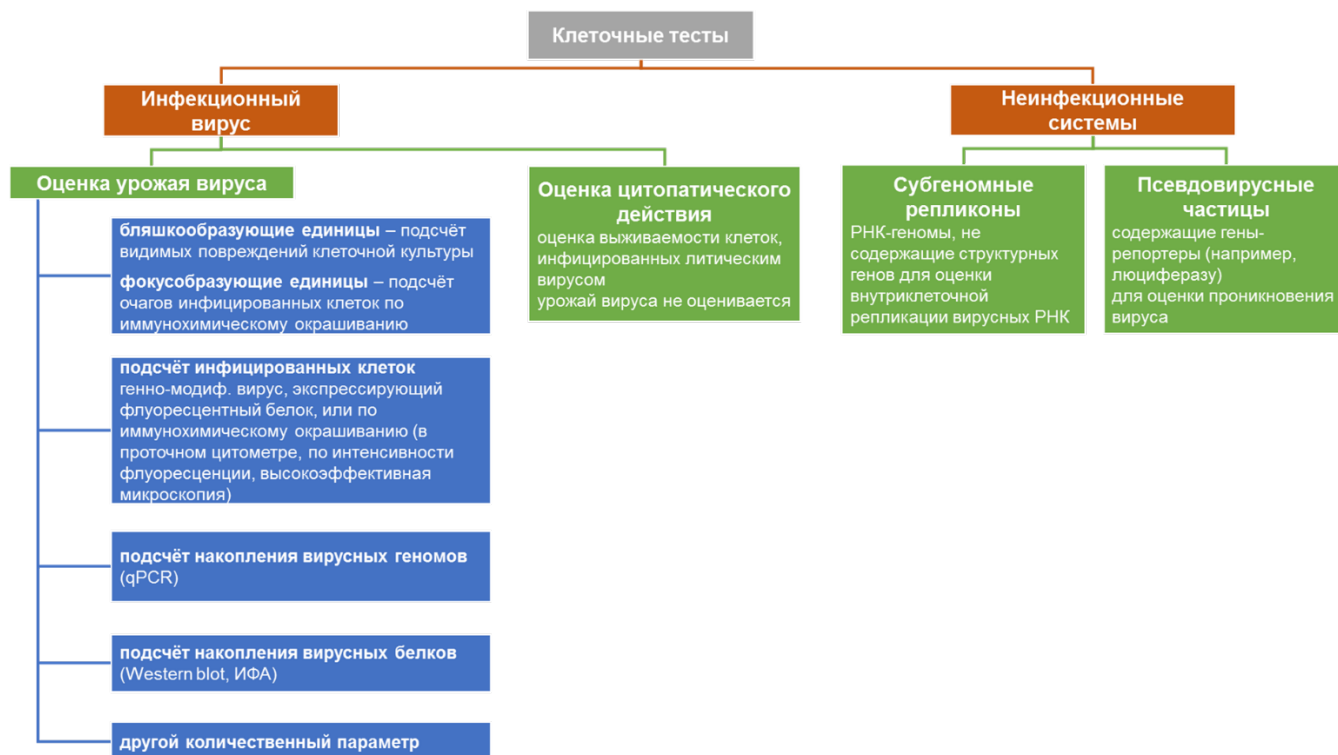


Рисунок 1 – Схематическая классификация наиболее часто используемых клеточных тестов для оценки противовирусной активности по ингибированию проникновения и репродукции вируса [адаптировано из J Med Chem. 2016;59(12):5622-49]

В случае неспособности вируса вызывать гибель клеток можно оценивать урожай вируса по различным параметрам: количество фокусобразующих единиц (ФОЕ) – очагов заражённых клеток, окрашенных иммунохимически; количеству заражённых клеток, окрашенных иммунохимически, напрямую методами проточной цитометрии или эффективной микроскопии или опосредованно по интенсивности флуоресценции; по концентрации вирусных белков и по количеству вирусных геномов 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 так же, как иммунохимически окрашенные, но без совершения дополнительных манипуляций по окрашиванию.

Независимо от способности 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 системой для экспрессии белка в случае доставки его в клетку; или вирусные репликоны, способные имитировать процесс репликации и/или 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 протекания вирусной инфекции в клетках целиком, с вовлечением всех клеточных белков и сигнальных путей, в то время как неинфекционные системы моделируют только часть стадий репликативного цикла вируса.

Фенотипические тесты могут быть использованы на разных стадиях поиска лекарственных препаратов: первичный фенотипический скрининг; исследование

механизма действия; выбор лидерного соединения или серии на основе анализа взаимосвязи структура-активность (SAR) и фенотипической оценки токсичности.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Культуры клеток

В работе использовали перевиваемые линии клеток различного происхождения: почки эмбриона свиньи СПЭВ; почки зелёной мартышки Vero (WHO Biologicals); рабдомиосаркомы человека RD (NIBSC); Т-лимфоциты, инфицированные вирусом Т-клеточного лейкоза приматов 1 типа, МТ-4 (NIH AIDS, ARP-120).

2.2. Характеристика используемых в работе вирусов

- сем. *Flaviviridae*: 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), ТВ08-Т2546 (GenBank ID KU052690); ПОВ шт. Пов24 (GenBank ID KU160627); ВОГЛ шт. Никитина (GenBank ID GU290187);
- сем. *Coronaviridae*: SARS-CoV-2 шт. ПИК35 (Pango lineage B.1.1, GISAID EPI_ISL_428852), шт. 4724d варианта Дельта (GISAID EPI_ISL_8799478) и шт. 7995o варианта Омикрон (Pango lineage BA.1, GISAID EPI_ISL_9613539)
- сем. *Togaviridae*: ЧИКВ шт. Nic (GenBank ID MN271691-2);
- сем. *Picornaviridae*: энтеровирусы вида А шт. 46973 (GenBank ID KJ645808) и шт. BrCr (GenBank ID U22521) энтеровируса А71 (ЭВ-А71), шт. 49360 вируса Коксаки А16 (CVA16) (GenBank ID MK704491); энтеровирусы вида В шт. 48461 эховируса 30 (E30) (GenBank ID MK704489) и шт. 57088 эховируса 13 (E13) (GenBank ID MK704490); энтеровирусы вида С вакцинный шт. Sabin1 полиовируса типа 1 (ПВ1) (GenBank ID AY184219) и шт. 48793 вируса Коксаки А21 (CVA21) (GenBank ID MK704492);
- сем. *Retroviridae*: ВИЧ-1 шт. NL4-3, полученный путём трансфекции клеток плазмидой pNL4-3 (ARP2006, NIBSC, Великобритания).

2.3. Соединения

Соединения и препараты для проведения исследований были любезно предоставлены сотрудниками ИБХ РАН, ИМБ РАН, МГУ им. М.В. Ломоносова, МИТХТ им. М.В. Ломоносова, МИРЭА РТУ, ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России и др., а также закуплены у коммерческих производителей.

2.4. Основные методы

Для количественного определения инфекционного вируса использовали методики титрования в культурах клеток по ЦПД с определением 50% тканевой токсической дозы (ТЦД₅₀), по бляшкообразованию под метилцеллюлозным покрытием с выражением титра в виде IgБОЕ на мл. Цитотоксическое действие соединений оценивали по их способности вызывать гибель клеток с детекцией методами световой микроскопии или по оценке доли жизнеспособных клеток в резазуриновом тесте. Противовирусную активность соединений оценивали по их способности ингибировать вирус-индуцированное ЦПД в культуре клеток с детекцией методом световой микроскопии

или по оценке доли жизнеспособных клеток в резазуриновом тесте; по ингибированию бляшкообразования или фокусообразования; по уменьшению урожая вируса, определенного титрованием. Значения CC_{50} и EC_{50} рассчитывали по формуле Кербера или методом аппроксимации нелинейной функцией с использованием OriginPro 8 (OriginLab Corp., США).

2.5. Статистическая обработка

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

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Разработка методик определения цитотоксичности соединений

3.1.1. Методика определения токсичности соединений для клеток по морфологическим показателям методом световой микроскопии

Простым для определения проявлением цитотоксичности соединения является гибель клеток и нарушение целостности монослоя, то есть ЦПД. Доступным способом детекции ЦПД является визуальная детекция методом световой микроскопии. Это требует знания нормальной морфологии клеток, не позволяет точно определить долю поражённых клеток, однако расчёт CC_{50} возможен с помощью формулы Кербера. С другой стороны, микроскопия позволяет отметить изменения морфологии клеток, не влияющие на их жизнеспособность, но являющиеся последствием действия соединения. Определение цитотоксичности необходимо для оценки перспективности дальнейшего изучения соединения при расчёте индекса селективности (SI). Поэтому для оценки цитотоксичности подбирали условия, аналогичные условиям оценки противовирусной активности: клеточные линии, сроки инкубации и т.п. Методику определения отрабатывали в культуре клеток СПЭВ на соединениях классов 1,4-дигидропиридинов и пиридопиадазинов (Таблица 1), которые затем тестировали против ортофлавириусов. Рассматривали острую (24 ч) и хроническую (7 дней) токсичность для описания свойств соединений в целом, но для расчёта SI использовали значение, полученное на 7 день. Большинство исследуемых соединений 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 (CC_{50} 20-50 мкМ), что позволило в дальнейшем проводить оценку активности, начиная с концентрации соединений 10 мкМ.

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

Соед.	Ar	R	R ¹	CC ₅₀ , мкМ		EC ₅₀ ± SEM, мкМ		
				24 ч	7 д	ВКЭ	ПОВ	ВОГЛ
1a	2-фурил	4-EtOC ₆ H ₄	4-nBuC ₆ H ₄ NH	64	14	2,5 ± 0,5	> 10	> 10
1b	2-фурил	4-H ₂ NSO ₂ C ₆ H ₄	4-EtC ₆ H ₄ NH	> 250	153	> 10	> 10	10 ± 7,8
1e	2-фурил	2-MeC ₆ H ₄	2-нафтил-NH	> 250	> 250	> 10	> 10	5,3 ± 0,1
1f	2-фурил	Ph	3,4-Me ₂ C ₆ H ₃	> 250	19	> 10	> 10	3,2 ± 0,8
1g	2-фурил	2,6-Me ₂ C ₆ H ₃	2-бензотиазолил-NH	> 250	7	> 10	> 10	7,1 ± 0,1
1h	2-фурил	2-бензотиазолил	2-бензотиазолил-NH	> 250	52	> 10	> 10	2,5 ± 0,9
1i	2-фурил	2-бензотиазолил	4-iPrC ₆ H ₄ NH	> 250	29	> 10	> 10	2,5 ± 0,1
1j	5-Me-2-фурил	2-MeOC ₆ H ₄	4-BrC ₆ H ₄ NH	248	34	> 10	> 10	3,7 ± 0,4
1l	2-тиенил	2-MeOC ₆ H ₄	4-MeC ₆ H ₄ NH	> 250	97	> 10	> 10	5,5 ± 0,9
1m	Ph	4-ClC ₆ H ₄	3-MeC ₆ H ₄ NH	> 250	41	2,0 ± 0,4	> 10	> 10
1n	Ph	4-ClC ₆ H ₄	4-PhOC ₆ H ₄ NH	> 250	38	2,8 ± 0,6	> 10	> 10
1p	2-FC ₆ H ₄	2-MeC ₆ H ₄	4-MeOC ₆ H ₄ NH	> 250	89	> 10	> 10	7,2 ± 0,5
1q	4-ОН-3-МеОС ₆ Н ₃	Ph	4-EtC ₆ H ₄ NH	114	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	—	109	39	0,07 ± 0,02	1,3 ± 0,1	> 10
2b	3-BnOC ₆ H ₄	2-EtOC ₆ H ₄	—	> 250	116	2,6 ± 0,4	2,2 ± 0,3	> 10
2d	4-BnOC ₆ H ₄	4-nBuC ₆ H ₄	—	> 250	35	1,9 ± 0,4	> 10	> 10
2e	4-BnO-3-MeOC ₆ H ₃	4-MeOC ₆ H ₄	—	> 250	53	0,09±0,01	> 10	> 10

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

Активность (EC₅₀, мкМ) 0,00N 0,0N 0,N 1-10 11-20 21-100 >100

3.1.2. Методика определения токсичности соединений по снижению доли жизнеспособных клеток в резазуриновом тесте

Визуальный учёт и расчёт CC₅₀ по формуле Кербера накладывают определённые рамки на проведение эксперимента. Определение количества жизнеспособных клеток с применением красителей позволяет сократить повторы внутри одного эксперимента и точнее рассчитывать CC₅₀, а также позволяет формализовать процесс учёта жизнеспособных клеток и делает его менее оператор-зависимым. Однако использование красителей накладывают дополнительные рамки на проведение эксперимента, например, проверка на совпадение спектров поглощения и испускания для флуоресцентных соединений и красителя; отслеживание растворимости соединений и т.п. Мы выбрали резазуриновый тест, позволяющий оценить долю живых клеток по восстановлению ими резазурина до флуоресцентного резорурфина (Рисунок 2). Для отработки методики и выбора оптимального времени инкубации клеток с раствором резазурина мы рассадили клетки Vero и RD с разной исходной плотностью, и инкубировали в отсутствие и в присутствии 2% ДМСО, который является стандартным растворителем для органических соединений. Затем заменили культуральную среду раствором резазурина, инкубировали клетки от 30 мин до 4 ч и проводили измерение флуоресценции. Флуоресценция клеток возрастает линейно с увеличением времени инкубации, и с 3 ч для клеток RD и с 3,5 ч для клеток Vero значения достоверно различимы даже для малых количеств клеток. При этом не наблюдается значимых различий между клетками, обработанными и не обработанными ДМСО.

