

На правах рукописи

**ШТРО
Анна Андреевна**

**ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ УСНИНОВОЙ КИСЛОТЫ В
ОТНОШЕНИИ ВИРУСА ГРИППА**

03.02.02 – вирусология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

**Санкт-Петербург
2014**

Работа выполнена в Федеральном Государственном Бюджетном Учреждении «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения Российской Федерации в лаборатории молекулярных основ химиотерапии вирусных инфекций

Научный руководитель:

Киселев Олег Иванович, директор ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ, доктор биологических наук, профессор, академик РАН

Официальные оппоненты:

Дешева Юлия Андреевна, ведущий научный сотрудник отдела вирусологии им. академика А. А. Смородинцева «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» Северо-Западного отделения РАМН, доктор медицинских наук

Ленева Ирина Анатольевна, заведующая отделом химиотерапии вирусных инфекций «Центра по химии лекарственных средств Всероссийского научно-исследовательского химико-фармацевтического института», доктор биологических наук,

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»

Защита диссертации состоится _____ в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.043.01 при ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» МЗ РФ (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17), тел. (812) 499 15 04; e-mail: sovet@influenza.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» МЗ РФ (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17); <http://www.influenza.spb.ru>.

Автореферат разослан « » _____ 2014 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета Д 001.043.01,
кандидат медицинских наук

Суховецкая Вера Федотовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Грипп в настоящее время является одним из самых распространенных заболеваний в мире. Ежегодно он вызывает эпидемии, а время от времени - пандемии, нередко приводя к смертельному исходу. Уникальная способность вирусов гриппа к изменчивости путем мутаций и реассортации генов, сопровождающаяся модификацией биологических свойств вируса – причина неконтролируемого распространения инфекции, а также быстрого приобретения устойчивости к противовирусным препаратам. В связи с этим чрезвычайно актуальны поиск и разработка новых, активных в отношении вируса гриппа, лекарственных средств, а также исследование механизма их действия. Безусловный интерес вызывают препараты комбинированного действия, сочетающие в себе как антибактериальные, так и противовирусные свойства. В частности, объект данного исследования - усниновая кислота, хоть и использовалась изначально в качестве противобактериального средства, также проявляет и активность в отношении ряда вирусов. В случае успешного выявления противогриппозных свойств у усниновой кислоты и/или ее производных открывается перспектива по созданию уникального лекарственного средства, пригодного как в качестве противобактериального, так и противовирусного средства одновременно. Такие лекарственные средства необходимы для лечения осложненного гриппа, который часто сопровождается вторичной бактериальной пневмонией.

Препараты подобного комбинированного действия известны. Например, нитазоксанид, изначально разработанный в качестве противопаразитарного средства в отношении гельминтов (Cavier et al, 1982) и простейших (Blagburn et al, 1998), оказался сначала эффективным противобактериальным средством (Dubreuil et al, 1996), а в дальнейшем – и антивирусным агентом (Ashton et al, 2010). Также известно о противовирусной активности ряда антимикробных пептидов (Murakami et al, 1991).

Степень разработанности темы исследования. В настоящий момент хорошо изучены ингибирующие свойства усниновой кислоты в отношении широкого спектра бактерий и ряда паразитов из числа простейших, однако, противовирусная активность данного соединения исследована крайне слабо, а в отношении вируса гриппа никаких исследований не проводилось. Из производных усниновой кислоты, изученных в настоящей работе, ранее были исследованы только енамины, причем с точки зрения их ранозаживляющих и противоопухолевых (Bruno et al, 2013), (Bazin et al, 2008), а не противовирусных свойств.

Цель исследования - Изучение противовирусного действия производных усниновой кислоты в отношении вируса гриппа.

Задачи исследования

1. Провести первичный скрининг противовирусной активности тестируемых соединений в опытах *in vitro*, выявить среди них наиболее перспективные и определить заместители, повышающие активность.
2. Исследовать протективную активность наиболее активных препаратов на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей.
3. Выявить стадию жизненного цикла вируса гриппа – мишень действия препаратов
4. Оценить активность производных усниновой кислоты как ингибиторов вирусных нейраминидазы и гемагглютинина.
5. Получить устойчивые к производным усниновой кислоты штаммы вируса гриппа и изучить возможные генетические изменения в них, ответственные за резистентность.

Научная новизна работы.

Впервые показано, что производные усниновой кислоты обладают выраженной противовирусной активностью *in vitro*, в отношении ряда штаммов вируса гриппа А.

Сформулированы основные условия противовирусной активности производных усниновой кислоты, зависимость их противовирусной активности от химической структуры.

Впервые показано, что производные усниновой кислоты проявляют слабую ингибирующую активность в отношении нейраминидазы вируса гриппа.

Впервые показано, что производные усниновой кислоты обладают умеренной противовирусной активностью *in vivo* на модели летальной гриппозной пневмонии у мышей.

Впервые установлен сайт связывания производных усниновой кислоты с молекулой вирусной нейраминидазы 1 типа и разработана концепция создания ингибиторов на основе би- и три-циклических соединений.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Показано, что производные усниновой кислоты могут быть аллостерическими ингибиторами нейраминидазы вируса гриппа, при этом не стимулируя отбор устойчивых штаммов. Полученные в ходе работы результаты могут послужить основанием для дальнейшей оптимизации изученных химических структур с целью создания новых противогриппозных препаратов широкого спектра действия.

Методология и методы исследования.

В настоящей работе применялись стандартные вирусологические, молекулярно-биологические, гистологические методы, а также компьютерное моделирование. Более подробно способы проведения экспериментов отражены в разделе «Материалы и методы».

Положения, выносимые на защиту.

1. Производные усниновой кислоты обладают противовирусной активностью *in vitro* в отношении ряда вирусов гриппа А. Наибольшую активность проявляют енаминовые производные, особенно несущие аминокислотные заместители; производные, несущие CF₃-группу; пиразольные производные, а также хальконы и тиазольные производные, несущие метокси-группу.

2. Производные усниновой кислоты проявляют умеренную протективную активность на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей. Наиболее активен препарат 575.

3. Производные усниновой кислоты проявляют наибольшую активность на ранних стадиях жизненного цикла вируса гриппа.

4. Производные усниновой кислоты проявляют ингибирующую активность в отношении нейраминидазы вируса гриппа и способны связываться с вирусной нейраминидазой в положениях 209 и 210 вне каталитического центра молекулы. Ингибирующей активности в отношении гемагглютинина вируса гриппа у производных усниновой кислоты не обнаружено.

5. Пассирование в присутствии нарастающих концентраций препарата 575 не приводит к появлению устойчивых штаммов

Личный вклад автора состоит в самостоятельном планировании и проведении всех лабораторных исследований, анализе и статистической обработке полученных результатов. Автором лично проведен первичный скрининг противовирусной активности препаратов *in vitro*, исследования спектра активности препаратов, опыты *in vivo*, эксперименты по времени добавления, а также компьютерное моделирование взаимодействия препаратов с вирусными белками. **Вклад соавторов** заключается в химическом синтезе производных усниновой кислоты, помощи в проведении выделения вирусной РНК и секвенирования, а также приготовлении гистологических препаратов.

Степень достоверности и апробация материалов диссертации.

Материалы диссертационной работы доложены на конференциях:

1. Научно-практическая конференция «Диагностика и профилактика инфекционных болезней», Новосибирск, 26-28 сентября 2013.

2. 26th International Conference on Antiviral Research (ICAR), San Francisco, CA, May 11-15, 2013.

3. Options VIII for the control of influenza. Cape Town, South Africa, September 5-10, 2013.

4. Fourth ESWI Influenza Conference, Malta, 2011

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 1 патент РФ, 3 статьи, из них 1 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК и 2 – в международных рецензируемых журналах, и 4 тезисов докладов.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 134-х страницах машинописного текста, включая 19 таблиц и 37 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, собственных исследований и обсуждения полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 127 источников на русском и английском языках. Диссертация изложена в соответствии с общими требованиями к оформлению кандидатских и докторских диссертаций, утверждёнными в ГОСТ Р 7.0.11–2011.

Внедрение результатов исследования.

По результатам настоящей работы получен патент № 2464033 от 20.10.2012 «Усниновая кислота и ее окисленное производное в качестве ингибиторов репродукции вируса гриппа».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемые препараты. Соединения класса производных усниновой кислоты были синтезированы в Институте органической химии, г. Новосибирск.

