

**Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерство здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**ШТРО**

**Анна Андреевна**

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

03.02.02 – вирусология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель

Доктор биологических наук,

академик, директор ФГБУ «НИИ гриппа» МЗ РФ

**Киселев О.И.**

Санкт-Петербург

2014

## **ОГЛАВЛЕНИЕ.**

Список сокращений.....	5
1. ВВЕДЕНИЕ.....	6
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
2.1. Актуальность проблемы.....	11
2.2. Этиология гриппа.....	13
2.3. Строение и жизненный цикл вируса гриппа.....	16
2.4. Современные методы профилактики и лечения гриппа.....	29
2.4.1. Вакцинопрофилактика.....	29
2.4.2. Химиотерапия гриппа.....	30
2.5. Биологическая активность усниновой кислоты и ее производных.....	36
2.5.1. Общие сведения.....	36
2.5.2. Антибактериальные свойства усниновой кислоты.....	37
2.5.4. Противопаразитарные свойства усниновой кислоты.....	38
2.5.5. Противоопухолевая активность усниновой кислоты.....	39
2.5.6. Противовирусная активность усниновой кислоты.....	40
2.5.7. Токсикологические характеристики усниновой кислоты.....	41
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	44
3.1. Исследуемые препараты.....	44
3.2. Вирусы и клетки.....	44
3.3. Питательные среды.....	44
3.4. Исследование токсичности препаратов.....	44
3.5 Подготовка вируса.....	45

3.6. Определение противовирусной активности препаратов.....	45
3.7. Исследование противовирусной активности препаратов на модели гриппозной пневмонии у белых мышей.....	46
3.8. Определение титра вирусов в легочной ткани.....	47
3.9. Получение гистологических срезов и проведение гистологической и иммуногистохимической окраски. ....	48
3.10. Изучение стадии вирусной репродукции – мишени действия усниновой кислоты.....	50
3.11. Изучение вирулицидного действия препаратов. ....	50
3.12. Изучение воздействия препаратов на гемагглютинин вируса гриппа. ....	50
3.13. Определение ингибирования активности нейраминидазы флюоресцентным методом.....	51
3.14. Компьютерное моделирование взаимодействия препаратов с рецептором.....	52
3.15. Получение устойчивых к препаратам штаммов вируса гриппа.....	52
3.16. Молекулярно-биологические методы .....	52
3.17. Оценка гепатотоксичности усниновой кислоты и препарата 575.....	54
3.17. Статистическая обработка данных.....	54
4. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	55
4.1. Оценка противовирусной активности препаратов в опытах <i>in vitro</i> . ....	55
4.1.1. Первичный скрининг препаратов. ....	55
4.1.2 . Изучение спектра противовирусной активности производных усниновой кислоты в отношении различных штаммов вируса гриппа.....	79
4.2. Исследование активности производных усниновой кислоты <i>in vivo</i> на модели гриппозной пневмонии у белых мышей. ....	82
4.3. Влияние препаратов на морфогенез экспериментальной гриппозной инфекции у животных.....	86
4.4. Изучение стадии вирусной репродукции – мишени действия усниновой кислоты.....	90

4.5. Исследование вирулицидного действия производных усниновой кислоты.....	92
4.6. Изучение воздействия производных УК на гемагглютинин вируса.....	93
4.7 Исследование ингибирующей активности производных усниновой кислоты в отношении нейраминидазы вируса гриппа. ....	94
4.8 Оценка возможного сайта связывания производных усниновой кислоты с вирусной нейраминидазой. ....	95
4.9. Селекция и изучение вирусов, устойчивых к производным усниновой кислоты.....	98
4.10. Оценка гепатотоксичности усниновой кислоты и ее производного – препарата 575.....	100
5. ОБСУЖДЕНИЕ.....	103
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120

## **Список сокращений.**

МТТ – метилтетразолиевый тест

РГА – реакция гемагглютинации

УК – усниновая кислота

ХТИ – химиотерапевтический индекс

ЦТД<sub>50</sub> – 50% цитотоксическая доза

ЭД<sub>50</sub> – 50% эффективная доза

ЭИД<sub>50</sub> – 50% экспериментальная инфекционная доза

НА - гемагглютинин

LD<sub>50</sub> – 50% летальная доза

MUNANA - 2-4(4-метилумбеллиферил)- $\alpha$ -D-N-ацетилнейраминовая  
кислота

НА - нейраминидаза

WHO – world health organization (Всемирная организация здравоохранения)