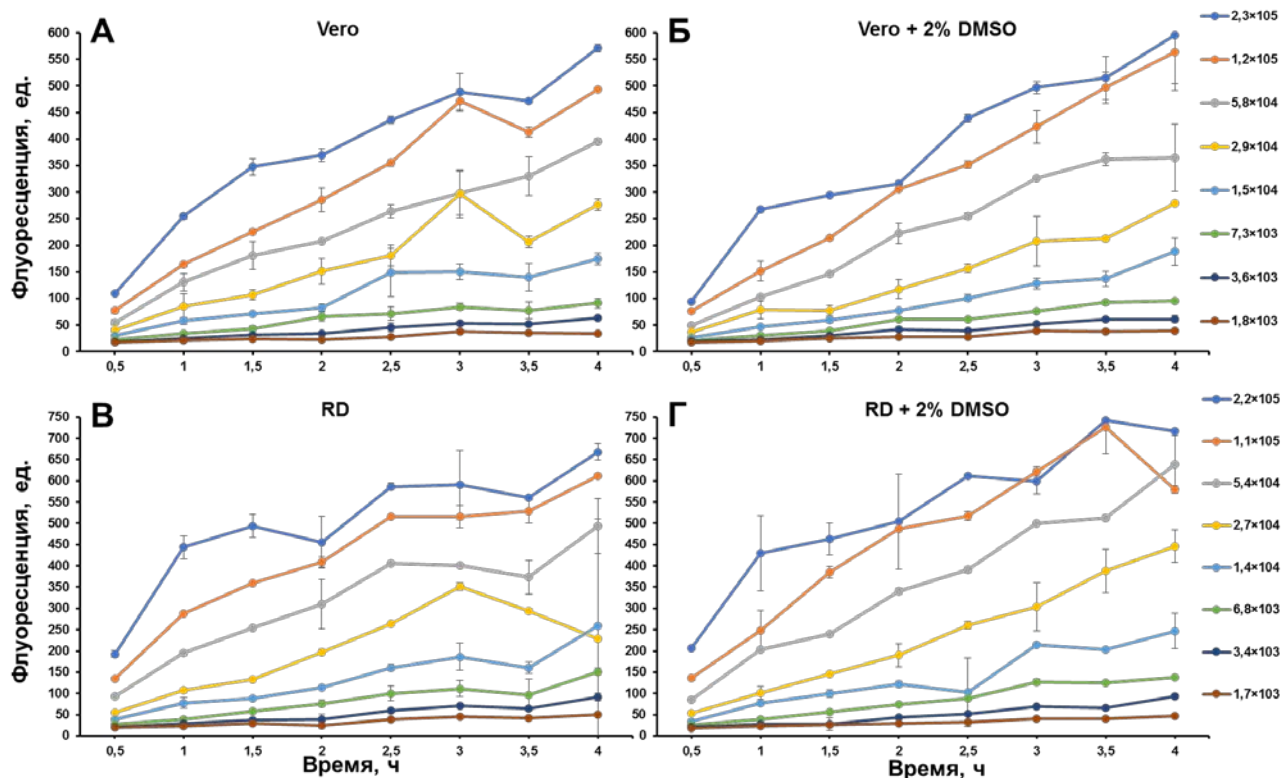


Рисунок 2 – Зависимость активности флуоресценции от времени инкубации и количества клеток Vero и RD при окраске резазурином: (А) клетки Vero; (Б) клетки Vero с добавлением 2% ДМСО; (В) клетки RD; (Г) клетки RD с добавлением 2% ДМСО

3.2. Разработка методик фенотипического скрининга ингибиторов репродукции вирусов *in vitro*

3.2.1. Фенотипический скрининг противовирусной активности ингибиторов репродукции ортофлавиринов

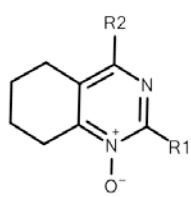
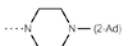
3.2.1.1. Отработка методики фенотипического скрининга на основе реакции подавления бляшкообразования ортофлавиринов

Методика скрининга была разработана на основе реакции нейтрализации по ингибированию образования бляшек под агаровым или метилцеллюлозным покрытием в культуре клеток СПЭВ. К началу исследований не было соединений с доказанной специфической активностью против переносимых клещами ортофлавиринов, поэтому в качестве контрольного соединения использовали гипериммунную сыворотку. Отработку методики проводили на 100 соединениях классов 1,4-дигидропиридинов и пиридотиоиазинов, отобранных методом молекулярного докинга по способности связываться с белком вириона Е ВКЭ. Соединения в концентрации 10 мкМ изучали в тесте ингибирования бляшкообразования в клетках СПЭВ против ВКЭ, ПОВ или ВОГЛ с последующим определением EC_{50} для активных соединений. Семнадцать соединений дозозависимо ингибировали образование бляшек (Таблица 1). Соединения из 1,4-дигидропиридинового ряда проявили противовирусную активность в отношении ВОГЛ или ВКЭ, пиридотиоиазины – в отношении ВКЭ и ПОВ.

3.2.1.2. Сравнение методик фенотипического скрининга ингибиторов репродукции ортофлавиринов – подавление образования бляшек и фокусов

Реакция бляшкообразования не требует дорогостоящих реактивов для визуализации бляшек, однако требует времени для формирования четкой бляшки. В реакции фокусообразования детектируются иммунохимически окрашенные области зараженных клеток, формирующиеся быстрее, а также эта методика позволяет детектировать репродукцию вирусов, которые не вызывают ЦПД. Для рассмотрения возможности сравнения EC_{50} , полученных методами ингибирования образования бляшек и фокусов, была проведена оценка активности серии 4-аминотетрагидрохиназолинов в двух тестах для ВКЭ (Таблица 2).

Таблица 2 – Противовирусная активность 4-аминотетрагидрохиназолинов против ВКЭ при оценке по ингибированию образования бляшек и фокусов в культуре клеток СПЭВ

Структура	Шифр	R1	R2	Оценка по БОЕ $CC_{50} \pm SEM, \mu\text{кМ}$	Оценка по ФОЕ $EC_{50} \pm SEM, \mu\text{кМ}$	p*
	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

Графы окрашены пропорционально значению EC_{50} для соединений:

Активность (EC_{50} , мкМ) 0,00N 0,0N 0,N 1-10 11-20 21-100 >100

* Тест Стьюдента, количество экспериментов 4

**различия статистически значимы

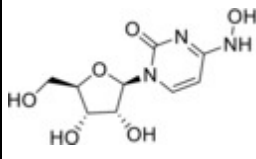
Соединение **7c** не проявило активности в обеих тест-системах ($EC_{50} > 50 \mu\text{кМ}$). Остальные соединения ингибировали репродукцию вируса в обеих тест-системах и имели сходный профиль активности: низкоактивные ($EC_{50} > 10 \mu\text{кМ}$) **7a**, **7t** и **7ab** и высокоактивные ($EC_{50} < 10 \mu\text{кМ}$) **7o**, **7u**, **7w** и **7y**. Статистически достоверные различия значений EC_{50} , полученных в разных тест-системах, выявлены для двух соединений **7a** и **7y**. Однако показатели активности различаются не более, чем в 2 раза, что приемлемо в рамках фенотипического скрининга.

3.2.2. Фенотипический скрининг противовирусной активности ингибиторов репродукции энтеровирусов

3.2.2.1. Отработка методики фенотипического скрининга ингибиторов репродукции энтеровирусов по подавлению вирус-индуцированного ЦПД

Методика оценки противовирусной активности соединений в отношении энтеровирусов *in vitro* была разработана на основе реакции нейтрализации по ингибированию признаков ЦПД. Для тест-системы были выбраны линия клеток RD, как перmissive для многих энтеровирусов независимо от вида, и актуальные изоляты наиболее распространенных типов ЭВ видов А, В и С. Апробировали методику с использованием противовирусного препарата широкого спектра действия N⁴-гидроксицитидина (ННС), действующем на стадии репликации по механизму летального мутагенеза [Viruses. 2022;14(4):841] (Таблица 3). ННС ингибировал появление признаков ЦПД всех исследованных энтеровирусов.

Таблица 3 – Противовирусная активность N⁴-гидроксицитидина (NHC) в отношении энтеровирусов разных видов при оценке по ингибированию 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	ПВ1	43 ± 9

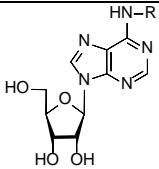
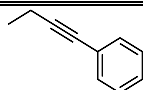
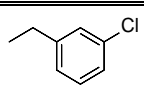
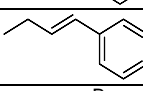
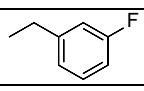
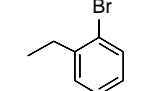
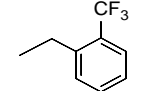
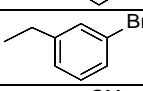
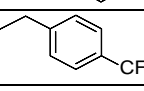
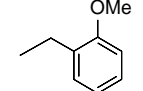
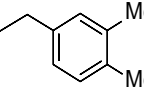
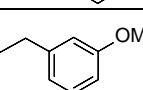
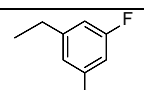
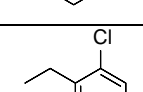
Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

Активность (EC₅₀, мкМ) 0,00N 0,0N 0,N 1-10 11-20 21-100 >100

3.2.2.2. Сравнение методик фенотипического скрининга по подавлению энтеровирус-индуцированного ЦПД с учётом результатов теста методом световой микроскопии и по оценке доли жизнеспособных клеток

Противовирусную активность производных N⁶-бензиладенозина против шт. ВrCr ЭВ-А71 оценивали по стандартной методике с фиксацией результатов визуально с расчётом EC₅₀ по формуле Кербера и с окраской резазурином с расчётом EC₅₀ по кривой ингибирования (Таблица 4). Значения EC₅₀, полученные в разных тест-системах, статистически значимо не различались.

Таблица 4 – Ингибирование репродукции ЭВ-А71 производными N⁶-бензиладенозина по подавлению ЦПД с детекцией методом световой микроскопии и в резазуриновом тесте

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

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

Активность (EC₅₀, мкМ) 0,00N 0,0N 0,N 1-10 11-20 21-100 >100

* Тест Стьюдента, количество экспериментов 2

** – p не рассчитывали ввиду нехватки данных

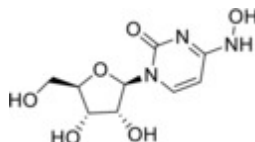
Несмотря на очевидные преимущества визуальной оценки ЦПД, такие как простота и дешевизна, проблемой таких методов является их зависимость от оператора, отсутствие возможности автоматической и независимой записи результатов эксперимента и невысокая масштабируемость скрининга. С другой стороны, при анализе доли жизнеспособных клеток, особенно автоматизированном, теряется возможность визуального контроля состояния клеток в процессе эксперимента, что не позволяет оценить причину гибели клеток без дополнительных исследований. Также возможны объективные причины снижения жизнеспособности клеток при вирусной инфекции или при добавлении соединения, которые возможно компенсировать постановкой контрольных экспериментов.

3.2.3. Фенотипический скрининг противовирусной активности ингибиторов репродукции тогавирусов

3.2.3.1. Отработка методики фенотипического скрининга ингибиторов репродукции тогавирусов по подавлению вирус-индуцированного ЦПД

Реакция нейтрализации инфекционности (ЦПД) в культуре Vero была выбрана как основа для методики фенотипического скрининга против вируса Чикунгунья (ЧИКВ). Методику апробировали с использованием ингибитора широкого спектра действия ННС (Таблица 5). ННС активно ингибировал репродукцию ЧИКВ. Полученное значение EC_{50} было на порядок выше заявленного в литературе для инфекционного вируса, однако значения, полученные для репликаона ЧИКВ, не отличались от полученных нами в эксперименте.

Таблица 5 – Противовирусная активность N^4 -гидроксицитидина в отношении ЧИКВ при оценке по подавлению образования признаков ЦПД в культуре клеток Vero



Источник данных	Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(4):e02395-16			Эксперимент
	клетки Huh-7 и репликаон ЧИКВ	клетки ВНК-21 и репликаон ЧИКВ	ЧИКВ урожай в клетках Vero	ЧИКВ ЦПД в клетках Vero
$EC_{50} \pm SD$, мкМ	$0,8 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,1$	$5,9 \pm 2,4$
p^*	0,087	0,149	0,064	–

* Тест Стьюдента, количество экспериментов 4

3.2.3.2. Сравнение методик фенотипического скрининга ингибиторов репродукции тогавирусов по подавлению ЦПД и бляшкообразования

Сравнение методик проводили с использованием производных периленовых нуклеозидов – жёстких амфипатических ингибиторов слияния (RAFI), а также ННС, действующего на стадии репликации вирусного генома. Активность соединений сравнивали в одном эксперименте: готовили смеси ЧИКВ с разведениями ингибиторов, после чего смеси добавляли к клеткам Vero с последующей детекцией ЦПД и бляшек (Таблица 6). По результатам экспериментов доза заражения соответствовала 100-200 ТЦД₅₀ или 48-72 БОЕ, допустимым для расчёта EC_{50} по формулам Кербера и Рид-Менча. Значения EC_{50} для RAFI, полученные методом ингибирования бляшкообразования, были в 2-8 раз ниже, чем значения, полученные методом

ингибирования ЦПД. Однако статистически достоверные различия были получены только для 2 из 5 соединений (см6pUY11, см7pUY11). Значения EC₅₀ для ННС не различались. Таким образом, в зависимости от свойств ингибитора значения EC₅₀ между тестами ингибирования вирус-индуцированного ЦПД и бляшкообразования могут отличаться.

Таблица 6 – 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	p*
см1pUY11	РОМ		0,19 ± 0,08	0,072 ± 0,013	0,172
см6pUY11			0,69 ± 0,19	0,087 ± 0,021	0,024**
см7pUY11			0,48 ± 0,12	0,094 ± 0,012	0,023**
см8pUY11			0,27 ± 0,07	0,087 ± 0,025	0,067
см5pUY11			0,17 ± 0,05	0,080 ± 0,026	0,138
ННС			2,65 ± 0,72	2,23 ± 0,15	0,590

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

Активность (EC₅₀, мкМ) 0,00N 0,0N 0,N 1-10 11-20 21-100 >100

* Тест Стьюдента, количество экспериментов 4

**различия статистически значимы

3.2.4. Фенотипический скрининг противовирусной активности ингибиторов репродукции лентивирусов

3.2.4.1. Отработка методики фенотипического скрининга ингибиторов репродукции лентивирусов по подавлению вирус-индуцированного ЦПД

Методика основана на ранее разработанной методике фенотипического скрининга ингибиторов репродукции энтеровирусов. Для тест-системы использовали шт. NL4-3 ВИЧ-1 и линию клеток МТ-4, в которых вирус давал различимое ЦПД на 7-10 сутки после инфицирования. Апробацию методики проводили с использованием зидовудина (азидотимидин, AZT) – первого зарегистрированного лекарства от ВИЧ-инфекции (Таблица 7). По литературным данным значение EC₅₀ для AZT в тесте с инфекционным вирусом в культуре клеток МТ-4 составляет 4-66 нМ. В рамках нашей постановки активность составила 7,1 нМ, что соответствует этому диапазону значений.

Таблица 7 – Противовирусная активность азидотимидина (AZT) в отношении ВИЧ-1 при оценке по подавлению признаков ЦПД в культуре клеток МТ-4

Источник данных	EC ₅₀ ± SD, мкМ	CC ₅₀ ± SD, мкМ
Эксперимент	0,0071 ± 0,0043	8,0 ± 1,5
Curr Pharm Des. 2005; 11(29):3847-52	0,004	–
Int J Biol Macromol. 2012;50(4):974-80	0,004	>93
Clin Infect Dis. 1993;16 Suppl 1:S16-21	0,066	–

3.2.5. Фенотипический скрининг противовирусной активности ингибиторов репродукции бетакоронавирусов

В отличие от других использованных в работе вирусов, SARS-CoV-2 стал новым ранее не исследовавшимся вирусом, для которого в короткие сроки было необходимо разработать лабораторные методы выделения, культивации и количественной характеристики в культуре клеток. Далее на основе этих методов были разработаны способы оценки противовирусной активности антител и лекарственных препаратов.