Вирусы и клетки. В работе использовали штаммы вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), A/Aichi/2/68 (H3N2), A/California/7/09(H1N1)pdm09, A/mallard/Pensilvania/10218/84(H5N2), A/Владивосток/2/09 (H1N1), полученные из Музея вирусов гриппа ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ. Клетки MDCK были получены из Музея клеточных культур ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ. Клеточную культуру (10^6 клеток/мл) рассеивали на 96-луночные микропланшеты (Orange Scientific, США) по 0,2 мл в лунку и инкубировали при 37°C при концентрации CO₂ 5% до образования клеточного монослоя на дне планшетов.

Питательные среды. В работе использовали питательную среду Альфа-МЕМ (Биолот, Россия), из нее изготавливали поддерживающую среду с добавлением бычьего сыворотного альбумина (1,3%) (Calbiochem, США) и трипсина 1мкг/мл (Fluka, США). Физиологический раствор готовили по следующей прописи: NaCl (Sigma, Германия) – 8,5 г/л, бидистиллированная вода – 1л.

Исследование токсичности препаратов. Все соединения тестировали на токсичность в отношении клеток в культуре MDCK. Готовили серию двукратных разведений каждого из препаратов от 1000 до 4 мкг/мл на среде МЕМ. Клетки инкубировали в течение 48 часов при 37°C при концентрации CO₂ 5% в присутствии растворенных препаратов, после чего степень деструкции клеточного монослоя оценивали при помощи микротетразолиевого теста (МТТ) (Massa et al, 1983). МТТ-тест основан на восстановлении бесцветной соли тетразолия митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана, количество которого измеряется спектрофотометрически. МТТ тест ставили на 96-луночных плоскодонных планшетах,

содержащих клетки MDCK. Готовили раствор МТТ в физ. растворе (Calbiochem, США) в концентрации 0,5 мкг/мл. Раствор МТТ вносили в предварительно отмытые от среды лунки с клетками в объеме 0,1 мл. После 1 часа контакта МТТ с клетками лунки промывали и заливали 0,1 мл DMSO, после чего оптическую плотность в лунках измеряли на ридере Victor 2 1440 (Perkin Elmer, США) при длине волны 535 нм. На основании полученных данных рассчитывали ЦТД₅₀, то есть дозу препарата в лунке, при которой происходит 50% деструкция клеточного монослоя. Исходя из значения ЦТД₅₀ рассчитывали рабочие концентрации препарата.

Подготовка вируса. Вирусы гриппа культивировали в 10-11 дневных куриных эмбрионах, вводя в аллантаисную полость 1-10 ЭИД₅₀/0,2 мл вирусосодержащей аллантаисной жидкости (ВАЖ) и инкубировали 48 часов при +37°C.

Определение противовирусной активности препаратов. В монослойную культуру клеток MDCK на 96-луночном планшете добавляли двукратные разведения препаратов, начиная с ½ ЦТД₅₀, растворенные в клеточной среде, после чего выдерживали планшеты в СО₂ инкубаторе 1 час при 37°C. Далее клеточную культуру заражали 10-кратными разведениями вируса от 10⁻¹ до 10⁻⁶. В качестве контроля вместо препаратов вносили чистую культуральную среду. Микропланшеты с вирусом и препаратами инкубировали в СО₂ инкубаторе 48 часов при 37°C⁰ (5% СО₂). Инфекционную активность вируса оценивали в реакции гемагглютинации (РГА) с куриными эритроцитами. РГА ставили общепринятым методом в микропланшетах для иммунологических реакций (Медполимер, Россия). В лунки микропланшета для иммунологических реакций добавляли 100 мкл вирусосодержащей среды из соответствующей лунки планшета для клеточных культур, после чего в лунки вносили равное количество 1% суспензии куриных эритроцитов. Реакцию учитывали через 30-40 минут при комнатной температуре. За титр вируса принимали наибольшее разведение вируса, вызвавшее полную агглютинацию эритроцитов. О противовирусной активности препаратов судили по снижению инфекционного титра вируса по сравнению с контролем. На основании полученных результатов рассчитывали ЭД₅₀, то есть дозу препарата, при которой титр вируса снижается вдвое. Основным критерием при изучении специфического противовирусного действия исследуемых соединений считали показатель ХТИ, определявшийся отношением ЦТД₅₀ к ЭД₅₀. Активными считались препараты, ХТИ которых был 10 и выше.

Исследование противовирусной активности препаратов *in vivo* на модели гриппозной пневмонии у белых мышей. Опыты проводили на белых беспородных мышах, полученных из питомника (Рапполово, Россия). Использовали адаптированный к белым мышам вирус A/Aichi/2/68 (H3N2). Пассирование вируса осуществляли по следующей методике: лиофильно высушенный вирус разводили в 2 мл физиологического раствора и вводили интраназально под эфирным наркозом в объеме 50 мкл/мышь. Спустя 3-ое суток зараженных мышей вскрывали, и

из пораженных участков легких приготавливали гомогенат. Для титрования гомогената мышей (5 шт. в группе) заражали интраназально под эфирным наркозом серийными десятикратными разведениями полученного гомогената от 10^{-1} по 10^{-4} в объеме 50 мкл/мышь. Смертность животных учитывалась спустя 2 недели после заражения. На основании полученных результатов рассчитывали 50% летальную дозу вируса LD₅₀ (Reed, Muench, 1938). Мышей заражали дозами LD₅₀ и 10 LD₅₀ в объеме 50 мкл/мышь.

Препараты вводили внутривентриально. Вначале исследовали серию двукратных разведений для определения 50% летальной дозы препарата. Далее препараты вводили в дозе 1/5 LD₅₀ за 1 час до заражения и через 1, 2 и 3 суток после заражения (лечебно-профилактическая схема). Противовирусную активность препаратов учитывали по снижению смертности мышей в опытных образцах (вирус + препарат) по сравнению с контролем (вирус), а также по разнице в снижении веса у животных между контролем и опытом. Дополнительно изучали снижение титра вируса и гистологические изменения в легких под воздействием препаратов. В экспериментах по изучению снижения смертности в каждой группе было по 10 мышей, в экспериментах по изучению гистологических изменений и титра вируса в легких в каждой группе было по 3 мыши.

Определение титра вирусов в легочной ткани. Легкие извлекали из мышей на третий день после заражения, гомогенизировали с помощью прибора TissueLyserII (США). Далее из полученных гомогенатов изготавливали десятикратные разведения и наносили их на культуру клеток MDCK, где инкубировали в течении 48 часов при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Инфекционную активность вируса оценивали в реакции гемагглютинации (РГА) с куриными эритроцитами. РГА ставили общепринятым методом в микропланшетах для иммунологических реакций (Медполимер ТУ 64-2-278-79). В лунки микропланшета для иммунологических реакций добавляли 100 мкл вирусосодержащей среды из соответствующей лунки планшета для клеточных культур, после чего в лунки вносили равное количество 1% суспензии куриных эритроцитов. Реакцию учитывали через 30-40 минут при комнатной температуре. За титр вируса принимали наибольшее разведение вируса, вызвавшее полную агглютинацию эритроцитов

Получение гистологических срезов и проведение гистологической окраски. Для получения гистологических срезов кусочки органов размером не более 1x1x1 см помещали в раствор 10% формалина на фосфатном буфере на 24 часа. Далее образцы промывали в течение ночи в проточной воде, а затем вносили в 50% спирт на сутки. Образцы помещали в 70% спирт на сутки, после чего дважды - в 96% спирт на сутки. Далее образцы дважды помещали на 1 час в хлороформ, после чего на 16 часов - в смесь хлороформа с парафином при температуре 37°C, после чего образцы дважды переносили в парафин на сутки при 56°C. После проводки образцы ткани помещали в жидкий парафин и оставляли на 3 часа при комнатной температуре. Из

полученной массы вырезали блоки, содержащие образцы ткани и готовили из них срезы толщиной 4 мм на микротоме.

Для гистологической окраски стекла с нанесенными срезами последовательно выдерживали в следующих реактивах: ксилол – 5 мин (2 раза), смесь спирт/ксилол (1:1) – 5 мин, 96% спирт – 2 мин (2 раза), 50% спирт – 1 мин, дистиллированная вода – 1 мин, гематоксилин – 3 мин, вода – 3 мин, дистиллированная вода – 15 с, эозин – 15 с, 50% спирт – 1 мин, 96% спирт – 2 мин, 96% спирт – 2 мин, ксилол – 2 мин (2 раза).

На окрашенный срез наносили каплю канадского бальзама, растворенного в ксилоле. Сверху накладывали покровное стекло, контролируя равномерность распределения бальзама при помощи препаровальной иглы. Заключенные срезы выдерживали в течение 24 часов при 20°C и исследовали под световым микроскопом.

Изучение стадии вирусной репродукции – мишени действия усниновой кислоты.