## **1.ВВЕДЕНИЕ.**

### **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, хотя и использовалась изначально в качестве противобактериального средства, также проявляет активность в отношении ряда вирусов. В случае успешного выявления противогриппозных свойств усниновой кислоты и/или ее производных откроется блестящая перспектива по созданию уникального лекарственного средства, пригодного как в качестве противобактериального, так и противовирусного средства одновременно. В такого рода лекарствах особенно нуждаются больные тяжелым гриппом, 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 противовирусным 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 поверхностных антигенов вируса гриппа - 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 А.

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

Впервые обнаружен сайт связывания производных усниновой кислоты с молекулой нейраминидазы вируса гриппа А.

### **Теоретическая и практическая значимость работы.**

Настоящая работа представляет собой научное исследование прикладной направленности. 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 методы исследования отражены в разделе «Материалы и методы».

### **Положения, выдвигаемые 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 CF<sub>3</sub>-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 слабую 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 тезиса.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 133-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 источника 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».

## **2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **2.1. Актуальность проблемы**

Грипп в настоящее время является одним из самых распространенных заболеваний в мире. Ежегодно он вызывает эпидемии или даже пандемии, нередко приводя к смертельному исходу. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, грипп ежегодно поражает до 15% человеческой популяции, вызывая гибель от 250 000 до 500 000 человек (WHO, 2010).

Уникальная способность вирусов гриппа к изменчивости путем точечных мутаций, рекомбинаций и реассортации генов, сопровождающаяся изменением биологических свойств вируса – причина неконтролируемого распространения инфекции. Несмотря на успехи в создании вакцин и средств химиотерапии, эпидемии гриппа по-прежнему имеют огромные масштабы. Подтверждением этому стала пандемия 2009/2010 года, вызванная вирусами гриппа A(H1N1pdm2009), от которой, согласно данным Всемирной организации здравоохранения (WHO, 2010) погибло более 18,5 тысяч человек. Особо следует упомянуть такие высокопатогенные штаммы вируса гриппа А, как H5N1 и H7N9, которые оказались неспособны вызвать масштабную пандемию, однако обладают высокой (до 59% от числа заболевших) летальностью (WHO, 2012).

В настоящее время существует два основных метода профилактики гриппа – это специфическая профилактика посредством вакцинации и неспецифическая, в том числе с использованием химиопрепаратов. Оба метода не могут гарантировать абсолютную защиту. Противовирусный иммунитет после вакцинации эффективен против того антигенного варианта вируса, который

содержался в вакцине и не обеспечивает защиты от новых штаммов, вследствие чего каждый год требуется смена штаммового состава вакцин. Эффективность такой вакцинации варьирует от 59% (Fielding et al, 2011) до 93% (Song et al, 2011) в зависимости от сезона и страны. Применение химиопрепаратов для профилактики и лечения гриппа осложняет наблюдающаяся в последние годы резистентность вирусов гриппа к химиопрепаратам. Одной из причин этого является нерациональная терапия. Следовательно, поиск и внедрение в клиническую практику лекарственных средств для профилактики и лечения гриппа и других ОРВИ продолжают оставаться актуальной проблемой (Ленева, 2010).

В настоящее время существует две группы противогриппозных препаратов, внедренных в клиническую практику – ингибиторы М2-белка (амантадин и ремантадин) и ингибиторы нейраминидазы (озельтамивир, занамивир, перамивир и ланинамивир) (Литвинова и др., 2003). Третья группа – ингибиторы полимеразы, в настоящее время клинические испытания данных препаратов проходят в Японии и США (Furuta et al, 2013).