3.2.5.1. Выделение тест-штамма ПИК35 SARS-CoV-2

В клетках Vero были выделены и охарактеризованы штаммы SARS-CoV-2 из ПЦР-положительных мазков из носоглотки пациентов, поступивших в стационар г. Москвы с COVID-19 в апреле 2020 г. Шт. ПИК35 был выбран для дальнейшей работы. Геном вируса содержал восемь нуклеотидных замен по сравнению с исходным штаммом Ухань: пять из них в области, кодирующей вирусные белки, привели к четырём аминокислотным мутациям, включая мутацию D614G в белке шипа S.

3.2.5.2. Методики реакции нейтрализации и фенотипического скрининга ингибиторов репродукции бетакоронавирусов по подавлению вирус-индуцированного ЦПД

Методика основана на реакции нейтрализации инфекционности в культуре клеток Vero, специфичность которой была отработана на следующих сыворотках:

- Группа 1: 30 сывороток лиц в возрасте 20-60 лет, собранных в 2016-2017 гг. в рамках Национальной программы серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики;
- Группа 2: 23 сыворотки, собранные до мая 2019 г. от лиц с лабораторно подтвержденным диагнозом острая респираторная вирусная инфекция, ассоциированная с различными вирусами;
- Группа 3: 10 сывороток вакцинированных лиц, содержащие антитела к вирусам гриппа типов А (H1N1, H3N2) и В (линии Виктория и Ямагата);
- Группа 4: 126 парных сывороток 63 пациентов с диагнозом COVID-19 на основе результатов КТ и ПЦР-теста, отобранных в динамике лечения: 1-2 и 5-11 сутки после госпитализации.

Сыворотки групп 1-3 не ингибировали развитие SARS-CoV-2-индуцированного ЦПД в культуре клеток Vero. Из первых 63 сывороток (сыворотка «1») группы 4 было выявлено 38, обладающих вируснейтрализующей активностью (Рисунок 3). При исследовании вторых сывороток (сыворотка «2»), взятых спустя 4-9 суток после первых, показано что все сыворотки обладали вируснейтрализующей активностью. Это свидетельствует о специфичности разработанной методики реакции нейтрализации.

Далее методику апробировали с использованием противовирусного препарата широкого спектра действия ННС. ННС эффективно ингибировал репродукцию SARS-CoV-2, подавляя появление признаков вирус-индуцированного ЦПД (Таблица 8). Значение EC_{50} находилось в микромолярном диапазоне, но было на порядок выше описанного в литературе, что объяснимо использованием разных штаммов и разной схемы проведения эксперимента.

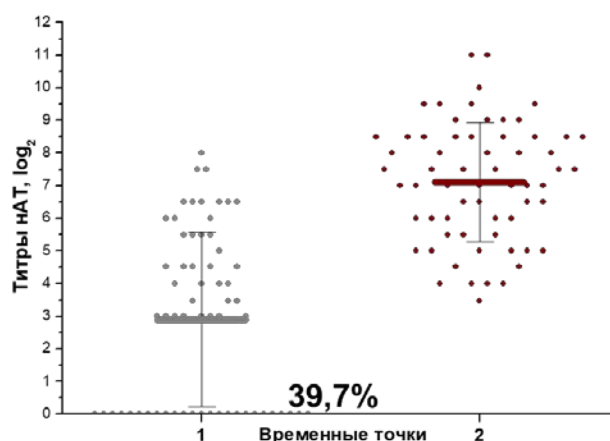


Рисунок 3 – Титры нейтрализующих антител к шт. ПИК35 вируса SARS-CoV-2 в сыворотках больных COVID-19 в динамике наблюдения. Доля негативных сывороток на момент первого взятия крови указана цифрой на графике

Таблица 8 – Противовирусная активность ННС против SARS-CoV-2 при оценке по ингибированию образования признаков ЦПД в культуре клеток Vero

Источник данных	EC ₅₀ ± SD, мкМ	CC ₅₀ , мкМ
Эксперимент	7,4 ± 3,6 (шт. ПИК35)	>100 (Vero)
Sci Transl Med. 2020;12(541):eabb5883	0,30 (шт. USA-WA1/2020)	>10 (Vero E6)

3.2.5.3. Фенотипическая оценка противовирусной активности по снижению урожая SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero и в псевдовиральной системе

Клетки Vero заражали SARS-CoV-2 после инкубации с соединением и по прохождении одного репликативного цикла вируса определяли урожай вируса титрованием. Результаты представляли как процент ингибирования накопления урожая вируса по сравнению с контролем без добавления соединения. Противовирусную активность оценивали для пептида P1 и его сшитого варианта P1st, направленных на ингибирование взаимодействия вириона с рецептором ACE2. Сшитый пептид P1st дозозависимо снижал урожай вируса (Рисунок 4А), в то время как несшитый пептид P1 почти не ингибировал размножение вируса.

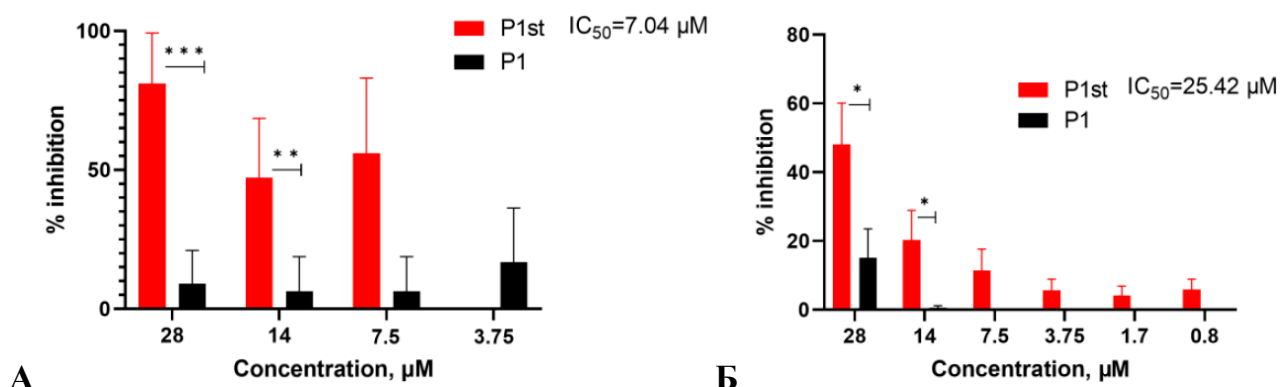


Рисунок 4 – Влияние сшитого (P1st) и несшитого (P1) пептида на инфекцию SARS-CoV-2 *in vitro* (А) и проникновение псевдовиральных частиц (Б). Представлены данные трёх независимых экспериментов; данные анализировали с помощью множественного непарного критерия Стьюдента, * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$

В параллельных экспериментах оценивали способность этих пептидов ингибировать проникновение псевдовиральных частиц, несущих тримеры белка S SARS-

CoV-2 и ген GFP, в клетки НЕК-293Td, экспрессирующие рецептор ACE2. Сшитый пептид P1st также дозозависимо ингибировал доставку и экспрессию гена GFP в клетках, а несшитый вариант – не ингибировал (Рисунок 4Б) [Int J Mol Sci. 2023;24(9):8269]. Несмотря на различия значений EC₅₀, полученные в инфекционной и неинфекционной системах, значительный разброс данных внутри экспериментов не позволил выявить достоверных различий между средними значениями активности (p = 0,255, тест Стьюдента).

3.3. Фенотипический скрининг ингибиторов репродукции вирусов

Разработанные методики использовали для оценки противовирусной активности соединений разных химических классов и смесей природного происхождения (Таблица 9). Далее рассматриваются их характерные особенности.

Таблица 9 – Количество активных ингибиторов в протестированных сериях соединений различных химических классов и смесей природного происхождения

Серия соединений	Возможный механизм действия	Вирус (активные/протестированные)											
		род <i>Orthoflavivirus</i>			род <i>Enterovirus</i>						род <i>Alpha-virus</i>	род <i>Lenti-virus</i>	род <i>Beta-corona-virus</i>
		ВКЭ	ПОВ	ВОГЛ	ЭВ-А71	СVA16	Е30	Е13	ПВ1	СVA21	ЧИКВ	ВИЧ-1	SARS-CoV-2
№ ⁶ -замещённые аденозины	влияние на репликацию/транскрипцию генома	5/21			28/87	22/24	5/87	10/24	7/87	5/24		4/24	
другие аналоги нуклеозидов		0/9			2/9	2/9	0/9	0/2	0/9	0/2			4/61
феноксазиновые нуклеозиды		21/32	10/14	7/8	0/32		0/32		0/32		9/13		4/24
RAFI (производные перилена)	фотосенсибилизация, влияние на проникновение	53/55			2/18						33/37		34/37
производные Бенгальского розового											6/6	5/6	6/6
4-амино-тетрагидро-хиназолины	влияние на проникновение	9/28			0/28		0/28		0/28				
изоксазолы		13/18	12/15	8/15									
Se-содержащие соединения	неизвестно	19/25			0/25		0/25		0/25				
аналоги хромофора GFP	ингибитор транскрипции											8/27	
пептиды	ингибиторы взаимодействия с рецептором												0/12
пептидо-миметики	ингибиторы протеазы												2/2
Гуминовые вещества	неизвестно	8/10			0/10		0/10		0/10				
Растительные экстракты	неизвестно				3/64						36/64		20/64

3.3.1. Жёсткие амфипатические ингибиторы слияния (*rigid amphipatic fusion inhibitors, RAFI*)

RAFI представляют собой класс аналогов нуклеозидов, несущих объёмные ароматические заместители в основании. Были предложены два механизма действия RAFI: один реализуется за счет их включения в мембраны вирионов или клеток с

придаем мембране жёсткости и изменением её кривизны, что механически запрещает процесс слияния [Future Virol. 2014;9(3):283-299]; другой предполагает фотосенсибилизацию заместителя, образование активных форм кислорода и окисление липидов в мембранах, что приводит к их разрушению, особенно в составе вирионов, поскольку у метаболически активных клеток есть механизмы репарации мембран [PLoS Pathog. 2013;9(4):e1003297].

В работе рассматривали 64 производных и аналога 5-(перилен-3-илэтинил)-2'-дезоксипуридина, 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).

Безоболочечные энтеровирусы часто использовали как контроль в экспериментах с RAFI. Два производных амидов 5-(перилен-3-илэтинил)-1-(карбоксиметил)пуридина, **2d** и **2g**, проявили противовирусную активность против ЭВ-А71 в культуре клеток RD, сравнимую с цитотоксичностью, при многократном повторении эксперимента. Было сделано предположение, что RAFI могут влиять на активность метаболизма клеток, что приводит к снижению скорости размножения ЭВ-А71 и уменьшению признаков вирус-индуцированного ЦПД. Мы оценили жизнеспособность клеток RD, СПЭВ и Vero в присутствии активных **2d** и **2g** и неактивных **1** и **8c** (Рисунок 5). Соединения **2d** и **2g** в концентрациях >20 мкМ заметно снижали жизнеспособность клеток RD, но не влияли на клетки СПЭВ и Vero. Кроме того, наблюдалась прямая корреляция между снижением жизнеспособности и EC_{50} . Таким образом, можно сделать вывод, что анти-энтеровирусная активность этих соединений неспецифична и является результатом снижения жизнеспособности клеток RD, которые не могут в достаточной степени поддерживать репродукцию вируса.

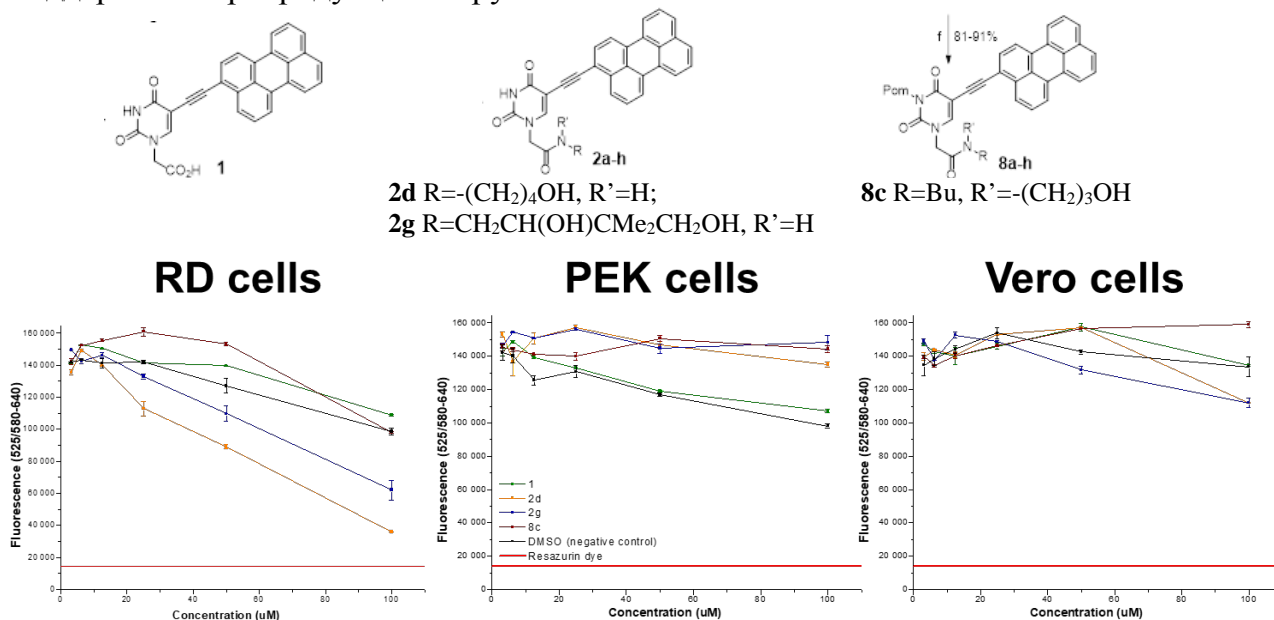


Рисунок 5 – Оценка жизнеспособности клеток RD, СПЭВ и Vero в присутствии производных периленовых нуклеозидов, проявивших некоторую активность против ЭВ-А71

3.3.2. Производные Бенгальского розового

Фотосенсибилизирующие соединения являются не только многообещающим классом кандидатов в лекарства, но и инактиваторами для вакцинных антигенов. Мы провели скрининг противовирусной активности 9 фотосенсибилизирующих производных бенгальского розового с различными гидрофобными n-алкильными

цепями, которые проявили высокую ($EC_{50} < 1$ мкМ) активность против ЧИКВ, ВИЧ-1 и SARS-CoV-2 *in vitro*.