Эксперимент проводили на клеточной культуре MDCK. Для этого препарат добавляли в различное время до, после или одновременно с внесением вируса. Время внесения препарата отсчитывали от точки 0 – времени входа вируса в клетку. В период (-1) – 0 клетки вместе с вирусом находились при температуре +4 °С. Все остальное время эксперимент проходил при температуре 37°C. Вирус добавляли к клеткам во время, условно обозначаемое как точка -1, после чего в течение часа клетки находились при температуре +5. Далее, в точке 0, вирус отмывали, а клетки переносили в термостат на 37°C, где он находился в течение 10 часов. После окончания эксперимента клетки соскабливали и из полученной суспензии делали серию десятикратных разведений, которые наносили на свежую культуру клеток и инкубировали 48 часов. Результаты эксперимента учитывали с помощью реакции гемагглютинации, описанной выше. Препарат добавляли в следующие сроки относительно добавления вируса: точка -2 - препарат внесен за час до вируса, точка -1 - одновременно, точка 0 - в момент температур, точка 2 - через два часа после смены температур, точка 4 - через 4 часа после смены температур.

Изучение вирулицидного действия препаратов. Данный эксперимент проводили в бесклеточной системе, для чего препараты инкубировали в течение часа с вирусом гриппа A/California/7/09, после чего оценивали титр вируса как описано выше.

Изучение воздействия препаратов на гемагглютинин вируса гриппа. Метод адаптирован из протокола Maeda and Ohnishi (1980) и основан на том, что при кислом рН происходит активация гемагглютинина, что индуцирует слияние вирусной и эритроцитарной мембран, разрушение эритроцита и высвобождение гемоглобина, которое измеряется спектрофотометрически. Для постановки теста использовали 96-луночный планшет с U-образным дном лунок. В каждую лунку добавляли по 50 мкл препарата и вируса A/PR/8/34 и инкубировали в течение 60 минут при +37°C. Доза препарата составила $\frac{1}{2}$ ЦТД₅₀. В качестве контроля вместо вирусов

использовали физиологический раствор. После инкубации добавляли 100 мкл 1% суспензии куриных эритроцитов и инкубировали 60 минут при +4°C. Затем 150 мкл жидкости аккуратно удаляли, не задевая осевших эритроцитов, добавляли сверху 150 мкл MES-буфера (32.5mM MES, Sigma №076K54241, 4mM CaCl₂ pH=5,0) и инкубировали в течение 1,5 часов при +37°C. Затем сверху аккуратно отбирали 100 мкл жидкости и переносили в планшет для измерения оптической плотности (ОП). О степени гемолиза судили судили по величине ОП при длине волны 405. Препарат считался активным в отношении вирусного гемагглютинаина в том случае, если значение ОП было ниже чем в контроле в два раза и более.

Определение ингибирования активности нейраминидазы флюоресцентным методом. В опыте использовали следующие реактивы: Ферментный буфер: 32.5mM MES, pH 6.0 (Sigma, США) 4mM CaCl₂; Раствор субстрата: Ферментный буфер + 0.2mM MUNANA (Sigma, США); Стоп-раствор: 25% Ethanol, 0.1M Glycine, pH 10. (Sigma, США). Для опыта использовали планшеты Costar (США) черного цвета. Готовили 20% вирусные разведения в ферментном буфере. Затем готовили 10 трехкратных разведений исследуемого препарата в MES. Далее добавляли 25 мкл каждого разведения в соответствующую лунку. В качестве положительного контроля использовали лунки, в которые вместо препаратов вносили ферментный буфер. Инкубировали при 37°C примерно 30 минут. По прошествии этого времени добавляли 50 мкл раствора субстрата в каждую лунку. Далее инкубировали при комнатной температуре 30 минут. Далее добавляли по 150 мкл стоп-раствора в каждую лунку и немедленно проводили измерения прибором Victor 2 при помощи флюоресцентного протокола. ЕД₅₀ высчитывалась с помощью функции линейной регрессии в программе Microsoft Excel для Windows.

Компьютерное моделирование взаимодействия препаратов с нейраминидазой. Для оценки возможного сайта связывания производных усниновой кислоты с нейраминидазой проводили компьютерное моделирование взаимодействия нейраминидазы с лигандом с помощью программы Hex 8.0.0. с использованием молекул NA вируса гриппа A/California/07/09, доступных в онлайн базе данных Protein Data Bank.

Получение устойчивых к препаратам штаммов вируса гриппа. Для получения устойчивых штаммов вирус A/PR/8/31 (H1N1) культивировали в клеточной культуре MDCK на 24-луночном планшете в присутствии нарастающих концентраций препаратов, начиная с концентрации равной 1ЭД₅₀. Каждый следующий пассаж концентрацию вещества увеличивали вдвое до тех пор, пока конечная концентрация не достигала 1/2 ЦТД₅₀. Всего провели 13 последовательных пассажей. По снижению противовирусного эффекта у препаратов в отношении пассированных вирусов по сравнению с исходными (контрольными) судили о приобретении ими резистентности.

Молекулярно-биологические методы. *Выделение РНК.* Выделение вирусной РНК производилось с помощью набора QIAGEN Rneasy Total™ RNA Isolation Kit в соответствии с инструкцией производителя. Для предотвращения попадания РНКаз из внешних источников рабочую поверхность обрабатывали с помощью RNase Zap (Ambion).

Обратная транскрипция (ОТ). Обратную транскрипцию и амплификацию полного генома вирусов проводили согласно протоколу ВОЗ. Использовали набор для ОТ-ПЦР SuperScript III One-Step RT-PCR System (Invitrogen, США). Обратная транскрипция проводилась в течение 45 мин при 48 °С. Программа амплификации: 94 °С – 2 мин, 94 °С – 20 с, 50 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин (30 циклов), 72 °С – 7 мин. Для амплификации использовали термоциклер C1000 (BioRad, США).

Анализ продуктов амплификации фрагментов генома вирусов гриппа проводили геле-электрофорезом в 2%-ном агарозном геле в течение 60 мин при разности потенциалов 100 В и силе тока 70 мА. Рабочий буфер TBE с добавлением бромида этидия. В качестве маркера молекулярной массы использовался GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва). Детекция проводилась визуально в УФ свете ($\lambda=250$ нм). Фотосъемка осуществлялась системой для документации Kodak ImageStation 2000 (Kodak, США).

ДНК из агарозного геля выделяли коммерческим набором QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия). Концентрацию ДНК после выделения из агарозного геля определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo, США).

Секвенирование проводили методом Сэнгера с использованием коммерчески доступного набора реагентов ABI BigDye Terminator v3.1 Kit (Applied Biosystems, США). Удлинение цепи осуществлялось Taq-полимеразой AmpliTaq FS, терминировалось флуоресцентно-мечеными дидезоксинуклеотидами (BigDye терминаторами). Продукты реакции секвенирования очищали с помощью набора BigDye XTerminator Kit (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя.

Секвенирование проводили на приборе ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора «BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit». Сборка секвенированных последовательностей (assemble), их обработка и хранение осуществлялись в программном пакете Vector NTI 10 Advance (Invitrogen, США).

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью параметрического теста Стьюдента для выборок с нормальным распределением, или непараметрических критериев Уилкоксона-Манна-Уитни с использованием программного обеспечения MS Office Excel 2007 и Statistica 6.0.

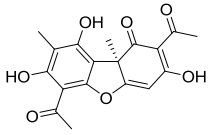
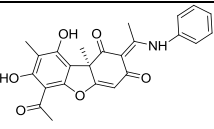
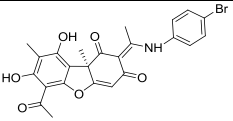
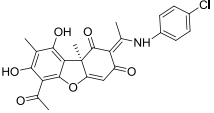
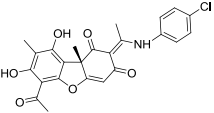
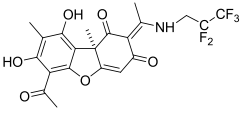
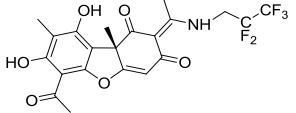
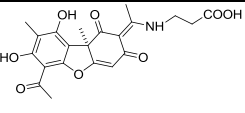
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

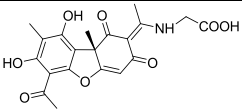
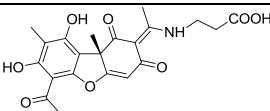
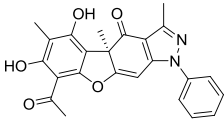
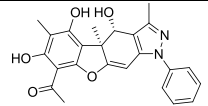
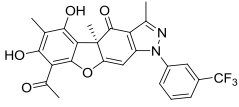
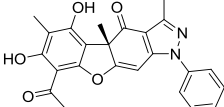
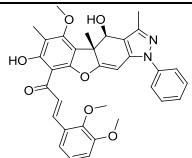
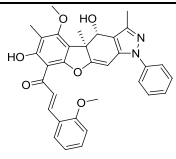
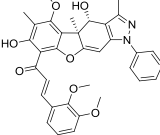
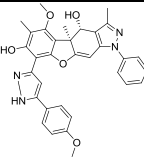
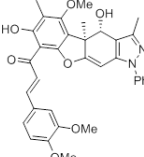
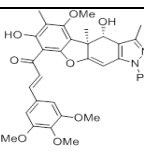
Первичный скрининг препаратов.