Амантадин и ремантадин блокируют канал, образованный М2-белком и препятствуют проникновению ионов  $H^+$ , необходимых для «раздевания» вирусных частиц, внутрь эндосомы. Эти соединения высокоэффективны в отношении чувствительных к ним штаммов, однако, в настоящее время наблюдается циркуляция устойчивых вариантов. К 2009 году число устойчивых вариантов в мире достигло 62,2% (Govorkova et al, 2013), а в России – 100% (Киселев и др., 2011). Пандемический вирус А(Н1N1pdm09) также устойчив к действию ремантадина и амантадина.

Штаммов вируса гриппа А, устойчивых к ингибиторам нейраминидазы, в настоящее время немного, 1% от числа вирусов подтипа А(Н1N1pdm09) (CDC, 2010). Однако, весьма высока вероятность того, что их количество может резко увеличиться, как это случилось в эпидемический сезон 2008-2009, когда доля

устойчивых штаммов колебалась от 60% до 93% (Besselaar et al, 2008), (WHO, 2008).

Таким образом, в настоящее время грипп представляет собой опасное заболевание, против которого существует всего две группы этиотропных препаратов и к обоим вирус либо уже выработал резистентность, либо это может произойти в ближайшее время.

## 2.2. Этиология гриппа.

Вирус гриппа относится к роду *Influenza virus* семейства *Orthomyxoviridae* и представлен тремя типами А, В и С, из которых наибольшее значение имеют первые два типа, а третий очень редко вызывает вспышки заболевания, чаще среди детей. Естественными хозяевами вируса гриппа А являются водоплавающие птицы, однако, он поражает также людей, лошадей, свиней, многих птиц и даже морских млекопитающих. В течение двадцатого века было зарегистрировано четыре пандемии гриппа, которые, включая знаменитую «испанку» 1918 года, унесли около 40 миллионов жизней (Webster et al., 1992).

Вирус гриппа А имеет множество подтипов, чья классификация основана на антигенных различиях двух поверхностных гликопротеинов – гемагглютинина и нейраминидазы. Существует 18 подтипов гемагглютинина и 11 подтипов нейраминидазы. Разные подтипы вируса гриппа А имеют различные спектры хозяев, например, подтипы, поражающие человека, как правило имеют гемагглютинин первого, второго и третьего подтипа (в последнее время отмечены случаи заражения людей вирусами гемагглютинин пятого и седьмого подтипов (WHO, 2012)), а нейраминидазу первого и второго подтипа. Для свиней актуальны только штаммы с гемагглютинином первого и третьего подтипа, и нейраминидазой первого и второго. Для птиц подобной избирательности не обнаружено – например, из уток выделены подтипы вируса гриппа, несущие любые сочетания гемагглютинина и нейраминидазы, за исключением гемагглютининов 17 и 18 типов, недавно обнаруженных у летучих мышей.