3.3.3. Производные нуклеозидов

Многочисленные аналоги нуклеозидов активно тестировались различными лабораториями как ингибиторы репликации вирусов. Для расширения SAR нуклеозидов против ВКЭ был проведён скрининг серии из 30 N⁶-замещённых производных аденозина наряду с N²-замещёнными гуанозинами, N⁴-замещёнными цитидинами, полярными рибонуклеотидами и 3'-С-метилированными нуклеозидами с выявлением нескольких новых ингибиторов.

Мы определили спектр антиэнтеровирусной активности широкой серии из 87 производных N⁶-бензиладенозина против 3-6 представителей энтеровирусов видов А, В и С с разработкой SAR.

Активность известных нуклеозидных противовирусных препаратов фавипиравира и молнупиравира, а также 61 производного 5'-норкарбоциклических нуклеозидов, ранее показавших антибактериальную, противопаразитарную или антипролиферативную активность, оценивали против SARS-CoV-2. Известные соединения проявили активность, среди новых было обнаружено 2 активных соединения (EC_{50} около 50 мкМ).

3.3.4. Феноксазиновые нуклеозиды

Противовирусная активность аналога нуклеозида может быть достигнута путем изменения размера и формы не только сахарного остатка, но и ароматического гетероциклического основания. Был проведен фенотипический скрининг двух серий из 32 производных феноксазиновых нуклеозидов против исследуемых РНК-содержащих вирусов, 21 из них проявили микромолярную активность против переносимых клещами ортофлавиринов, ЧИКВ и SARS-CoV-2.

3.3.5. 4-аминотетрагидрохиназолины и изоксазолы

С целью поиска новых противовирусных структур был проведён скрининг серии из 28 новых 4-фторзамещённых N-оксидов пиримидинов, а также 18 N-оксидов 4-аминотетрагидрохиназолина против переносимых клещами ортофлавиринов с выявлением 22 «первых в своём классе» активных соединений, что позволило провести SAR и определить пути оптимизации структур для дизайна соединений-лидеров для дальнейшей работы.

3.3.6. Селен-содержащие органические низкомолекулярные соединения

Исследование химии небιοгенных элементов, например, селена (Se), является перспективной стратегией для открытия новых противовирусных хемотипов. Нами была исследована противовирусная активность нескольких серий из 25 селенорганических и сероорганических соединений, полученных из цианотиоацетамида и цианоселеноацетамида, на репродукцию ВКЭ с выявлением 19 соединений, подавляющих репродукцию вируса.

3.3.7. Природные смеси и выделенные из них соединения

Смеси природного происхождения являются неисчерпаемым источником новых молекул, которые могут обладать биологической активностью.

Гуминовые вещества представляют собой сложную природную смесь, содержащую различные органические кислоты, образующиеся в результате окислительной деградации макромолекул разлагающейся биомассы. В рамках данной

работы была проведена оценка противовирусной активности 10 проб гуминовых веществ в отношении репродукции ВКЭ и энтеровирусов. Все образцы гуминовых веществ, за исключением двух синтетических, проявили противовирусную активность в отношении ВКЭ, но не были активны против энтеровирусов.

Было проведено исследование ингибиторной активности 64 экстрактов растительного происхождения, полученных путём экстракции органическими растворителями и хроматографическим фракционированием, на репродукцию ЧИКВ, ВИЧ-1, SARS-CoV-2 и ЭВ-А71. Наиболее активны против всех вирусов были экстракты борщевика, папоротника орляка и таволги вязолистной. При этом для большинства растений активны были как экстракты органических растворителей, так и белково-пептидные, что указывает на содержание активных компонентов различной природы.

Для одного соединения растительного происхождения, эпигаллокатехин-3-галлата (EGCG, компонент экстракта зелёного чая), было проведено отдельное исследование и показана его выраженная ингибирующая активность на репродукцию SARS-CoV-2 *in vitro*. При этом EGCG достоверно более активно действовал при добавлении к вирусу перед заражением, чем при добавлении после инфицирования клеток, значения EC₅₀ составили 5±1 мкМ и >40 мкМ, соответственно, что указывает на взаимодействие ингибитора с вирионом.

3.3.9. Хромофор GFP и его синтетические аналоги, нацеленные на G4 LTR-III ВИЧ-1

G-квадруплексы (G4) представляют собой вторичные структуры, образованные богатыми гуанином участками нуклеиновых кислот. Среди наиболее привлекательных мишеней для подавления продукции вируса является структура G4, образующиеся в промоторе 5'-LTR-III ВИЧ, которая необходима для эффективного прохождения вирусного цикла [J Med Chem. 2015;58(24):9639-52]. Мы провели скрининг 26 синтетических аналогов хромофора GFP как потенциальных ингибиторов репродукции ВИЧ. LTR-стабилизирующие соединения проявили активность с EC₅₀ в микромолярном диапазоне, которая коррелировала со значительной цитотоксичностью (CC₅₀ < 10 мкМ), что указывает на то, что соединения могут иметь сходные мишени в геномах ВИЧ-1 и человека.

3.3.10. Пептидомиметики – ингибиторы главной протеазы Mpro SARS-CoV-2

Селективный ингибитор Mpro SARS-CoV-2 PF-00835231 был разработан корпорацией Pfizer на основе исследования протеаз SARS-CoV и MERS-CoV [Nat Commun. 2021;12(1):6055]. Нами была проведена сравнительная оценка противовирусной активности PF-00835231 и ингибитора протеазы NS3 ВГС Нарплапревира. Оба ингибитора показали сходную активность с EC₅₀ 64 ± 12 мкМ. Для достижения заявленной микромолярной активности PF-00835231 необходимо применение дополнительного препарата, способствующего накоплению соединения в клетках.

3.3.11. Пептиды – ингибиторы взаимодействия SARS-CoV-2 с рецептором

Ингибирование связывания с рецептором является очевидной и часто используемой стратегией борьбы с вирусными инфекциями. Начальные этапы взаимодействия SARS-CoV-2 с клеткой определяет рецептор-связывающий домен (RBD) белка S, который взаимодействует с молекулой ACE2. Мы оценили противовирусную активность мономерных модифицированных пептидов на основе участков ACE2 и 9 их гетеродимерных «химерных» пептидов на их основе. Эти

пептиды обладали микромолярной эффективностью связывания с RBD при микротермофорезе, но не проявили никакой активности *in vitro*.

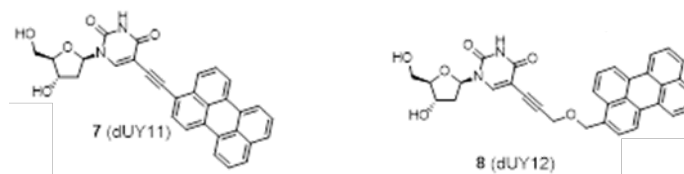
3.4. Методики фенотипической оценки вирулицидной активности соединений

Вирулицидная активность – это способность соединений инактивировать высокую дозу вируса, необходимое свойство дезинфектантов, инактиваторов для вакцин и т.п.

3.4.1. Методика оценки вирулицидной активности соединений против высоких доз ортофлавириусов

Вирулицидная активность производных перилена (RAFI) была оценена против ВКЭ (Таблица 10). Соединения в концентрации $1000 \times EC_{50}$ полностью останавливали образование бляшек при дозе вируса $2 \times 10^0 - 2.2 \times 10^3$ БОЕ и почти полностью (оставались единичные бляшки) при $2.2 \times 10^4 - 2.2 \times 10^5$ БОЕ, т.е. добавление соединения снижало содержание инфекционного вируса на 5 lg.

Таблица 10 – Снижение инфекционного титра ВКЭ при обработке периленовыми нуклеозидами 7 и 8



Доза вируса (БОЕ)	Ингибирование (%)	
	7 (dUY11)	8 (dUY12)
2.2	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

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

Дезинфектанты часто являются высокотоксичными соединениями для тестирования в культуре клеток по стандартной методике. Проведено тестирование препаратов на основе разветвленного олигогексаметиленгуанидина гидрохлорида (ОГМГ-ГХ): субстанции, средства для обработки поверхностей и спрея для рук против 10^6 ТЦД₅₀ SARS-CoV-2. Инактивация SARS-CoV-2 всеми препаратами имело прямую зависимость от их концентрации и, соответственно, действующего вещества ОГМГ-ГХ. При этом все препараты в исходной концентрации инактивировали инфекционный вирус со 100% эффективностью.

3.5. Методики фенотипического определения механизма действия соединений

Начальной целью экспериментов по определению механизма действия соединений является определение стадии репликативного цикла вируса, ингибируемого активным соединением. Для этого были разработаны фенотипические методики

определения активности соединения в зависимости от времени добавления соединения – эксперимент Time-of-Addition.

3.5.1. Зависимость активности соединений от времени добавления для ортофлавириусов и энтеровирусов – по снижению урожая

Исследуемые соединения добавляли к вирусу или инфицированным клеткам до или на разные сроки после заражения. После одного цикла репликации собирали и титровали урожай вируса, результаты представляли в виде % снижения урожая по сравнению с клетками, обработанными ДМСО.

Клетки СПЭВ заражали ВКЭ и обрабатывали производными изоксазола **4b** и **4o** по различным схемам (Рисунок 6). Воздействие соединения на вирус перед взаимодействием с клетками значительно снижало уровень репродукции вируса по сравнению с контролем. Эффект был наиболее выражен при преинкубации вируса с соединением. Таким образом, наиболее вероятным механизмом действия соединения является его взаимодействие с вирионом или клеточными мишенями, участвующими в прикреплении и проникновении вируса.

Клетки RD заражали энтеровирусом и обрабатывали ННС по различным схемам (Рисунок 7). Значительное снижение урожая вируса наблюдалось при схемах 3, 4 и 5, что свидетельствует о том, что ННС действует на одной из внутриклеточных стадий репликативного цикла вируса после проникновения, что соответствует показанному ранее механизму действия ННС [Viruses. 2022;14(4):841].

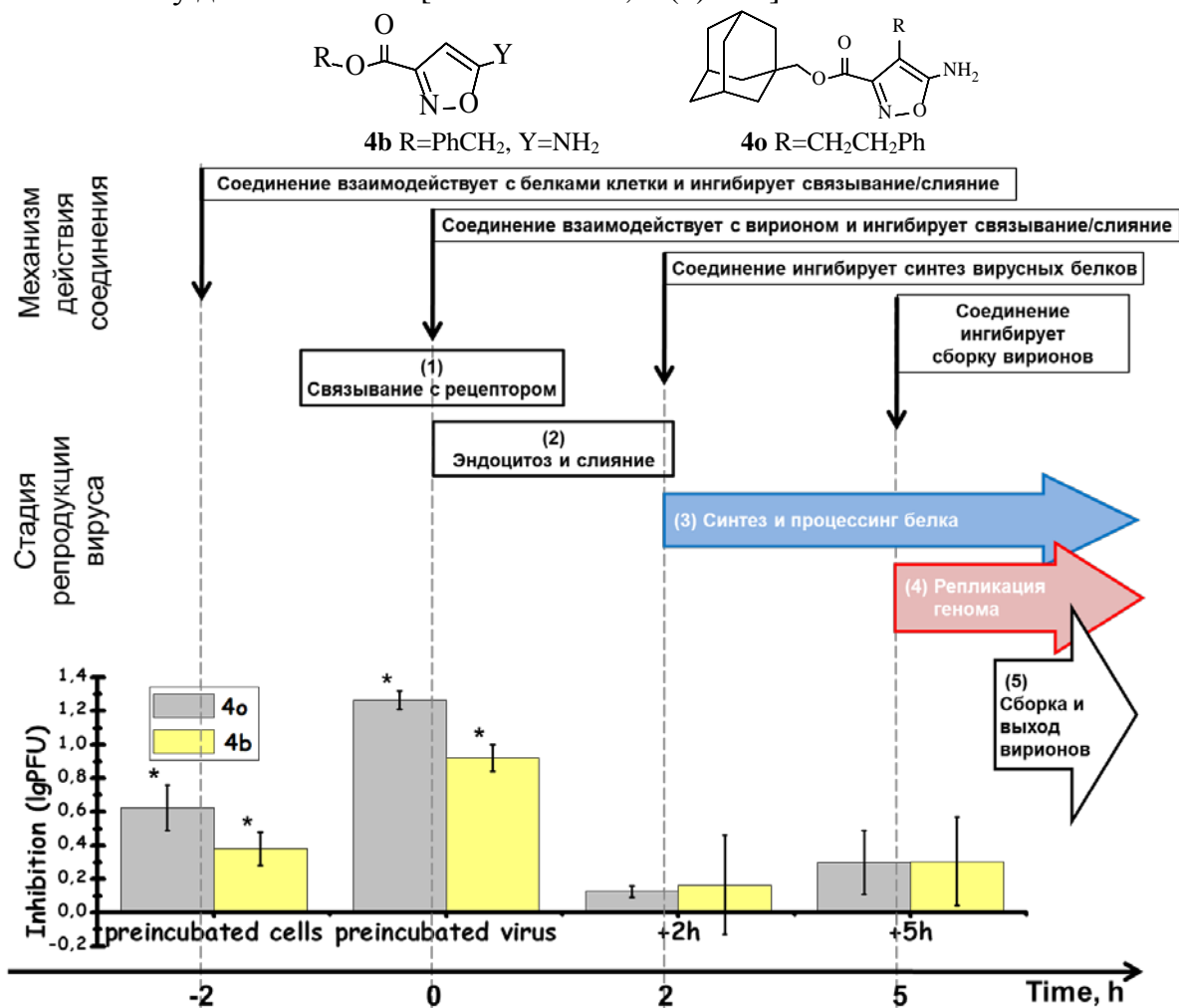


Рисунок 6 – Снижение урожая ВКЭ в клетках СПЭВ, обработанных соединениями **4b** или **4o** на различных стадиях репликативного цикла вируса (*p < 0.05)