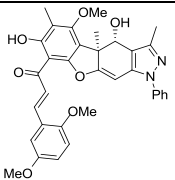
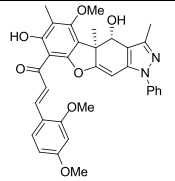
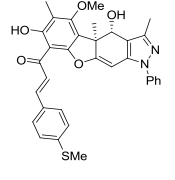
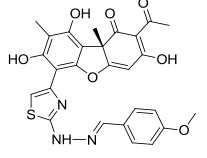
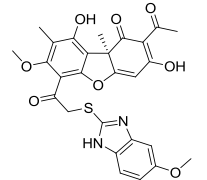
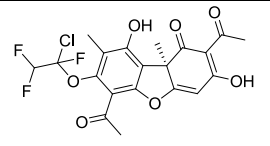
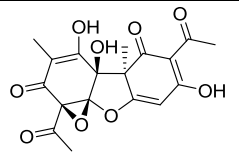
В качестве тестового вируса для скрининга был выбран вирус гриппа H1N1 A/California/7/09(H1N1)pdm09, который является штаммом-предшественником для многих сезонных вирусов и устойчив к препаратам адамантанового ряда. Всего было протестировано 95 соединений, из них активными (ХТИ > 10) оказались 27.

В таблице 1 представлены производные усниновой кислоты, проявившие противовирусную активность (уточненные данные по 5 повторам).

Таблица 1. Результаты первичного скрининга производных усниновой кислоты на противовирусную активность в отношении вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm09.

Группа производных	Номер препарата	Формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ХТИ
(-) усниновая кислота	547		46±4	4.5±0,5	10.3
Анилиновые енамины	577		156±11	8.8±3	17.7
	598		102±7	9.4±1,2	10.9
	601		56±6	5.5±0,7	10.2
	600		56±5	5.5±0,3	10.2
Енамины с алифатическими аминами	579		31.1±3	1.6±0,2	19.4
	578		195±13	16.9±0,9	11.5
Енамины с аминокислот	575		61±3	3±0,1	20

ами	544		60±2	4.3±0,3	13.9
	612		60±4	6±0,5	10
Пиразолы	608		346±21	28±5	12
	572		11±1	1±0,1	11
	541		530±45	33±2	16
	609		235±21	23±3	10
Хальконы	1059		500±33	44±4	11.3
	1039		500±35	45±3	11
	1064		500±44	28±2	17
	1046		500±40	50±0,2	10
	1372		250±12	20±2	12,5
	1373		60±5	5±1	12

	1446		300±25	15±1	20
	1444		300±21	15±1,2	20
	1443		300±15	30±2	10
Тиазолы	878		20±2	2±0,1	10
Сульфиды	1033		300±25	13±1	23
Эфиры	540		46±5	3.2±0,5	14
Окисленные производные	545		88±7	4.4±0,5	22

При обзоре производных усниновой кислоты, видно, что активные препараты принадлежат как к производным (+) изомера усниновой кислоты, так и (-) изомера, при этом некоторые препараты активны как в (+), так и в (-) форме в то время как другие – только в какой-либо одной. В целом, производные (+) усниновой кислоты оказываются более активными, однако встречаются исключения (препараты 577, 602 и 598).

Наличие ароматического кольца в енаминовых производных усниновой кислоты (т.е. тех, где заместители введены через NH-группу в положении 11) повышает их противовирусную активность, такой же эффект наблюдается при введении атома галогена в пара-положении. Данная закономерность сильнее проявляется среди производных (+) усниновой кислоты, чем среди (-) изомеров, где только производное, имеющее атом хлора, проявляет противовирусную активность.

Наличие такого заместителя, как CF_3 -группа, вероятно, повышает противовирусную активность таких соединений, как 579, 578 и 540, однако, достоверно утверждать это не возможно, поскольку в каждом из этих соединений, помимо CF_3 -группы, присутствуют и другие заместители.

Наличие свободной карбоксильной группы (аминокислотные производные) повышает активность енаминовых производных усниновой кислоты, однако, заместитель не должен быть объемным, поскольку это повышает токсичность и, следовательно, уменьшает общую противовирусную активность, приводя к снижению ХТИ.

Модификация усниновой кислоты, приводящая к образованию дополнительного цикла – пиразольного - повышает противовирусную активность, как правило, за счёт резкого снижения цитотоксичности. Дальнейшие модификации этих соединений неблагоприятно сказываются на целевой активности: замена карбонильной группы на спиртовую повышает цитотоксичность (препараты 572, 610), введение экзоциклического оксиранового фрагмента взамен карбонильной группы резко понижает ингибирующую активность (препарат 569).

Среди группы соединений, структурно подобных хальконам, благоприятное влияние оказывает наличие метокси-групп в орто- и/или мета- положениях ароматического кольца при этом резко уменьшается цитотоксичность соединений и, таким образом, повышается их селективность. Такой же эффект метокси-группа оказывает и на тиазольные производные, несущие ароматический заместитель в тиазольном фрагменте, однако, здесь эффект снижения токсичности выражен слабее (препарат 878).

Для удобства оценки зависимости «структура-активность» молекула усниновой кислоты была разделена на зоны, обозначенные буквами (рис.1).

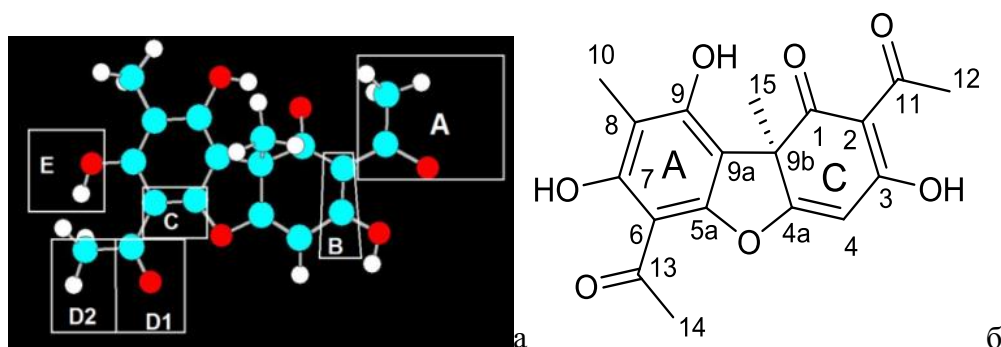


Рис. 1. а - Схема расположения заместителей в молекуле усниновой кислоты, б – нумерация атомов в молекуле усниновой кислоты.

Зона А (положения 2 и 11). Соединения, полученные присоединением заместителей через NH-мостик в данном положении, представляют собой енамины. Активность соединений увеличивается при введении гидрофобных заместителей (препараты 577, 579 и др.), а также аминокислотных остататков (препараты 575 и 612). Цитотоксичность соединений близка к

таковой для исходного соединения, за исключением заместителей, содержащих четвертичный атом азота (препараты 543, 1043 и др.).

Зона В (положения 2 и 3). Введение дополнительного цикла, аннелированного с кольцом С (пиразольные производные) не изменяет активность соединений, однако уменьшает их цитотоксичность, что приводит к более высокой селективности.

Зона С (положения 6 и 5а). При введении аннелированного оксиранового цикла в данном положении увеличивается активность соединений, при этом цитотоксичность не претерпевает существенных изменений.

Зона D1 (положения 6 и 7). Введение дополнительного пятичленного цикла в данной зоне повышало активность соединений, однако, также резко увеличивало их цитотоксичность. Введение тиазолового цикла в данном положении приводит к увеличению активности, но и к резкому увеличению цитотоксичности.

Зона D2 (положение 14). Введение ароматического кольца в данном положении не оказывает существенного влияния на противовирусную активность соединений, однако их цитотоксичность сильно зависит от заместителей в ароматическом кольце. Наличие метокси-группы резко снижает цитотоксичность.

При введении в данной зоне сульфидного заместителя активность и цитотоксичность соединений сильно варьирует в зависимости от групп, входящих в состав заместителя и сделать общий достоверный вывод по данному классу соединений представляется затруднительным.