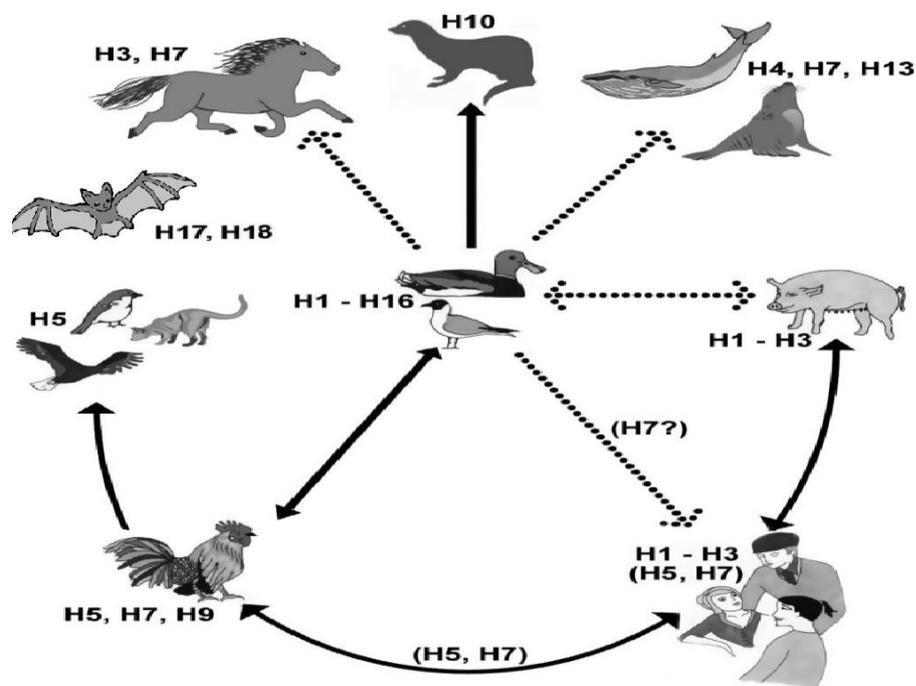


Рисунок 1. Спектр хозяев, поражаемых вирусами гриппа различных подтипов (Wahlgren, 2011) с дополнениями согласно данным Tong et al (2013)

Из вирусов гриппа А наибольшую эпидемическую актуальность представляют собой подтипы А(Н3N2) и А(Н1N1). Пандемический цикл, вызванный подтипом А(Н1N1) («испанка») начался в 1918 году и продолжался в течение 39 лет, после чего произошла смена подтипа на А(Н2N2). Этот подтип продержался всего 11 лет и в 1968 году был вытеснен подтипом А(Н3N2). Далее подтип А(Н3N2) циркулировал до 1977 года, когда к нему присоединился подтип А(Н1N1), родственник «испанке». Совместная циркуляция двух штаммов продолжалась до 2009 года, когда появился пандемический грипп А(Н1N1pdm09) («свиной грипп»). Большая часть вирусов гриппа подтипа А(Н1N1) была вытеснена подтипом А(Н1N1pdm09). В настоящее время наблюдается совместная циркуляция вирусов А(Н1N1pdm09) и А(Н3N2) (Palese et al, 2011). Схематично динамика смены подтипов представлена на рисунке 2.

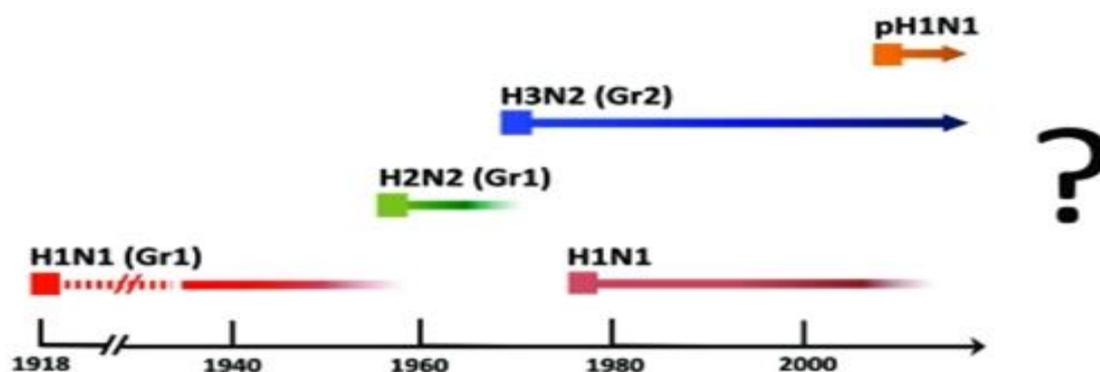


Рисунок 2. Динамика эпидемических циклов различных подтипов вируса гриппа А (Palese et al, 2011), с изменениями.

В последнее время потенциальную опасность приобрели вирусы гриппа А(Н5N1), вызывающие крупные эпидемии у птиц, в том числе и домашних, и приносящие огромный вред сельскому хозяйству. Были зафиксированы случаи передачи вирусов птичьего гриппа А(Н5N1) от птиц к человеку (Jong et al., 1998). От человека к человеку вирусы гриппа птиц передаются на ограниченное количество циклов, и вопрос, сможет ли вирус гриппа А(Н5N1) вызвать пандемию, остается открытым. Не исключается, что реассортация генов высокопатогенного птичьего вируса с генами естественно циркулирующих человеческих вирусов гриппа типа А поможет сформироваться новому возбудителю, способному преодолеть этот барьер (Suarez et al., 1998). Кроме того, выявлены случаи заражения людей вирусом А(Н7N9), летальность от которого составляет около 40% (Wang et al, 2013).