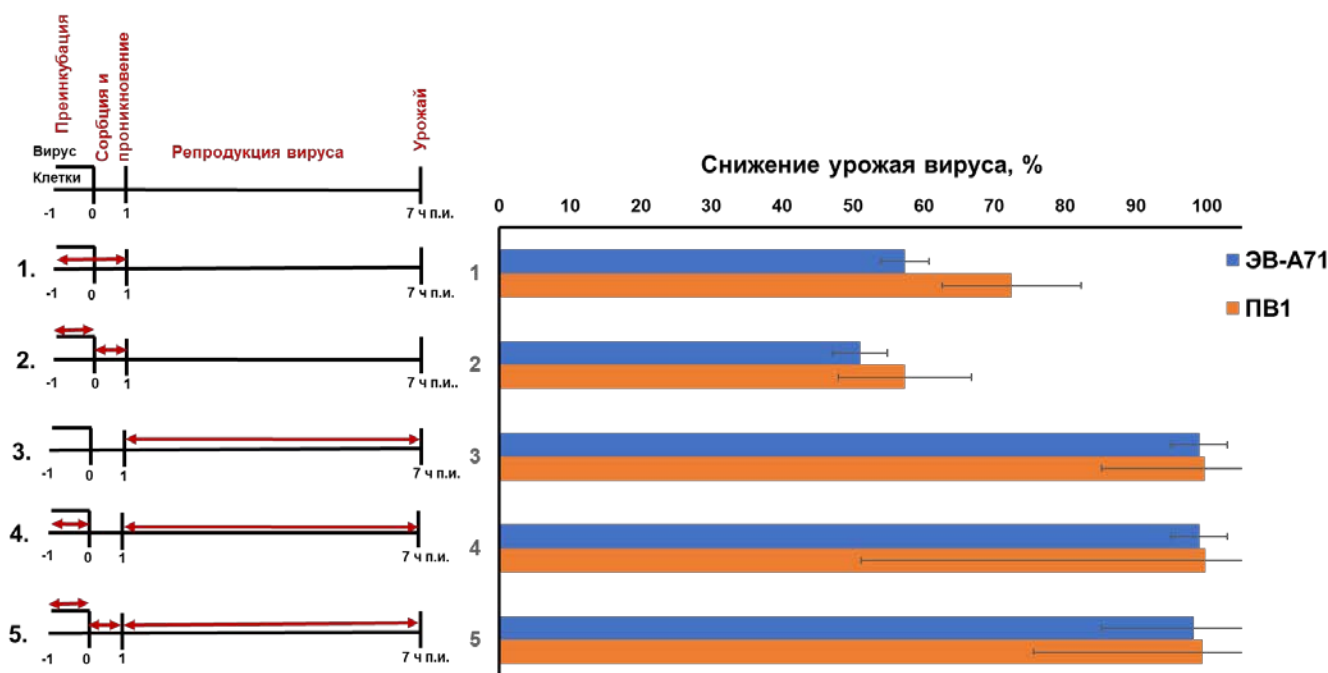


Рисунок 7 – Снижение урожая энтеровирусов (ЭВ-А71 и ПВ1) в клетках RD, обработанных ННС на различных стадиях репликативного цикла вируса

3.5.2. Зависимость активности соединений от времени добавления для SARS-CoV-2 – по снижению урожая и подавлению бляшкообразования

Клетки Vero заражали SARS-CoV-2 и добавляли к ним соединения (периленовый нуклеозид cm11dUY11, ННС и контроль ДМСО) на различных стадиях репликативного цикла вируса (Рисунок 8А). Урожай вируса определяли титрованием по ЦПД (Рисунок 8В), а остаточный инфекционный вирус – по образованию бляшек (Рисунок 8С).

Добавление ННС приводило к снижению урожая вируса и подавлению образования бляшек только когда соединение присутствовало в клетках после заражения вирусом (схемы 1 и 7), что соответствует механизму его действия на стадии репликации. Соединение cm11dYU11 подавляло образование бляшек при одновременном присутствии в системе растворов вируса и соединения (схемы 1, 3 и 4), что указывает на его прямое действие на вирионы, а также при преинкубации клеток с соединением (схема 2), что, вероятно, связано с воздействием сорбированного в мембранах клетки соединения на вирионы до проникновения в клетку. Эксперимент по оценке урожая вируса по схеме 7 (Рисунок 8В) показал практически полное исчезновение инфекционных частиц из вторичного урожая вируса, несмотря на очевидное инфицирование исследуемых клеток и образование бляшек (Рисунок 8С). Мы полагаем, что это связано с повреждением вторичных вирионов при титровании вируса соединением, которое находилось в клеточном супернатанте.

Таким образом, соединение cm11dUY11 воздействует на вирион до стадии проникновения. При этом методика оценки остаточного вируса по ингибированию появления бляшек показала более чёткие результаты по сравнению с оценкой урожая вируса, при которой не удалось избежать действия соединения на вторичные вирионы.

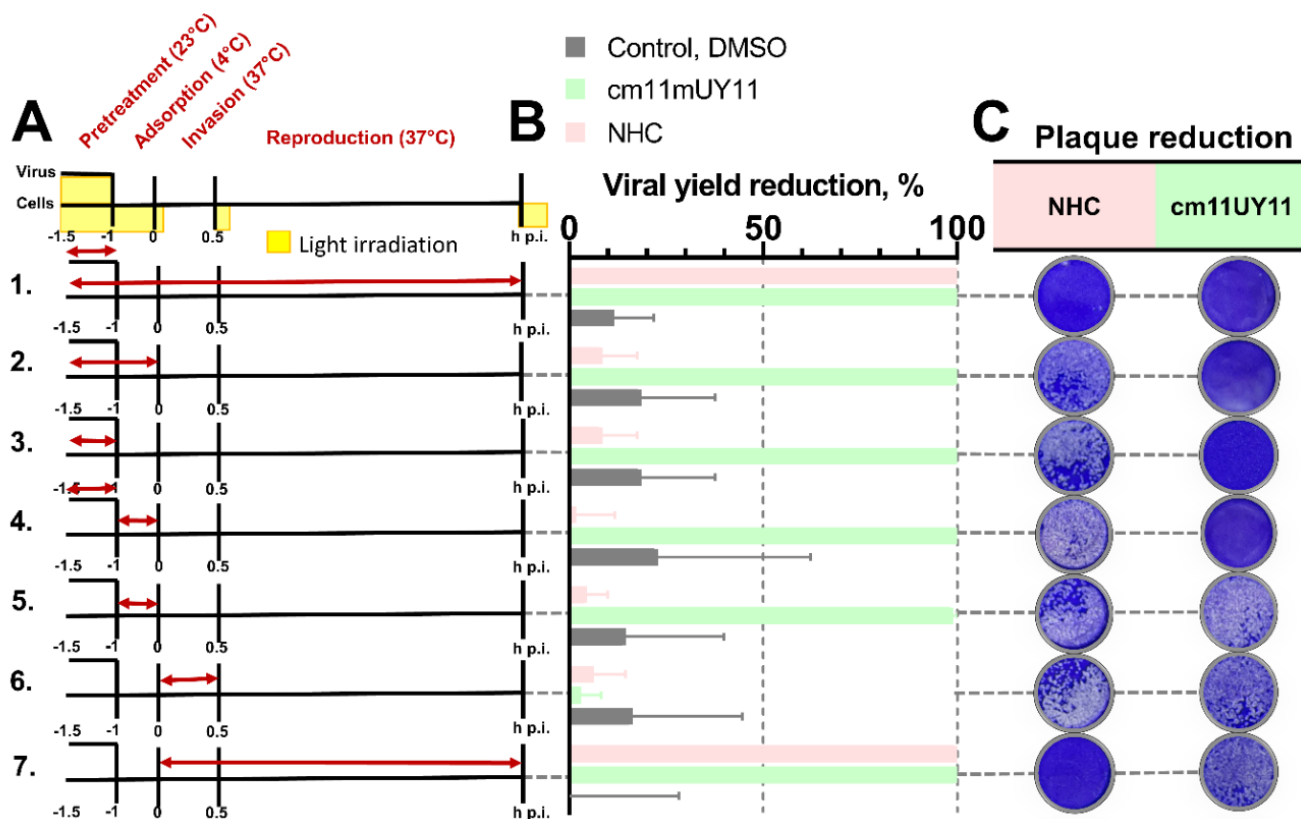


Рисунок 8 – Анализ активности соединения в отношении SARS-CoV-2 в зависимости от времени добавления. Клетки и вирус обрабатывали 0,5 мкМ cm11UY11, или 5 мкМ NHC, или ДМСО (отрицательный контроль) по разным схемам (А). Урожай вируса (по 1 репл. цикла) определяли путем титрования по ЦПД в клетках Vero и представляли как процент (%) по отношению к контролю ДМСО (В). Бляшки окрашивали и подсчитывали через 5 сут инкубации при 37°C (С)

3.6. Изучение влияния параметров методик фенотипического скрининга *in vitro* на результаты определения показателей противовирусной активности

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

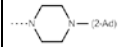
Цель фенотипического скрининга заключается в выявлении соединений-ингибиторов, которые можно бы использовать на практике в актуальной эпидемиологической ситуации. Для разработки подходов к выбору штамма вируса для фенотипического скрининга были проведены сравнительные эксперименты для разных вирусов.

3.6.1.1. Сравнение противовирусной активности 4-аминопиримидинов в отношении разных штаммов ВКЭ

Для оценки спектра активности N-оксидов 4-аминопиримидина, предположительно ингибирующих стадию проникновения ортофлавиринов, была выбрана панель штаммов ВКЭ, различающихся подтипом, временем, источником и местом выделения и пассажной историей. Большинство исследованных соединений подавляли репродукцию всех выбранных штаммов (Таблица 11). При этом соединения с самой высокой активностью против тестового шт. Абсеттаров показали наиболее устойчивый профиль ингибирования репродукции и других штаммов. Таким образом, как подтиповые, так и уникальные аминокислотные замены оказывают незначительное

влияние на результат определения активности соединений, ингибирующих стадию проникновения ВКЭ.

Таблица 11 – Противовирусная активность N-оксидов 4-аминопиримидина в отношении различных штаммов ВКЭ при оценке по ингибированию образования бляшек в культуре клеток СПЭВ

Соединение	R1	R2	EC ₅₀ ± SD, мкМ						
			Европейский	Сибирский				Дальневосточный	
			Абсеттаров	Василь-ченко	TV08-T2546	Лесо-парк1	ЭК-328	205 KGG	ДВ936к
7a	Me	NHBU	31 ± 5	>50	18 ± 4	>50	>50	>50	18 ± 3
7c	<i>t</i> -Bu	NHCH ₂ Ph	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50
7o	Me	NH(2-OH-C ₆ H ₄)	8 ± 3	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	25 ± 3	>50	>50	>50	>50
7u	<i>t</i> -Bu	NH(CH ₂) ₂ (1-Ad)	6 ± 2	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	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	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	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	29 ± 1	35 ± 5	39 ± 2	37 ± 1	12 ± 2

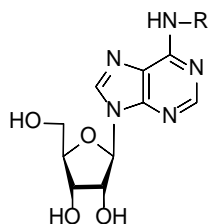
Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

Активность (EC₅₀, мкМ) 0,00N 0,0N 0,N 1-10 11-20 21-100 >100

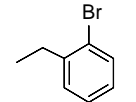
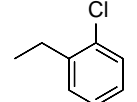
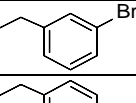
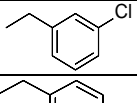
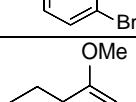
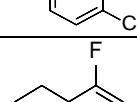
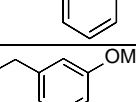
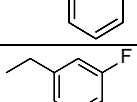
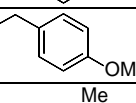
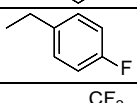
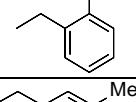
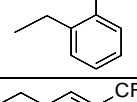
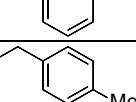
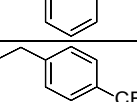
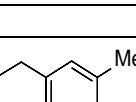
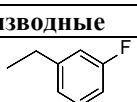
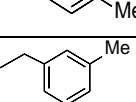
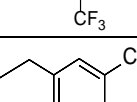
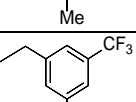
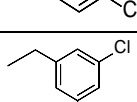
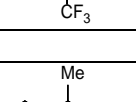
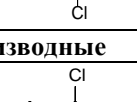
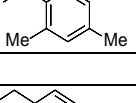
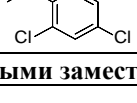
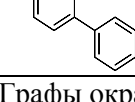
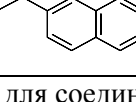
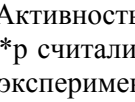
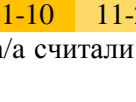
3.6.1.2. Сравнение противовирусной активности производных N⁶-бензиладенозина в отношении разных штаммов ЭВ-А71

Для проведения сравнительной оценки активности производных N⁶-бензиладенозина, действующих на стадии репликации, были выбраны актуальный штамм 46973 китайского генотипа С4 и прототипный штамм BrCr генотипа А, выделенные с разницей в 40 лет. Полипротеины данных штаммов различаются по 108 позициям, из которых 78 находятся в области, кодирующей неструктурные белки вируса, и 29 из этих мутаций можно назвать неконсервативными. Таким образом, локальные свойства белков репликативного комплекса между штаммами могут отличаться. Соединения, неактивные против шт. 46973, чаще всего были неактивны и против шт. BrCr (Таблица 12).

Таблица 12 – Цитотоксичность и активность производных N⁶-бензиладенозина в отношении разных штаммов ЭВ-А71 (по подавлению признаков ЦПД)



#	Заместитель (R)	EC ₅₀ ± SEM, мкМ		p*	#	Заместитель (R)	EC ₅₀ ± SEM, мкМ		p*
		46973	BrCr				46973	BrCr	
Природные цитокининовые нуклеозиды									
3b		3,6 ± 0,9	2,12 ± 0,18	0,205	3c		n/a**	10,4 ± 2,6	0,003***
Производные с алифатическими заместителями									
4a	Me	n/a	n/a	–****	4g		7,2 ± 1,6	6,2 ± 1,6	0,738
4b	OMe	n/a	n/a	–	4h		5,6 ± 1,3	4,9 ± 1,6	0,790

#	Заместитель (R)	EC ₅₀ ± SEM, мкМ		p*	#	Заместитель (R)	EC ₅₀ ± SEM, мкМ		p*
		46973	BrCr				46973	BrCr	
Однозамещённые производные									
5a		1,50 ± 0,13	1,37 ± 0,08	0,556	5j		1,83 ± 0,47	1,41 ± 0,28	0,499
5b		0,60 ± 0,05	0,58 ± 0,21	0,934	5k		0,85 ± 0,08	0,6 ± 0,18	0,294
5c		6,3 ± 1,5	3,1 ± 1,5	0,229	5l		3,2 ± 0,6	1,37 ± 0,35	0,078
5d		1,20 ± 0,29	0,54 ± 0,06	0,112	5m		1,99 ± 0,59	1,55 ± 0,35	0,567
5e		2,02 ± 0,18	1,91 ± 0,42	0,825	5n		1,44 ± 0,53	1,06 ± 0,12	0,535
5f		n/a	n/a		5o		1,43 ± 0,52	1,01 ± 0,18	0,50084
5g		4,7 ± 0,7	2,91 ± 0,47	0,123	5p		n/a	32 ± 13	0,025
5h		1,18 ± 0,36	1,0 ± 0,30	0,727	5q		0,45 ± 0,19	0,43 ± 0,15	0,939
5i		9,7 ± 3,7	2,63 ± 0,53	0,155	5r		74 ± 21	6,6 ± 1,1	0,049
Двухзамещённые производные									
6c		0,66 ± 0,11	0,34 ± 0,14	0,229	6f		22 ± 4	2,52 ± 0,28	0,030
6d		n/a	n/a	–	6g		0,43 ± 0,04	0,81 ± 0,05	0,009
6e		n/a	n/a	–	6h		29 ± 2	2,52 ± 0,21	0,001
Тризамещённые производные									
7a		n/a	n/a	–	7b		n/a	n/a	–
Производные с большими боковыми заместителями									
8a		n/a	n/a	–	8c		14 ± 4	n/a	0,004

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

Активность (EC₅₀, мкМ) 0,00N 0,0N 0,N 1-10 11-20 21-100 >100

*p 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

**** – p не рассчитывали

При этом различия между значениями EC₅₀ были незначимы. Однако, активности нескольких соединений сильно различались между штаммами. Однозамещённые производные с заместителем CF₃ (**5p** и **5r**) или двухзамещённые производные (**6f** и **6h**)

обладали большей противовирусной активностью в отношении шт. BrCr. Соединение **3c** было активно только против шт. BrCr, а **8c** – против шт. 46973. Различия, скорее всего, связаны с индивидуальными аминокислотными мутациями. Длительная эволюция активно циркулирующих в человеческой популяции энтеровирусов сильно изменила не только капсидную область генома, но и последовательность неструктурных белков, в связи с чем использование актуальных штаммов является обоснованным при оценке противовирусной активности низкомолекулярных соединений.