Зона Е (положение 7). При введении фторсодержащей группировки с помощью эфирной связи в данном положении увеличивается активность соединения при практически неизменной цитотоксичности, а в случае одновременного введения фенолбромистого заместителя в положениях 7 и 9, увеличивается цитотоксичность.

На основании изложенных выше принципов «структура-активность», можно сделать составить ряд рекомендаций для дальнейшего улучшения противовирусных свойств производных усниновой кислоты:

1. В аминаминовых соединениях в зоне А рекомендуется вводить гидрофобные группы либо аминокислотные заместители.
2. В зоне В рекомендуется введение дополнительного аннелированного цикла.
3. В зоне С рекомендуется введение аннелированного оксиранового цикла.
4. В зоне D1 введение дополнительного кольца не рекомендуется, поскольку полученные соединения обладают повышенной цитотоксичностью.
5. В зоне D2 введение дополнительного ароматического кольца рекомендуется только в том случае, если в этом кольце в качестве заместителя будет присутствовать метокси-группа.

6. В зоне Е рекомендуется введение фторсодержащих группировок с образованием эфирной связи.

Исследование активности производных усниновой кислоты *in vivo* на модели гриппозной пневмонии у белых мышей.

На следующем этапе исследования активность производных усниновой кислоты была изучена *in vivo* на модели гриппозной пневмонии у белых мышей. Для опыта были использованы препараты **547, 575, 612, 608, 609, 1059** поскольку все они показали высокий уровень активности *in vitro* и представляли собой структурно различающиеся классы производных. Для определения рабочих концентраций в предварительных экспериментах определяли значения LD₅₀ (50% токсической дозы). Для препаратов 547, 575, 612, 608, 609 и 1059 значения LD₅₀ составили 75, 350, 150, 150, 250, 250 и 250 мг/кг, соответственно. В качестве рабочих использовали концентрации 1/5 LD₅₀.

Критериями активности соединений служили снижение смертности подопытных животных, увеличение средней продолжительности жизни. Доза вируса составила 1 LD₅₀. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Протективная активность производных усниновой кислоты *in vivo* на модели гриппозной пневмонии у белых мышей. Вирус A/Aichi/2/68 (H3N2), доза вируса 1 LD₅₀.*

Препарат,	Доза	Летальность ,%	Средняя продолжительность жизни, сут	Индекс защиты, %
Контроль вируса	-	50%	11,7±2,9	-
547	70 мг/кг	40%	12,8±1,9	20
575	30 мг/кг	20%	13,7±0,4	60
612	30мг/кг	40%	12,7±1,9	20
1059	50 мг/кг	40%	12,6±2,0	20
608	50мг/кг	30%	13,1±1,5	40
609	50мг/кг	40%	12,2±2,4	20
Ремантадин	50 мг/кг	0%	14±0,0	100

* нумерация и структуры соединений представлены в табл. 1.

Количество мышей в каждой группе =10

Из данных, представленных в таблице 3 видно, что все изученные препараты в той или иной степени снижают летальность и повышают продолжительность жизни животных по сравнению с

группой плацебо. Статистически достоверное отличие от контроля с использованием критерия Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$ отмечено для препарата 575, валинового производного енамина усниновой кислоты (индекс защиты 60%) и препарата сравнения – ремантадина. Таким образом, препарат 575 проявил умеренную противовирусную активность в опытах на животных, однако, его активность осталась ниже, чем у препарата сравнения – ремантадина.

Для детальной характеристики влияния препаратов на ход патологического процесса было изучено их действие на репликацию вируса в легких животных (рис. 2) (усредненные данные по 5 повторам).

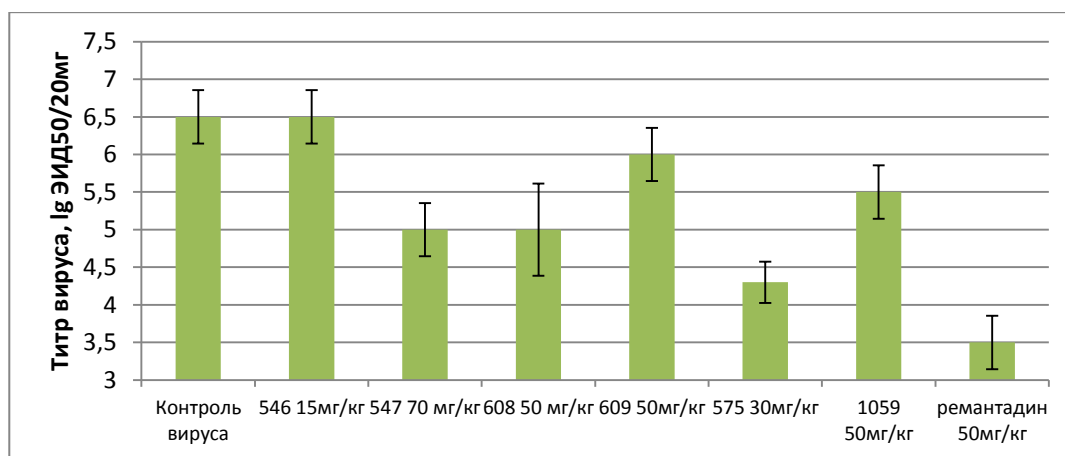


Рис. 2. Репликативная активность вируса в легочной ткани мышей на третий день гриппозной инфекции. Доза вируса 1 LD₅₀

Как видно из графика, в контрольной группе животных, не получавших лечения, титр вируса составил 6,5 lg ЭИД₅₀/20мг. Статистически достоверное снижение титра вируса отмечено для препаратов 547, 608, 575 и препарата сравнения ремантадина (U-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$), при этом наибольшее (на 2 lg ЭИД₅₀/20мг) среди исследуемых препаратов снижение титра вируса выявлено для препарата 575.

Влияние производных усниновой кислоты на морфогенез экспериментальной гриппозной инфекции у животных.

На следующем этапе исследований были изучены особенности морфогенеза гриппозной инфекции в организме животных в условиях применения производных усниновой кислоты. В качестве модельного вируса был использован штамм A/Aichi/2/68 (H3N2), не имеющий устойчивости к какому-либо из противогриппозных препаратов, а в качестве препарата сравнения – ремантадин.

Как было показано в ходе гистологического анализа, легкие интактных животных не имели макроскопических признаков воспаления. Крупные бронхи были выстланы однослойным эпителием, клетки его выглядели интактными – в них не отмечалось признаков вакуолизации, конденсации или фрагментации ядер, а также внутриядерных или цитоплазматических

включений. Признаков серозного или геморрагического экссудата в альвеолярных полостях не обнаруживалось (Рис.3А).

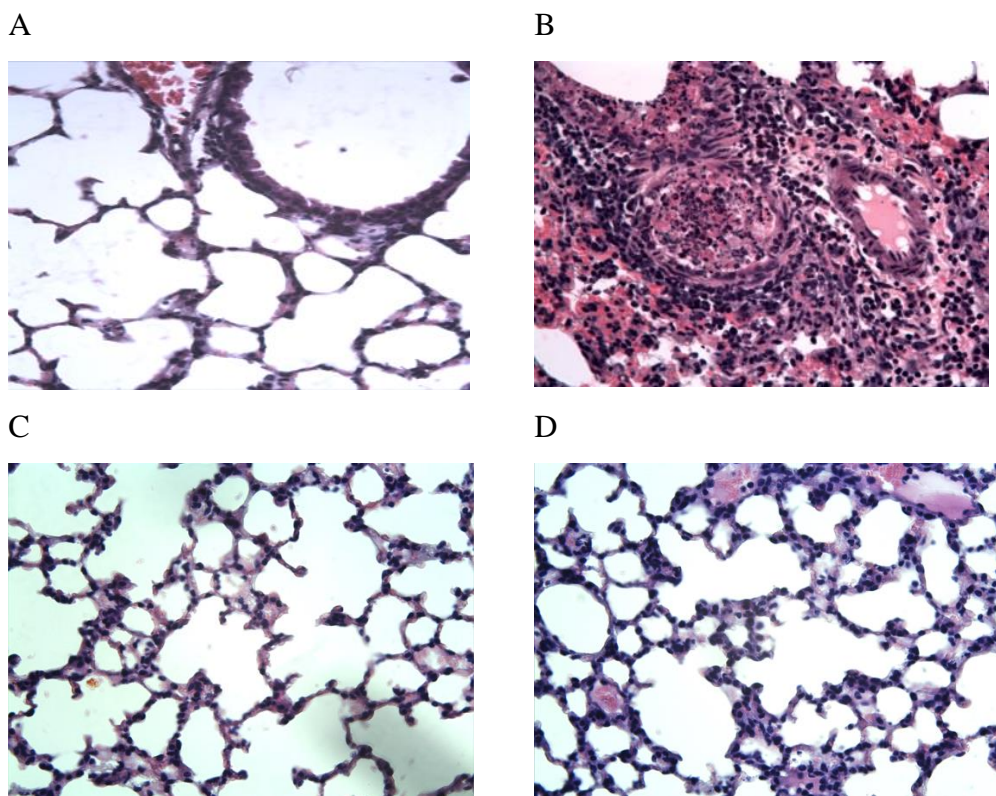


Рис 3. Очаги гриппозной пневмонии в легких мыши на 3 сутки после начала заболевания (гематоксилин-эозин,х400). А-Интактные животные, В-контроль вируса, С-ремантадин, 50мг/кг, D-препарат 575, 30мг/кг.

У зараженных животных, не получавших лечения, морфологические изменения легочной ткани на 3 сутки после инфицирования характеризовались поражениями в виде скоплений нейтрофилов и клеточного детрита в просветах крупных бронхов, вирусспецифическим поражением клеток бронхиального эпителия с формированием в них вирусных включений и отторжением пораженных клеток в просвет бронха. Базальная мембрана при этом обнажалась, что способствовало повышению ее проницаемости и миграции в просвет бронхов и альвеол клеточных элементов. Также наблюдались очаги геморрагического отека, нейтрофильной инфильтрации и распада клеток в респираторных отделах, расширение сосудов и спадение альвеол (Рис.3В).

При использовании ремантадина признаки вирусспецифического и реактивного поражения ткани легких на острой стадии гриппозной пневмонии были резко ограничены. Клетки бронхиального эпителия выглядели сохранными (рис. 3С), в отличие от разрушенных клеток с многочисленными вирусными включениями у контрольных животных, не получавших лечения. Сами очаги воспаления занимали меньшую по сравнению с контролем площадь. При использовании препарата 575 признаки вирусспецифического поражения ткани легких также

были ограничены, однако лекарственное действие оказывалось менее выражено, чем в случае применения ремантадина (рис. 3D). Таким образом, использование препарата 575 приводило к ограничению размеров очагов пневмонии у животных, нормализации структуры легочной ткани, в том числе повышению степени воздушности респираторных отделов, хотя и в меньшей степени, чем при использовании ремантадина.

Изучение стадии вирусной репродукции – мишени действия производных усниновой кислоты.

В отдельной серии экспериментов была изучена противовирусная активность производных УК в зависимости от срока добавления в культуральную среду. Для этого препарат 575 добавляли в культуру клеток MDCK в различные сроки по отношению к заражению вирусом гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm09, после чего оценивали разницу в титрах вируса по сравнению с контролем (рисунок 3). Цифрами (в часах) обозначено время контакта препарата с культурой клеток относительно момента 0 – входа вируса в клетку

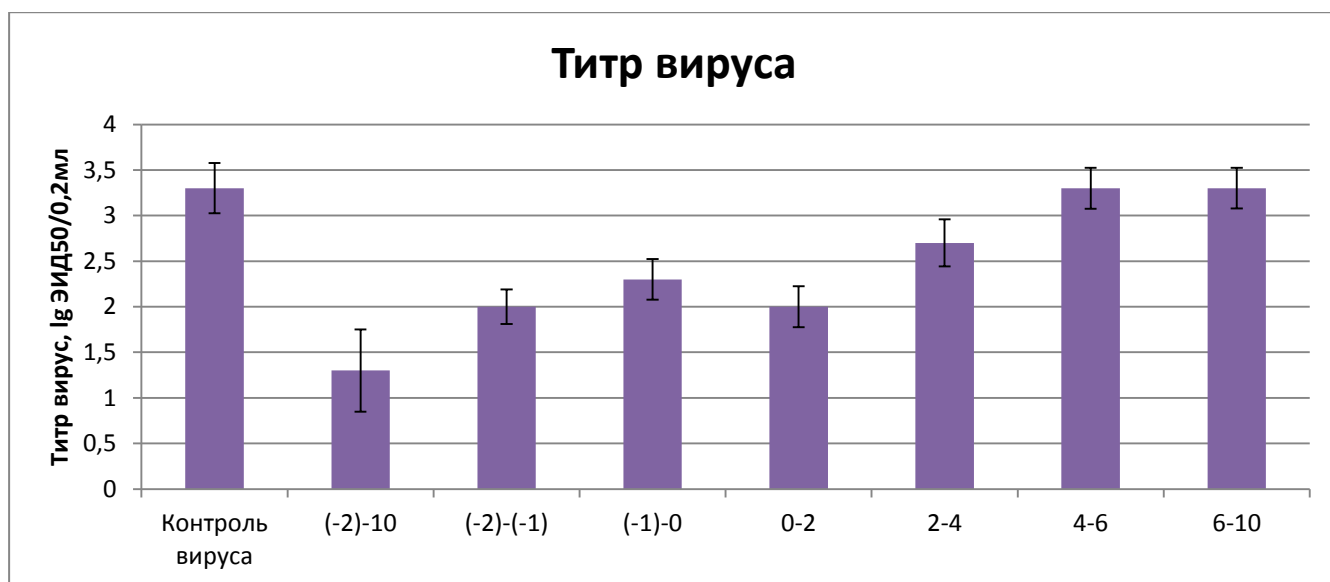


Рисунок 4. Зависимость интенсивности вирусной репродукции от времени внесения препарата 575 (усредненные данные по 10 повторам).

Как видно из представленных результатов, титр вируса в контроле составил 3,3 Ig ЭИД₅₀/0,2мл.

Статистически значимое снижение титров вируса (U-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$) наблюдали в образцах (-2)-10, (-2)-(-1), (-1)-0, 0-2 и 2-4. В контрольных образцах, где препарат находился в среде все время эксперимента (точка (-2)-10), снижение было наибольшим и составило 2 Ig ЭИД₅₀/0,2мл. Ни в одной из других проб снижение не достигло того же уровня, что и в положительном контроле.

Эти данные позволяют сделать вывод о том, что препарат влияет преимущественно на ранние стадии жизненного цикла вируса гриппа. Внесение препарата в точке (-2)-(-1) является профилактическим, в этот момент цикла препарат может воздействовать на клеточную мембрану и помешать в дальнейшем вирусу адсорбироваться на клетке. Снижение вирусного титра в точке (-

1)-0 также объяснимо с точки зрения, что препарат мешает адсорбции вируса. Однако, снижение вирусного титра в точке 0-2 и, менее выраженное, в точке 2-4, может быть связано с проникновением вируса в клетку и его «раздеванием», но ни в коем случае не с адсорбцией. Кроме того, снижение вирусного титра ни в одной из проб не достигло значений, сопоставимых с контролем (точкой (-2)-10). На основании полученных данных возможно сделать вывод о том, что снижение вирусного титра под воздействием препарата 575 носит кумулятивный характер и связано с нарушением таких ранних стадий жизненного цикла вируса гриппа, как адсорбция, проникновение и «раздевание».

Интересно, что эксперименты по изучению времени добавления усниновой кислоты в отношении мышинного полиовируса (Campanella et al, 2002) показали, что она эффективна на поздних стадиях жизненного цикла и, вероятно, блокирует выход зрелых вирионов из клеток либо замедляет скорость транскрипции вирусных мРНК. Разница в результатах, полученных в ходе настоящей работы и Campanella et al., вероятно, объясняется различиями в жизненном цикле и строении вируса гриппа и полиовируса.

Исследование вирулицидного действия производных усниновой кислоты.

Вирулицидная активность препаратов 575 и 612, которые являются парой энантиомеров, была изучена в бесклеточной системе в отношении вируса A/California/7/09, для чего соединения инкубировали совместно с вирусом в течение часа, после чего оценивали инфекционную активность вируса.

Ни один из исследуемых препаратов статистически достоверно (U-критерий Манна-Уитни, $p < 0,05$) не снижал инфекционную активность вируса, тогда как обработка 70% этанолом (положительный контроль) приводила к его полной инаktivации (рис. 5).