3.6.1.3. Сравнение противовирусной активности фавипиравира в отношении разных вариантов SARS-CoV-2

Фавипиравир позиционируется как ингибитор РНК-зависимой РНК полимеразы широкого спектра РНК-содержащих вирусов, включая бетакоронавирусы [Nat Commun. 2020;11(1):4682]. Мы провели сравнительное исследование активности субстанции фавипиравира против штаммов трёх вариантов SARS-CoV-2 по методике уменьшения урожая вируса при заражении клеток Vero. Фавипиравир ингибировал репродукцию всех трёх исследованных вариантов вируса. Показатели активности были низкими ($EC_{50} > 300$ мкМ) и статистически достоверно не различались между штаммами (Таблица 13).

Таблица 13 – Активность субстанции фавипиравира против различных штаммов SARS-CoV-2 (по подавлению признаков ЦПД)

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

Основные различия вариантов SARS-CoV-2 относятся к структурной области и последовательности белка S, поэтому, любой из этих штаммов может быть использован для скрининга соединений, предположительно действующих на неструктурные белки. Однако для соединений, взаимодействующих с наиболее изменчивым структурным белком S, имеет смысл выбирать актуальные варианты вируса или проводить дополнительную оценку спектра противовирусной активности для активных соединений.

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

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

Сравнительный эксперимент был проведён для соединений X и №1-3 с разными предполагаемыми механизмами действия, и препаратов молнупиравир (пролекарство ННС) и ННС, действующими на стадии репликации. Использовали стандартную методику фенотипического скрининга по ингибированию ЦПД 2 доз шт. ПИК35: 50 и 200 ТЦД₅₀ (Таблица 14). Соединение X проявило наномолярное значение EC_{50} при 50 ТЦД₅₀, которое достоверно возросло в 35 раз при увеличении дозы вируса в 4 раза. Расхождение значений EC_{50} для соединений №1-3 заметно, но не значимо; для молнупиравира и ННС – EC_{50} почти полностью совпадают. Таким образом, в зависимости от свойств ингибитора даже незначительные колебания дозы вируса могут приводить к статистически значимым различиям значений EC_{50} .

Таблица 14 – Активность тестируемых соединений против репродукции шт. ПИК35 вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero (по ингибированию ЦПД) при разных дозах вируса

Соединение	Предполагаемый механизм действия	EC ₅₀ ±SEM, мкМ		p*
		50 ТЦД ₅₀	200 ТЦД ₅₀	
X	ингибирование 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
ННС	летальный мутагенез	4,10 ± 0,50	6,60 ± 3,10	0,462

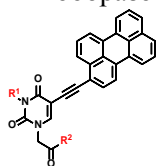
* Тест Стьюдента, количество экспериментов 4

**различия статистически значимы

3.6.2.2. Активность RAFI против 25 и 200 ТЦД₅₀ (25 и 72 БОЕ) ЧИКВ при оценке по подавлению ЦПД и бляшкообразованию в культуре клеток Vero

Сравнение активности против двух доз ЧИКВ проводили для производных периленовых нуклеотидов (RAFI), действующих на стадии проникновения вируса в клетку, в одном эксперименте по подавлению признаков ЦПД и бляшкообразованию. ННС использовали в качестве контрольного препарата (Таблица 15).

Таблица 15 – Активность производных периленовых нуклеотидов на репродукцию ЧИКВ (по подавлению ЦПД и бляшкообразованию) при разной дозе вируса в разных тест-системах



Тест подавления бляшкообразования ЧИКВ					
Шифр	R ¹	R ²	25 БОЕ, EC ₅₀ ± SEM, мкМ	72 БОЕ, EC ₅₀ ± SEM, мкМ	p*
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	p*
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

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

Активность (EC₅₀, мкМ) 0,00N 0,0N 0,N 1-10 11-20 21-100 >100

* Тест Стьюдента, количество экспериментов 4

** различия статистически значимы

Значения EC₅₀ для RAFI, полученные по подавлению бляшкообразования, были ниже, чем значения, полученные по подавлению ЦПД. При этом для RAFI значения EC₅₀ достоверно различались в экспериментах с разной дозой вируса в обеих тест-системах. Исключением стали значения активности соединения cm6pUY11 в тесте

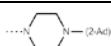
подавления ЦПД, где различие между EC₅₀ составляет 97 раз, однако статистически недостоверно из-за высокого значения ошибки среднего при высокой дозе вируса. Для ННС значения EC₅₀ в тесте подавления ЦПД не различались. Таким образом, увеличение дозы вируса привело к статистически достоверному увеличению значения EC₅₀ для RAFI, действующих при проникновении вируса, но не ННС, действующего на стадии репликации/транскрипции вирусного генома.

3.6.3. Влияние характеристик препарата вируса на результаты фенотипического скрининга по ингибированию репродукции вируса в культуре клеток на примере ВКЭ

Инфекционная вирусная частица – это вирион, способный проникнуть в клетку и произвести продуктивную инфекцию с образованием полноценного инфекционного вирусного потомства. У всех вирусов есть неинфекционные частицы, случайно или специально образующиеся в процессе жизненного цикла вируса: пустые капсиды без геномов, капсиды с неполным геномом, незрелые капсиды с поверхностными белками в неправильной конформации и т.п. – а также копии поверхностных гликопротеинов. В жизненном цикле ВКЭ вирионы могут существовать в различных формах: фузогенной (перед слиянием мембран), незрелой (с нерасщепленными белками prM), частично зрелой и зрелой. Все эти частицы содержат геномы (genome-containing particles, GCP), но различаются конформацией основного поверхностного белка E [Nat Commun. 2018;9(1):436].

При проведении оценки спектра активности производных 4-аминопиримидина, предположительно взаимодействующих с поверхностным белком вириона E, против штаммов Европейского подтипа ВКЭ, Абсеттаров и 256, не различающихся по аминокислотной последовательности белка E, показано, что из всей серии соединений только соединения **7o** и **7y** ингибировали репродукцию шт. 256 (Таблица 16).

Таблица 16 – Противовирусная активность N-оксидов 4-аминопиримидина против штаммов Европейского подтипа ВКЭ при оценке по ингибированию образования бляшек в культуре клеток СПЭВ

Соединение	R1	R2	EC ₅₀ ± SD, мкМ	
			Абсеттаров	256
7a	Me	NHBU	31 ± 5	>50
7c	<i>t</i> -Bu	NHCH ₂ Ph	>50	>50
7o	Me	NH(2-OH-C ₆ H ₄)	8 ± 3	21 ± 2
7t	Et	NH(CH ₂) ₂ (1-Ad)	35 ± 2	>50
7u	<i>t</i> -Bu	NH(CH ₂) ₂ (1-Ad)	6 ± 2	>50
7w	<i>t</i> -Bu	NH(CH ₂) ₂ (2-Ad)	6 ± 3	>50
7x	Me	NHCH(1-Ad)Ph	8 ± 3	>50
7y	<i>t</i> -Bu	NHCH(1-Ad)Ph	4 ± 1	26 ± 2
7ab	<i>t</i> -Bu		23 ± 6	>50

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

Активность (EC₅₀, мкМ) 0,00N 0,0N 0,N 1-10 11-20 21-100 >100

При анализе препаратов вирусов, использованных в экспериментах, было выявлено наличие в препарате шт. 256 большого количества белка E, не ассоциированного с инфекционными вирионами (содержащегося в неинфекционных вирионах, агрегатах и др.) (Рисунок 9), на связывание с которыми, вероятнее всего, и расходуется соединение, что приводит к возрастанию EC₅₀.

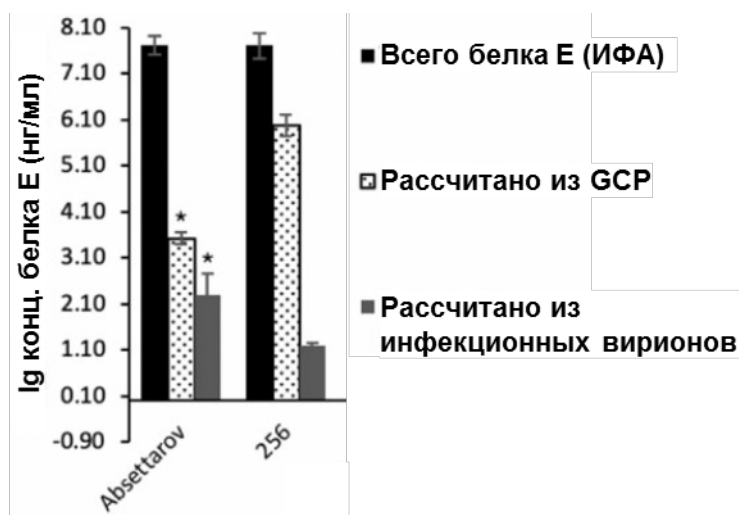
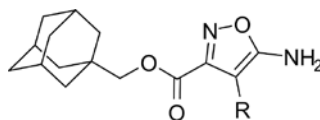


Рисунок 9 – Концентрация белка E в вирусных препаратах: измеренная в ИФА, рассчитанная из количества БОЕ и РНК (ОТ-ПЦР) из расчёта средней молекулярной массы белка E ВКЭ 53 кДа и 180 молекул белка на вирусную частицу. * $p < 0,05$ по сравнению с шт. 256

Для выяснения влияния неинфекционных частиц в результаты фенотипического скрининга по ингибированию репродукции бляшкообразования ВКЭ в культуре клеток СПЭВ были получены препараты зрелых инфекционных вирионов и обогащённые незрелыми неинфекционными вирионами, содержащими геном, и проведена сравнительная оценка противовирусной активности двух адамантилметиловых эфиров 5-аминоизоксазол-3-карбоновой кислоты **4j** и **4o** (Таблица 17). При увеличении доли незрелых неинфекционных частиц ингибирующий эффект резко снижался. Таким образом, соединение расходуется на неинфекционные вирионы, и его активность становится не детектируемой в исследуемом диапазоне концентраций.

Таблица 17 – Полумаксимальная эффективная концентрация соединений **4j** и **4o** для препаратов шт. ЭК-328 ВКЭ с различным содержанием незрелых частиц при одинаковой дозе инфекционного вируса (БОЕ)



R = H (**4j**), CH₂CH₂Ph (**4o**)

Препарат шт. ЭК-328	EC ₅₀ , мкМ	
	4j	4o
зрелые	39,6 ± 0,4	7,0 ± 1,4
зрелые+незрелые	>50	>50
незрелые	>50	>50

3.6.4. Сравнение результатов фенотипического скрининга противовирусной активности в культуре клеток, проведённых разными методами

3.6.4.1. Сравнение результатов фенотипического скрининга активности против ЭВ-А71 в культуре клеток RD с оценкой по ЦПД и метаболической активности клеток, полученных разными лабораториями

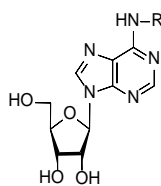
Скрининг противовирусной активности серии производных N⁶-бензиладенозинов против шт. BrCr ЭВ-А71 был проведен параллельно двумя лабораториями: нами и лабораторией вирусологии и химиотерапии, Институт Рега, Лёвен, Бельгия (J. Neyts) – в сходных клеточных тестах (Таблица 18).

Таблица 18 – Параметры тест-систем фенотипического скрининга, различающиеся между Институтом полиомиелита и Институтом Рега (Лёвен, Бельгия)

Характеристика	Институт полиомиелита		Институт Рега
Доза вируса в эксперименте	100 ТЦД ₅₀ (контролируется)		100 ТЦД ₅₀
Время учёта	5 сутки		при наступлении 100% ЦПД в контроле
Метод учёта	Визуально	Резазурин	МТТ
Расчет ЕС ₅₀	Метод Кербера	Аппроксимация	Аппроксимация

Значения активности (Таблица 19) в основном согласуются между двумя лабораториями, при этом большинство неактивных соединений неизменно неактивны. Однако 7 соединений не были активны в нашем тесте, но были активны в тесте Института Рега, при этом значения ЕС₅₀ 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. Значения ЕС₅₀ для 15 из 38 соединений достоверно отличались между лабораториями.