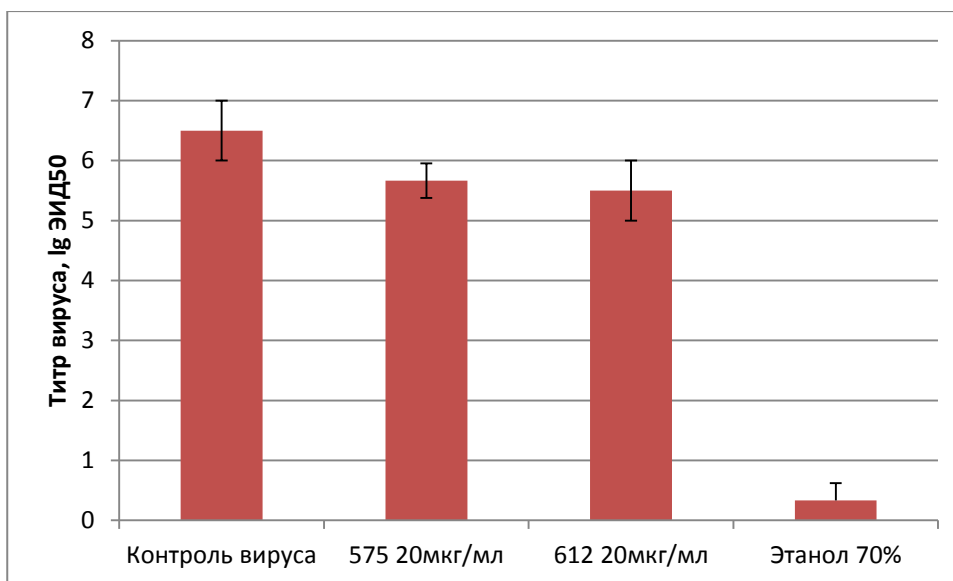


Рисунок 5. Оценка вирулицидного действия производных усниновой кислоты (усредненные данные по 10 повторам)

Таким образом, из представленных данных следует, что производные усниновой кислоты не имеют вирулицидной активности, следовательно, их противовирусные свойства не связаны с блокировкой вирусных поверхностных гликопротеидов или разрушением оболочки.

Изучение воздействия производных усниновой кислоты на гемагглютинин вируса гриппа.

Для изучения возможного влияния препаратов на гемагглютинин вируса гриппа изучили степень гемолиза куриных эритроцитов при активации гемагглютинина в присутствии и отсутствии препаратов. В данном эксперименте был изучен не только препарат 575, показавший высокую противовирусную активность как в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, но и два других соединения – препараты 1033 и 1064, которые относятся к отличным от 575 классам – хальконам и сульфидам УК, соответственно. Оба препарата показали высокую противовирусную активность *in vitro*. Данные суммированы в таблице 16.

Таблица 3. Степень гемолиза эритроцитов при активации гемагглютинина вируса гриппа A/PR/8/34*.

Препарат	Степень гемолиза (значения оптической плотности).
Контроль вируса	0,44±0,03
Контроль эритроцитов	0,06±0,02
575 (30мкг/мл)	0,41±0,04
1033 (150 мкг/мл)	0,39±0,02
1064 (250 мкг/мл)	0,45±0,01

*усредненные данные по 10 повторам.

Ни один из исследованных препаратов в изученных концентрациях (1/2 ЦТД₅₀) не вызывал статистически достоверного (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$) снижения степени гемолиза по отношению к контролю, что позволяет сделать выводы о том, что гемагглютинин вируса гриппа не является мишенью для производных усниновой кислоты. Этот вывод частично подтверждается данными предыдущего эксперимента об отсутствии у производных УК вирулицидного действия.

Исследование ингибирующей активности производных усниновой кислоты в отношении нейраминидазы вируса гриппа.

В связи с данными о большей чувствительности озельтамивир-устойчивого вируса A/Владивосток/2/09 к препаратам возникла гипотеза о возможном механизме действия этих препаратов, связанных с ингибированием вирусной нейраминидазы, что оценили с помощью MUNANA-теста. Данные суммированы в таблице 4. В качестве положительного контроля

использовали известный ингибитор нейраминидазы озельтамивир, а в качестве отрицательного контроля – препарат 574, не проявивший никакой противовирусной активности.

Таблица 4. Исследование ингибирующей активности производных усниновой кислоты в отношении нейраминидазы вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm09 и A/Владивосток/2/09 (H1N1)

Препарат	Вирус	ЭД ₅₀ , pM
Озельтамивир	A/California/7/09 (H1N1)pdm09	$7,4 \times 10^2$
575	A/California/7/09 (H1N1)pdm09	$2,3 \times 10^{7*#}$
574	A/California/7/09 (H1N1)pdm09	$1,1 \times 10^{13*}$
574	A/Владивосток/2/09 (H1N1)	$2,3 \times 10^{12*}$
575	A/Владивосток/2/09 (H1N1)	$7,6 \times 10^{7*#}$
Озельтамивир	A/Владивосток/2/09 (H1N1)	3×10^{13}

Усредненные данные по 10 повторам

*значения статистически достоверно (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$) отличаются от значения ЭД₅₀ озельтамивира в отношении штамма A/California/7/09 (H1N1)pdm09

значения статистически достоверно (t-критерий Стьюдента, $p < 0,05$) отличаются от значения ЭД₅₀ озельтамивира в отношении штамма A/Владивосток/2/09 (H1N1)

Из данных, представленных в таблице, видно, что озельтамивир интенсивно ингибирует нейраминидазу вируса A/California/7/09 и не оказывает воздействия на нейраминидазу устойчивого к нему вируса A/Владивосток/2/09, что согласуется с ранее полученными данными о чувствительности одного и устойчивости второго (van der Vries et al, 2012), (CDC, 2009).

Препарат 575, хотя и ингибирует вирусную нейраминидазу крайне слабо по сравнению с озельтамивиром, однако его активность проявляется независимо от наличия или отсутствия устойчивости к озельтамивиру, которая у штамма A/Владивосток/2/09 вызвана мутацией H274Y. Это позволяет сделать предположение, что производные усниновой кислоты способны связываться с нейраминидазой.

Исследования Ohuchi et al.,(2006) показали, что нейраминидаза, помимо своей основной функции в почковании вируса гриппа на финальной стадии репликации, также участвует в процессе входа вируса в клетку. Таким образом, полученные выше данные о том, что препарат 575 влияет на ранние стадии жизненного цикла вируса гриппа согласуются с данными о его воздействии на вирусную нейраминидазу.

Оценка возможного сайта связывания производных усниновой кислоты с вирусной нейраминидазой.

Для оценки возможного сайта связывания производных усниновой кислоты с нейраминидазой провели компьютерное моделирование взаимодействия нейраминидазы с лигандом с помощью программы Nex 8.0.0.

На рисунке 6 представлена модель связывания препарата 575 и озельтамивира с нейраминидазой вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm09.

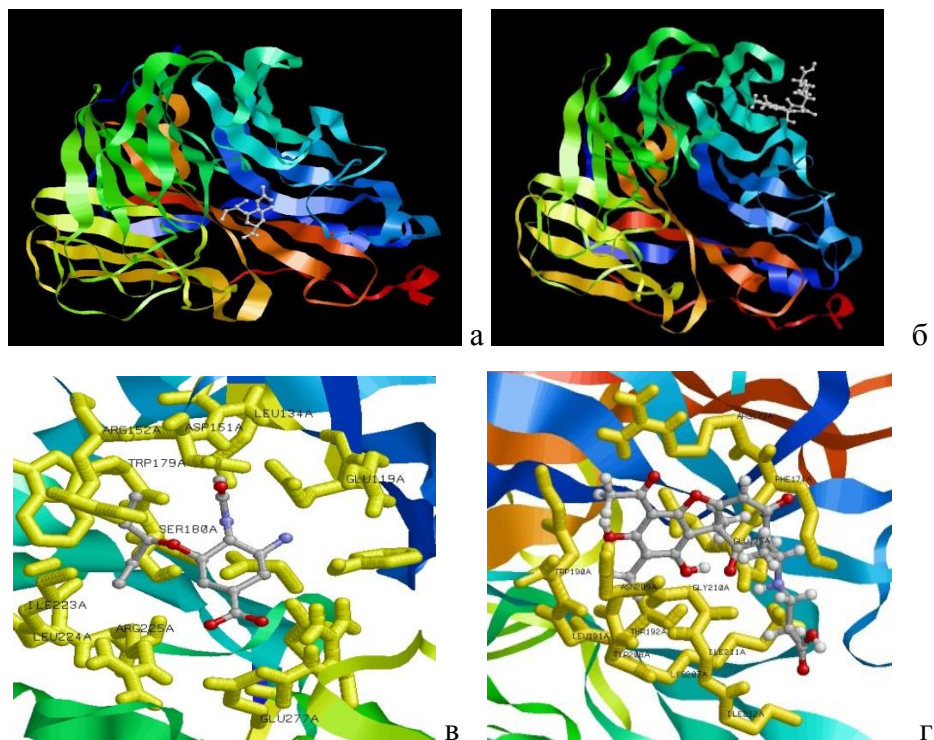


Рис. 6. Связывание озельтамивира и препарата 575 с нейраминидазой вируса гриппа (а,б – общий вид молекулы; в, г – непосредственно сайт связывания с выделением ближайших аминокислот; а, в – озельтамивир; б, г – препарат 575).