Таблица 19 – Цитотоксичность и активность производных N⁶-бензиладенозина отношении ЭВ-А71 (приведены только соединения со статистически значимо различающимися ЕС₅₀)



#	Заместитель (R)	ЕС 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
Производные с алифатическими заместителями					
4n		n/a***	ND	40,5 ± 0,4 ^d	0,009
Однозамещённые производные					
5f		n/a	ND	7,1 ± 0,3 ^d	0,003
5g		2,91 ± 0,67	ND	0,49 ± 0,02 ^d	0,037
5j		1,41 ± 0,4	1,15	0,09 ^d	0,049
5n		1,06 ± 0,17	1,15	0,24 ± 0,06 ^c	0,020

#	Заместитель (R)	EC ₅₀ ± SEM, мкМ			P (тест Стьюдента)*
		Институт полиомиелита		Институт Рега	
		По ЦПД	По метаболизму клеток		
		BrCr	BrCr	BrCr	
5o		1,01 ± 0,25	ND	0,14 ± 0,04 ^c	0,041
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
6f		2,52 ± 0,4	1,15	0,286 ^d	0,020
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
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

Графы окрашены пропорционально значению EC₅₀ для соединений:

Активность (EC₅₀, мкМ) 0,00N 0,0N 0,N 1-10 11-20 21-100 >100

* Для расчёта p: n/a считали как 100 ± 10; количество экспериментов – 3 для обеих групп

**ND – не исследовали

***n/a – неактивны в нетоксичных концентрациях

a – Eur J Med Chem. 2016;111:84-94; b – [Eur J Med Chem. 2015;90:406-13];

c – [Molecules. 2017;22(7):1219]; d – неопубликованные данные совместного исследования

Значения pEC₅₀ у Института Рега, как правило, на порядок выше (Рисунок 10). 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). Однако, это не объясняет микромолярную и субмикромолярную активность у Института Рега соединений, неактивных в наших экспериментах. Таким образом, возможно несовпадение результатов, полученных разными лабораториями в очень сходных клеточных тестах. Литературные данные требуют внимательного рассмотрения при сравнительном анализе и построении количественных и классификационных моделей.

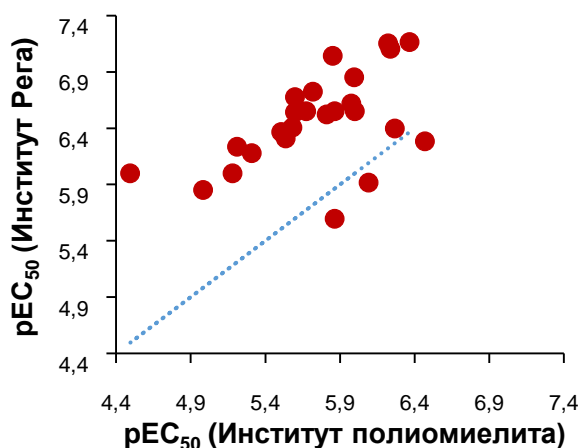


Рисунок 10 – Корреляция значений pEC_{50} против ЭВ-А71 для соединений, идентифицированных как активные против обоих штаммов

3.6.4.2. 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 и ЧИКВ в реакции подавления бляшкообразования, против ЧИКВ и SARS-CoV-2 – в реакции подавления ЦПД. Обобщённые результаты представлены в виде pEC_{50} (Рисунок 11).

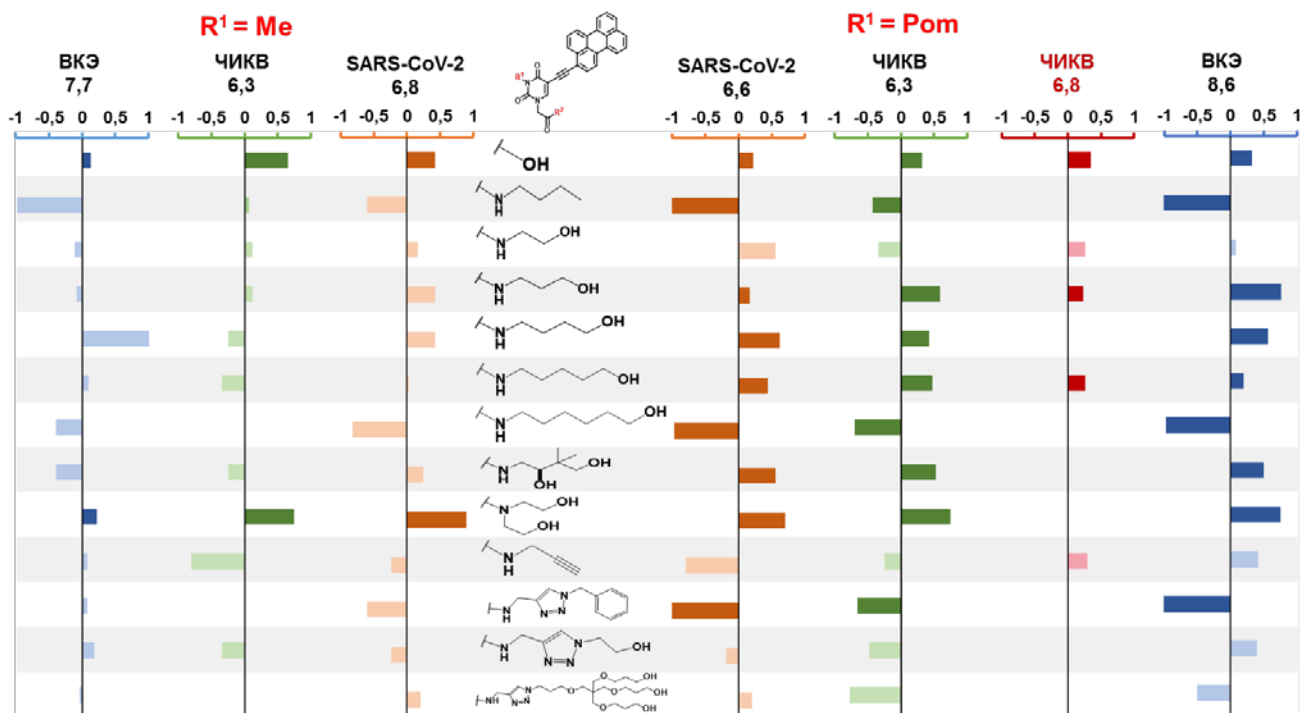


Рисунок 11 – Активность (pEC_{50}) производных периленовых нуклеозидов против ВКЭ (подавление бляшек), ЧИКВ (подавление ЦПД и бляшек – выделено красным) и SARS-CoV-2 (подавление ЦПД). Каждая вертикальная ось соответствует средней противовирусной активности в ряду N^1 -заместителей, среднее значение pEC_{50} , показано над осью. Каждый столбец представляет собой отличие активности от среднего значения в зависимости от N^1 -заместителя. Каждая строка соответствует одному N^1 -заместителю, слева данные для ряда N^3 -Me, справа для ряда N^3 -Pom. Значения со сходными тенденциями показаны темным оттенком цвета [адаптировано из Antiviral Res. 2023;209:105508].

Повышение или снижение активности соединения в зависимости от N¹-заместителя коррелирует между вирусами, что особенно выражено в ряду с N³-Pom заместителем. Значения EC₅₀ для ВКЭ, определённые по подавлению образования бляшек, на 2 порядка ниже, чем таковые для ЧИКВ и SARS-CoV-2, определённые по подавлению ЦПД. Однако значения pEC₅₀, полученные по подавлению бляшкообразования ЧИКВ, ниже по сравнению со значениями pEC₅₀, полученными по подавлению ЦПД, на 0,5 порядка. Таким образом, различие значений EC₅₀ между вирусами скорее связано с особенностями методики подавления бляшкообразования, чем с большей чувствительностью ВКЭ к данным соединениям.

3.7. Разработка схемы поиска противовирусных лекарственных препаратов с использованием фенотипических тестов

Разработанные методы позволяют проводить различные варианты фенотипической оценки противовирусной активности соединений против вирусов родов *Orthoflavivirus* (ВКЭ, ПОВ, ВОГЛ), *Enterovirus* (ЭВ-А, ЭВ-В, ЭВ-С), *Betacoronavirus* (SARS-CoV-2), *Alphavirus* (ЧИКВ) и *Lentivirus* (ВИЧ-1). Комбинируя методики, можно не только проводить скрининг библиотеки химических соединений *in vitro* и выявлять соединения-хиты с противовирусной активностью, но и проводить исследования механизма их действия и поиск возможных мишеней (Рисунок 12).



Рисунок 12 – Схема оценки противовирусной активности на основе различных фенотипических методов

Для проведения фенотипического скрининга наиболее подходят методики определения 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 выбранного метода фенотипического скрининга за одну постановку можно достаточно легко скринировать от 300 до 2500 соединений даже без применения роботизированных технологий.

После выбора активных соединений (их обычно несколько десятков) необходимо провести определение полумаксимальной эффективной концентрации EC_{50} . 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 значения цитотоксичности (CC_{50}). С использованием значений EC_{50} и CC_{50} рассчитывается значение индекса селективности SI. И именно это значение станет критерием перспективности соединения. SI должен быть как можно больше, что будет говорить о значительных различиях между активностью и токсичностью соединения. Соединения с SI менее и равным 2 считаются неперспективными ввиду высокой токсичности; SI не менее 8 считается перспективным для исследований на животных [Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств по ред.: Миронова А.Н. Часть 1. Москва: Гриф и К, 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 определению стадии вирусного репликативного цикла, являющейся мишенью ингибитора. Ввиду трудоёмкости этих экспериментов количество соединений необходимо по возможности сократить. Однако в случае, если соединения-лидеры относятся к нескольким химическим классам, требуется проведение таких экспериментов хотя бы для одного соединения из каждой серии, поскольку выбранные соединения могут действовать по разным механизмам. Такие исследования также можно проводить с использованием фенотипических методик, наиболее подходят метод ингибирования бляшкообразования (или фокусообразования) для моделирования влияния на первые стадии и метод снижения урожая вируса (инфекционного, РНК, белки) для моделирования влияния на внутриклеточные стадии вирусного цикла.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка методологии проведения фенотипической оценки противовирусной активности соединений обычно широко не проводится ввиду интуитивной простоты моделирования вирусной инфекции в клеточных тестах, в отличие от моделирования соматических заболеваний. При этом детали методик, влияние отдельных параметров фенотипических тестов и их выбор редко становятся темой для исследования.

В настоящей работе были разработаны методики различных вариантов фенотипической оценки противовирусной активности соединений (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*). Для проведения экспериментов использовались сходные подходы, позволившие добиться достаточно точного определения активности и сравнительно высокой производительности методик без использования роботизированных систем. Более того, разработанные методики могут стать основой для автоматизированных систем высокопроизводительного скрининга.

В диссертационной работе собраны данные, подтверждающие применимость разработанных методик фенотипической оценки для определения противовирусной активности соединений различных химических классов, а также сложных смесей природного происхождения.

Применение разработанных методик фенотипического скрининга позволило получить новые данные об активности известных ингибиторов широкого спектра действия против SARS-CoV-2, энтеровирусов видов А, В, С и переносимых клещами ортофлавивирусов, а также соединений ранее не исследовавшихся химических классов против представителей родов *Orthoflavivirus*, *Enterovirus*, *Betacoronavirus*, *Alphavirus* и *Lentivirus* с выявлением «первых в своём классе» ингибиторов.

На примере разработанных методик продемонстрирована важность проведения апробации метода фенотипической оценки противовирусной активности, определения условий применимости выбранной методики и контроля параметров тест-системы при проведении экспериментов.

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 заболеваний, вызванных РНК-содержащими вирусами.

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 сочтанной циркуляции различных вариантов вируса, схема оценки противовирусной активности должна включать оценку её спектра;
- 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 сравнения результатов 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 этого соотношения для вирусных препаратов, используемых для скрининга;
- при определении цитотоксичности исследуемых соединений стоит учитывать, что цитотоксичность рассматривается не сама по себе, а как характеристика для оценки перспективности соединения для дальнейшей разработки. Поэтому важно определять цитотоксичность соединений в той же тест-системе, что и противовирусную активность.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Естественным продолжением работы является дальнейшая разработка тест-систем фенотипической оценки активности соединений против других вирусов, ассоциированных с социально значимыми заболеваниями, с целью поиска средств терапии для актуальных проблем здравоохранения и подготовки к вспышкам новых инфекций. А также продолжение проведения фенотипического скрининга 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 оставаться 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 предложенного подхода.

В диссертационной работе проведено сравнение методов фенотипической оценки противовирусной активности, основанных на литическом действии вируса, с различными вариантами детекции вирус-индуцированной гибели клеток. Несомненно, интересным является сравнение таких тест-систем с методиками, оценивающими ингибирование репродукции вируса по другим параметрам: детекция вирусных геномов, различных вирусных белков и др. – в одной линии клеток и в разных, например, таких, где вирус способен и не способен вызывать гибель клеток.