Как видно из рисунка 33, при взаимодействии с нейраминидазой озельтамивир оказывается в непосредственной близости от следующих аминокислот: Glu119, Leu134, Asp151, Arg152, Trp179, Ser180, Leu224, Ile223, Arg225 и Glu277, что соответствует литературным данным (Durrant et al., 2010), (Van der Vries et al., 2012). Препарат 575 непосредственно связан со следующими аминокислотами: Phe174, Glu175, Trp190, Leu191, Thr192, Lys207, Tyr208, Asn209, Gly210, Ile211 и Ile212. Ни одна аминокислота из данного списка не входит в число тех, которые образуют каталитический центр молекулы нейраминидазы (Durrant et al, 2010). Таким образом, производные усниновой кислоты связываются с молекулой нейраминидазы в сайте, не входящем в состав каталитического центра фермента. Сравнительный анализ би- и три-циклических ингибиторов нейраминидазы свидетельствует о том, что ряд представителей этих соединений может быть для получения эффективных ингибиторов репродукции пандемических вирусов гриппа

Селекция и изучение вирусов, устойчивых к производным усниновой кислоты.

В рамках дальнейших исследований была проведена серия опытов, направленных на селекцию вирусных штаммов, устойчивых к препарату 575, который показал наибольшую

активность в опытах *in vitro* и *in vivo*. Для проведения этого эксперимента использовали вирус A/PR8/34 (H1N1).

Было проведено 13 последовательных пассажей вируса с нарастающими концентрациями препарата 575. После этого вирусингибирующая активность соединений была протестирована в отношении исходного и конечных штаммов вируса на клетках MDCK. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5. Сравнение активности препарата 575 в отношении вируса A/PR8/34 (H1N1) до и после совместного пассирования с нарастающими концентрациями этого препарата.

Вирус	Снижение титра вируса в присутствии препарата 575, (lg ЭИД ₅₀ /0,2мл)			
	50 мкг/мл	17 мкг/мл	5 мкг/мл	1,7 мкг/мл
Исходный	4,5	1,5	0,5	0
Конечный	3	1,0	0,5	0

Из таблицы видно, что, несмотря на небольшую разницу в исходных титрах, снижение вирусной репродукции под воздействием препарата 575 в одинаковых дозах также было одинаковым. Таким образом, после 13 совместных пассажей с препаратом 575 вирус не выработал устойчивости к данному соединению.

Несмотря на отсутствие фенотипической устойчивости, оставалась вероятность того, что после 13 пассажей с препаратом 575 вирус приобрел какие-либо мутации, поэтому у исходного и конечного штаммов вируса были просеквенированы гены NA, NA и M2, после чего первичные последовательности соответствующих генов сравнили между собой. Выбор именно этих генов обусловлен тем обстоятельством, что все три белка принимают участие в ранних стадиях жизненного цикла.

Ни в одном из генов вируса A/PR8/34 (H1N1) не появилось каких-либо аминокислотных замен по сравнению с диким типом. Существует два вероятных объяснения данного факта:

1- Связывание производных УК с нейраминидазой является крайне слабым (что согласуется с их невысокой по сравнению с озельтамивиром активностью) и не стимулирует отбор устойчивых штаммов.

2- Возможно производные УК имеют клеточную мишень, не учтенную в данной работе, а связывание с вирусной нейраминидазой несущественно.

Для окончательного определения механизма действия производных усниновой кислоты требуются дополнительные исследования.

Заключение.

В настоящей работе проведено исследование противовирусной активности производных усниновой кислоты. Из 95 исследованных при первичном скрининге соединений 27 проявили противовирусную активность. Сформированы основные принципы «структура-активность».

Часть из наиболее активных препаратов была исследована *in vivo* в опытах на летальной гриппозной пневмонии у белых мышей. Наиболее активным зарекомендовал себя препарат 575, чей индекс защиты составил 60%. Далее в серии экспериментов было показано, что препарат 575 слабой ингибирующей активностью в отношении нейраминидазы вируса гриппа.

При помощи компьютерного моделирования показано, что производные усниновой кислоты связываются с вирусной нейраминидазой в положениях 209 и 210, вне активного центра и, таким образом, могут быть аллостерическими ингибиторами этого фермента.

Пассирование в течение 13 пассажей в присутствии препарата 575 не приводило ни к появлению устойчивых штаммов, ни к возникновению мутаций в генах гемагглютинаина, нейраминидазы или М2-белка вируса гриппа.

Дополнительное исследование гепатотоксичности препарата 575 показало, что данное соединение повреждает ткани печени значительно меньше, чем исходное вещество – усниновая кислота, однако, полностью безопасным не является.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы исследования. С целью получения высокоэффективных лекарственных средств широкого спектра действия следует продолжить синтез новых производных усниновой кислоты согласно рекомендациям, высказанным в разделе «Результаты».

Выводы

1- Показано, что производные усниновой кислоты обладают противовирусной активностью *in vitro*, а также сформированы основные принципы «структура-активность».

2- Показано, что производные усниновой кислоты проявляют умеренную протективную активность *in vivo*. Наиболее активен препарат 575, валиновое производное енамина усниновой кислоты.

3- Показано, что производные усниновой кислоты проявляют наибольшую активность на ранних стадиях жизненного цикла вируса гриппа.

4- Получены данные о том, что производные усниновой кислоты проявляют слабую ингибирующую активность в отношении нейраминидазы вируса гриппа и способны связываться с вирусной нейраминидазой вне каталитического центра молекулы

5- Показано, что вирусы гриппа не вырабатывают устойчивость к препарату 575 за 13 пассажей.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Статьи:

1. Зарубаев В.В. Разработка новых препаратов против вируса гриппа на основе синтетических и природных соединений / В.В. Зарубаев, П.М.Анфимов, А.А. Штро и др. // **Вопросы вирусологии** - 2012 - № 57(6) – с.30-36.

2. Sokolov D.N. Anti-viral activity of (-)- and (+)-usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1)2009 / D.N. Sokolov, V.V. Zarubaev, A.A. Shtro et al // **Bioorg Med Chem Lett** – 2012 - №22(23) – p.7060-4.

3. Shtro A.A. Novel derivatives of usnic acid effectively inhibiting reproduction of influenza A virus / A.A. Shtro, V. V. Zarubaev, O. I. Luzina et al // **Bioorg Med Chem** – 2014 – in press

Патент:

- 1- Соколов Д.Н. Усниновая кислота и ее окисленное производное в качестве ингибиторов репродукции вируса гриппа / Д.Н. Соколов, О.А. Лузина, М.П. Половинка, Н.Ф. Салахутдинов, О.И. Киселев, В.В. Зарубаев, А.А.Штро // **Патент № 2464033 от 20.10.2012**

Тезисы на конференциях:

1- Штро А.А. Противовирусная активность азотистых производных усниновой кислоты / А.А. Штро, В.В. Зарубаев, О.А. Лузина и др. // Тезисы Научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней», Новосибирск – 2013 – с.23

2- Shtro A. A. Antiviral Activity of Usnic Acid Derivates Against Influenza A/Aichi/2/68 *in vivo* / A. A. Shtro, O. A. Luzina, M. P. Polovinka et al // 26th International Conference on Antiviral Research (ICAR), San Francisco, CA - 2013 - p.74

3- Shtro A.A. Antiviral activity of usnic acid derivatives against influenza virus *in vivo* / A.A. Shtro, O.A. Luzina, M.P. Polovinka et al // Options VIII for the control of influenza. Cape Town, South Africa – 2013 – P.702.

4- Shtro A. A. Antiviral activity of usnic acid derivates against influenza A(H1N1) 2009 virus / A. A. Shtro, V.V. Zarubaev, O. I. Kiselev et al // Fourth ESWI Influenza Conference, Malta – 2011 – p.32

Список сокращений.

МТТ – метилтетразолиевый тест

РГА – реакция гемагглютинации

УК – усниновая кислота

ХТИ – химиотерапевтический индекс

ЦТД₅₀ – 50% цитотоксическая доза

ЭД₅₀ – 50% эффективная доза

ЭИД₅₀ – 50% экспериментальная инфекционная доза

НА - гемагглютинин

LD₅₀ – 50% летальная доза

MUNANA - 2-4(4-метилумбеллиферил)- α -D-N-ацетилнейраминавая кислота

NA - нейраминидаза

WHO – world health organization (Всемирная организация здравоохранения)