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 (EC₅₀), полумаксимальную токсическую концентрацию (CC₅₀) 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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. – Т. 17. – №24 – С. 12-17. doi: 10.33978/2307-3586-2021-17-24-12-17.
2. Игнатъев Г.М., **Козловская Л.И.**, Мефед К.М., Волок В.П., Белялетдинова 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. – Т. 11. – №1. – С. 21–27. doi: 10.33029/2305-3496-2022-11-1-21-27.
3. Aralov A.V., Proskurin G.B., Orlov A.A., **Kozlovskaya L.I.**, Chistov A.A., Kutuyakov S.V., Karganova G.G., Palyulin V.A., Osolodkin D.I., Korshun V.A. Perylenyltriazoles inhibit reproduction of enveloped viruses. // Eur J Med Chem. – 2017. – Vol. 138. – P. 293e299. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.06.014.
4. Astrakhantseva I.V., Ershova A.E., Chuvpilo S.A., Kruglova N.A., Ishmukhametov A.A., Drutskaya M.S., **Kozlovskaya L.I.**, Nedospasov S.A. SARS-CoV-2 binding and neutralization properties of peptides derived from N-terminus of human ACE2. // Int J Mol Sci. – 2023. – Vol. 24. – Is.9. – P. 8269. doi: 10.3390/ijms24098269.
5. Bibilashvili R.S., Sidorova M.V., Dudkina U.S., Palkeeva M.E., Molokoedov A.S., **Kozlovskaya L.I.**, Egorov A.M., Ishmukhametov A.A., Parfyonova E.V. 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. – Vol. 15. – Is. 4. – P. 274-280. doi: 10.1134/S199075082104003X.
6. Bychenko O.S., Khrulev A.A., Svetlova J.I., Tsvetkov V.B., Kamzeeva P.N., Skvortsova Y.V., Tupertsev B.S., Ivanov I.A., Aseev L.V., Khodarovich Y.M., Belyaev E.S., **Kozlovskaya L.I.**, Zatsepin T.S., Azhikina T.L., Varizhuk A.M., Aralov A.V. Red light-emitting short Mango-based system enables tracking a mycobacterial small noncoding RNA in infected macrophages. // Nucleic Acids Res. – 2023.– Vol. 25.–P. gkad100. doi: 10.1093/nar/gkad100.
7. Chistov A.A., Chumakov S.P., Mikhnovets I.E., Nikitin T.D., Slesarchuk N.A., Uvarova V.I., Rubekina A.A., Nikolaeva Y.V., Radchenko E.V., Khvatov E.V., Orlov A.A., Frolenko V.S., Sukhorukov M.V., Kolpakova E.S., Shustova E.Y., Galochkina A.V., Streshnev P.P., Osipov E.M., Sapozhnikova K.A., Moiseenko A.V., Brylev V.A., Proskurin G.V., Dokukin Y.S., Kutuyakov S.V., Aralov A.V., Korshun V.A., Strelkov S.V., Palyulin V.A., Ishmukhametov A.A., Shirshin E.A., Osolodkin D.I., Shtro A.A., **Kozlovskaya L.I.**, Alferova V.A., Ustinov A.V. 5-(Perylen-3-ylethynyl)uracil as an antiviral scaffold: Potent suppression of enveloped virus reproduction by 3-methyl derivatives in vitro. // Antiviral Res. – 2023.– Vol. 209.– P. 105508. doi: 10.1016/j.antiviral.2022.105508.
8. Chistov A.A., Orlov A.A., Streshnev P.P., Slesarchuk N.A., Aparin I.O., Rathi B., Brylev V.A., Kutuyakov S.V., Mikhura I.V., Ustinov A.V., Westman G., Palyulin V.A., Jain N., Osolodkin D.I., **Kozlovskaya L.I.**, Korshun V.A. 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.– Vol. 171.– P. 93-103. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.03.029.
9. Dueva E.V., Tuchynskaya K.K., **Kozlovskaya L.I.**, Osolodkin D.I., Sedenkova K.N., Averina E.B., Palyulin V.A., Karganova G.G. Spectrum of antiviral activity of 4-aminopyrimidine N-oxides against a broad panel of tick-borne encephalitis virus strains. // Antivir Chem Chemother. – 2020.– Vol. 28.– P. 2040206620943462. doi: 10.1177/2040206620943462.
10. **Kozlovskaya L.**, Pinaeva 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.– Vol. 99.– P. 40-46. doi: 10.1016/j.ijid.2020.12.020.
11. **Kozlovskaya L.I.**, Andrei G., Orlov A.A., Khvatov E.V., Koruchekov A.A., Belyaev E.S., Nikolaev E.N., Korshun V.A., Snoeck R., Osolodkin D.I., Matyugina E.S., Aralov A.V. Antiviral activity spectrum of phenoxazine nucleoside derivatives. // *Antiviral Res.* – 2019.– Vol. 163.– P. 117-124. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.01.010.
 12. **Kozlovskaya L.I.**, Golinets A.D., Eletskaia A.A., Orlov A.A., Palyulin A.V., Kochetkov S.N., Alexandrova L.A., Osolodkin D.I. Selective inhibition of Enterovirus A species members' reproduction by furano[2, 3-d]pyrimidine nucleosides revealed by antiviral activity profiling against (+)ssRNA viruses. // *ChemistrySelect* – 2018.– Vol. 3.– P. 2321-2325. doi: 10.1002/slct.201703052.
 13. **Kozlovskaya L.I.**, Pinaeva A.N., Ignatyev G.M., Gordeychuk I.V., Volok V.P., Rogova Y.V., Shishova A.A., Kovpak A.A., Ivin Y.Y., Antonova L.P., Mefyod K.M., Prokosheva L.S., Sibirskina A.S., Tarasova Y.Y., Bayurova E.O., Gancharova O.S., Illarionova V.V., Glukhov G.S., Sokolova O.S., Shaitan K.V., Moysenovich A.M., Gulyaev S.A., Gulyaeva T.V., Moroz A.V., Gmyl L.V., Ipatova E.G., Kirpichnikov M.P., Egorov A.M., Siniugina A.A., Ishmukhametov A.A. Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in preclinical studies. // *Emerg Microbes Infect.* 2021.– Vol. 10.– Is. 1.– P. 1790-1806. doi: 10.1080/22221751.2021.1971569.
 14. **Kozlovskaya L.I.**, Volok V.P., Shtro A.A., Nikolaeva Y.V., Chistov A.A., Matyugina E.S., Belyaev E.S., Jegorov A.V., Snoeck R., Korshun V.A., Andrei G., Osolodkin D.I., Ishmukhametov A.A., Aralov A.V. Phenoxazine nucleoside derivatives with a multiple activity against RNA and DNA viruses. // *Eur J Med Chem.* – 2021.– Vol. 220.– P. 113467. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113467.
 15. Krut' V.G., Chuvpilo S.A., Astrakhantseva I.V., **Kozlovskaya L.I.**, Efimov G.A., Kruglov A.A., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A. Will peptides help to stop COVID-19? // *Biochemistry (Moscow).* – 2022.– Vol. 87.– Is. 7.– P. 590–604. doi: 10.1134/S0006297922070021.
 16. Maslova A.A., Matyugina E.C., Shustova E.Y., Volok V.P., **Kozlovskaya L.I.**, Kochetkov S.N., Khandazhinskaya A.L. New analogues of uridine as possible anti-viral agents specific to SARS-CoV-2. // *Mol Biol.* – 2022.– Vol. 56.– Is. 3.– P. 469-473. doi: 10.1134/S0026893322030098.
 17. Matyugina E.S., Novikov M.S., **Kozlovskaya L.I.**, Volok V.P., Shustova E.Y., Ishmukhametov A.A., Kochetkov S.N., Khandazhinskaya A.L. Evaluation of the antiviral potential of modified heterocyclic base and 5'-norcarbocyclic nucleoside analogs against SARS-CoV-2. // *Acta Naturae.* – 2021.– Vol. 13.– Is. 4.– P. 78-81. doi: 10.32607/actanaturae.11479.
 18. Orlov A.A., Chistov A.A., **Kozlovskaya L.I.**, Ustinov A.V., Korshun V.A., Karganova G.G., Osolodkin D.I. Rigid amphipathic nucleosides suppress reproduction of tick-borne encephalitis virus. // *Med Chem Comm.* – 2016.– Vol. 7.– P. 495-499. doi: 10.1039/C5MD00538H.
 19. Orlov A.A., Drenichev M.S., Oslovsky V.E., Kurochkin N.N., Solyev P.N., **Kozlovskaya L.I.**, Palyulin V.A., Karganova G.G., Mikhailov S.N., Osolodkin D.I. New tools in nucleoside toolbox of tick-borne encephalitis virus reproduction inhibitors. // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2017.– Vol. 27.– Is. 5.– P. 1267-1273. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.01.040.
 20. Orlov A.A., Eletskaia A.A., Frolov K.A., Golinets A.D., Palyulin V.A., Krivokolysko S.G., **Kozlovskaya L.I.**, Dotsenko V.V., Osolodkin D.I. Probing chemical space of tick-borne encephalitis virus reproduction inhibitors with organoselenium compounds. // *Arch Pharm (Weinheim).* – 2018.– Vol. 351.– Is. 6.– P. e1700353. doi: 10.1002/ardp.201700353.
 21. Osolodkin D.I., **Kozlovskaya L.I.**, Dueva E.V., Dotsenko V.V., Rogova Y.V., Frolov K.A., Krivokolysko S.G., Romanova E.G., Morozov A.S., Karganova G.G., Palyulin V.A., Pentkovski V.M., Zefirov N.S. Inhibitors of tick-borne flavivirus reproduction from structure-based virtual screening. // *ACS Med Chem Lett.* – 2013.– Vol. 4.– P. 869-874. doi: 10.1021/ml400226s.
 22. Proskurin G.V., Orlov A.A., Brylev V.A., **Kozlovskaya L.I.**, Chistov A.A., Karganova G.G., Palyulin V.A., Osolodkin D.I., Korshun V.A., Aralov A.V. 3'-O-Substituted 5-(perylene-3-

- ylethynyl)-2'-deoxyuridines as tick-borne encephalitis virus reproduction inhibitors. // *Eur J Med Chem.* – 2018.– Vol. 155.– P. 77-83. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.05.040.
23. Rubekina A.A., Kamzeeva P.N., Alferova V.A., Shustova E.Y., Kolpakova E.S., Yakovchuk E.V., Karpova E.V., Borodulina M.O., Belyaev E.S., Khrulev A.A., Korshun V.A., Shirshin E.A., **Kozlovskaya L.I.**, Aralov A.V. Hydrophobic Rose Bengal derivatives exhibit submicromolar-to-subnanomolar activity against enveloped viruses. // *Biomolecules* – 2022. – Vol. 12.– Is. 11.– P. 1609. doi: 10.3390/biom12111609.
24. Ryazantsev D.Y., Myshkin M.Y., Alferova V.A., Tsvetkov V.B., Shustova E.Y., Kamzeeva P.N., Kovalets P.V., Zaitseva E.R., Baleeva N.S., Zatsepin T.S., Shenkarev Z.O., Baranov M.S., **Kozlovskaya L.I.**, Aralov A.V. Probing GFP chromophore analogs as anti-HIV agents targeting LTR-III G-quadruplex. // *Biomolecules.* – 2021.– Vol. 11.– Is. 10.– P.1409. doi: 10.3390/biom11101409.
25. Sapozhnikova K.A., Slesarchuk N.A., Orlov A.A., Khvatov E.V., Radchenko E.V., Chistov A.A., Ustinov A.V., Palyulin V.A., **Kozlovskaya L.I.**, Osolodkin D.I., Korshun V.A., Brylev V.A. Ramified derivatives of 5-(perylene-3-ylethynyl)uracil-1-acetic acid and their antiviral properties. // *RSC Advances.* – 2019.– Vol. 9.– P. 26014-26023. doi: 10.1039/c9ra06313g.
26. Sedenkova K.N., Dueva E.V., Averina E.B., Grishin Y.K., Osolodkin D.I., **Kozlovskaya L.I.**, Palyulin V.A., Savelyev E.N., Orlinson B.S., Novakov I.A., Butov G.M., Kuznetsova T.S., Karganova G.G., Zefirov N.S. Synthesis and assessment of 4-aminotetrahydroquinazoline derivatives as tick-borne encephalitis virus reproduction inhibitors. // *Org Biomol Chem.* – 2015.– Vol. 13.– Is. 11.– P. 3406-3415. doi: 10.1039/c4ob02649g.
27. Shatalov D.O., Kedik S.A., Ivanov I.S., Aydakova A.V., Akhmedova D.A., Minenkov D.S., Beliakov S.V., Herbst A., Greiner L., **Kozlovskaya L.I.**, Volok V.P. 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.– Vol. 26.– Is. 11.– P. 3472. doi: 10.3390/molecules26113472.
28. Shtro A.A., Garshinina A.V., Alferova V.A., Kamzeeva P.N., Volok V.P., Kolpakova E.S., Nikitin T.D., Chistov A.A., Belyaev E.S., Korshun V.A., **Kozlovskaya L.I.**, Aralov A.V. Cationic perylene antivirals with aqueous solubility for studies in vivo. // *Pharmaceuticals (Basel).* – 2022.– Vol. 15.– Is. 10.– P. 1178. doi: 10.3390/ph15101178.
29. Sidorova M.V., Bibilashvili R.S., Avdeev D.V., Kozhokar U.S., Palkeeva M.E., Ovchinnikov M.V., Molokoedov A.S., Shirokov D.A., Semyonova A.V., Uvarova V.I., Kulyaev P.O., Khvatov E.V., Ignatova A.A., Feofanov A.V., Osolodkin D.I., Porozov Y.B., **Kozlovskaya L.I.**, Ishmukhametov A.A., Parfyonova Y.V., Egorov A.M. 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.– Vol. 29.– P. 1–5. doi: 10.1134/S1607672922060126.
30. Slesarchuk N.A., Khvatov E.V., Chistov A.A., Proskurin G.V., Nikitin T.D., Lazarevich A.I., Ulanovskaya A.A., Ulashchik E.A., Orlov A.A., Jegorov A.V., Ustinov A.V., Tyurin A.P., Shmanai V.V., Ishmukhametov A.A., Korshun V.A., Osolodkin D.I., **Kozlovskaya L.I.**, Aralov A.V. Simplistic perylene-related compounds as inhibitors of tick-borne encephalitis virus reproduction. // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2020.– Vol. 30.– Is. 10.– P. 127100. doi: 10.1016/j.bmcl.2020.127100.
31. Svetlova J., Knizhnik E., Manuvera V., Severov V., Shirokov D., Grafaskaia 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.– Vol. 23.– Is. 23.– P. 15281. doi: 10.3390/ijms232315281.
32. Tsvetkov V., Varizhuk A., **Kozlovskaya L.**, Shtro A., Lebedeva O., Komissarov A., Vedekhina T., Manuvera V., Zubkova O., Eremeev 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.– Vol. 191.– P. 27-32. doi: 10.1016/j.biochi.2021.08.003.

33. Tuchynskaya K.K., Fomina A.D., Nikitin N.A., Illarionova V.V., Volok V.P., **Kozlovskaya L.I.**, Rogova A.A., Vasilenko D.A., Averina E.B., Osolodkin D.I., Karganova G.G. Effect of immature tick-borne encephalitis virus particles on antiviral activity of 5-aminoisoxazole-3-carboxylic acid adamantylmethyl esters. // *J Gen Virol.* – 2021.– Vol. 102.– Is. 9. doi: 10.1099/jgv.0.001658.
34. Vasilenko D.A., Dueva E.V., **Kozlovskaya L.I.**, Zefirov N.A., Grishin Y.K., Butov G.M., Palyulin V.A., Kuznetsova T.S., Karganova G.G., Zefirova O.N., Osolodkin D.I., Averina E.B. Tick-borne flavivirus reproduction inhibitors based on isoxazole core linked with adamantane. // *Bioorg Chem.* – 2019.– Vol. 87.– P. 629-637. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.03.028.
35. Zakharova M.Y., Kuznetsova A.A., Uvarova V.I., Fomina A.D., **Kozlovskaya L.I.**, Kaliberda E.N., Kurbatskaia I.N., Smirnov I.V., Bulygin A.A., Knorre V.D., Fedorova O.S., Varnek A., Osolodkin D.I., Ishmukhametov A.A., Egorov A.M., Gabibov A.G., Kuznetsov N.A. Pre-steady-state kinetics of the SARS-CoV-2 main protease as a powerful tool for antiviral drug discovery. // *Front Pharmacol.* – 2021.– Vol. 12.– P. 773198. doi: 10.3389/fphar.2021.773198.
36. Zenchenko A.A., Oslovsky V.E., Varizhuk I.V., Karpova E.V., Osolodkin D.I., **Kozlovskaya L.I.**, Ishmukhametov A.A., Drenichev M.S. Cytotoxicity reduction by O-nicotinylation of antiviral 6-benzylaminopurine ribonucleosides. // *Toxicol In Vitro.* – 2022.– Vol. 82.– P. 105355. doi: 10.1016/j.tiv.2022.105355.
37. Аверина Е.Б., Бутов Г.М., Василенко Д.А., Диева Е.В., Ишмухаметов А.А., Зефирова Н.А., Зефирова О.Н., Карганова Г.Г., **Козловская Л.И.**, Осолодкин Д.И., Палюлин В.А. Замещённые изоксазолы, фармацевтические композиции на их основе, обладающие противовирусной активностью, и способ их применения. Патент РФ на изобретение № 2733945 от 08.10.2020 г.