Для вируса гриппа типа В характерно наличие только одного типа гемагглютинаина и нейраминидазы, однако этот тип делится на две антигенно-различающиеся линии – вирусы, подобные В/Victoria/02/87 и вирусы, подобные В/Yamagata/16/88 (Rota et al, 1990). В настоящее время обсуждается необходимость введения обеих линий в сезонные вакцины против гриппа (Ambrose et al, 2012). Грипп В не имеет природного резервуара.

Вирусы гриппа В по уровню вирулентности и эпидемической значимости уступают вирусам гриппа типа А. Эпидемии гриппа В возникают, как правило, значительно реже (раз в 3-4 года) и не приобретают таких масштабов, как у гриппа А (Слепушкин и др. 1998).

Вирусы гриппа типа С, не являются причиной эпидемий, в отличие от типов А и В, зато могут вызывать вспышки в детских садах, больницах, школах и др. Эти вспышки нередко сопровождают эпидемии гриппа А и В или происходят незадолго до них. У детей младшего возраста грипп С протекает тяжело, у более старших пациентов он протекает в легкой и/или бессимптомной форме. По своим биологическим свойствам эти вирусы отличаются от других представителей семейства ортомиксовирусов, им свойственна меньшая репродукционная активность, наличие иных, чем у вирусов гриппа А и В, рецепторов на поверхности чувствительных клеток, меньшая скорость накопления точечных мутаций (Scharfenorth et al., 1991).

Характерной чертой эпидемических вирусов гриппа в настоящее время является их ярко выраженная гетерогенность на уровне типов, подтипов антигенных вариантов и штаммов вируса. Столь выраженная неоднородность популяции циркулирующих вирусов, а также их быстрая и непредсказуемая антигенная изменчивость придают особую важность этиологическому надзору за гриппом, усложняют борьбу с этой инфекцией и требуют постоянного совершенствования имеющихся в наличии лекарственных средств.

### **2.3. Строение и жизненный цикл вируса гриппа**

Вирус гриппа представляет собой частицы круглой или продолговатой формы (рис.3) размером 80–120 нм, покрытые мембраной, в которую погружены поверхностные белки вируса – гемагглютинин и нейраминидаза. Внутренняя поверхность мембраны выстлана белком М1, который, в свою очередь, связан с рибонуклеопротеиновым комплексом.

Внутри вириона находится белок нуклеопротеин (NP), тесно связанный с нуклеиновой кислотой.

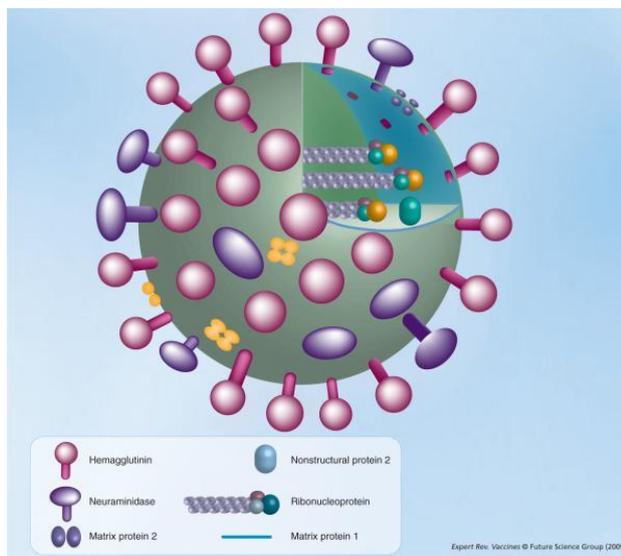


Рисунок 3. Структура вируса гриппа (Schotsaert et al, 2009).

Геном вируса гриппа А состоит из восьми сегментов РНК с негативной полярностью, которые кодируют 15 генов (Muramoto et al, 2013). Эти фрагменты РНК связаны с вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой (RdRp) и NP, формируя вирусные рибонуклеопротеиновые комплексы (vRNPs) (Филдс и др., 1989).

**Гемагглютинин (НА)** (см. рис. 4) – это один из самых крупных белков в вирионе. Он способен специфически распознавать клеточный рецептор (сиаловую кислоту) и с его помощью связываться с клеткой.

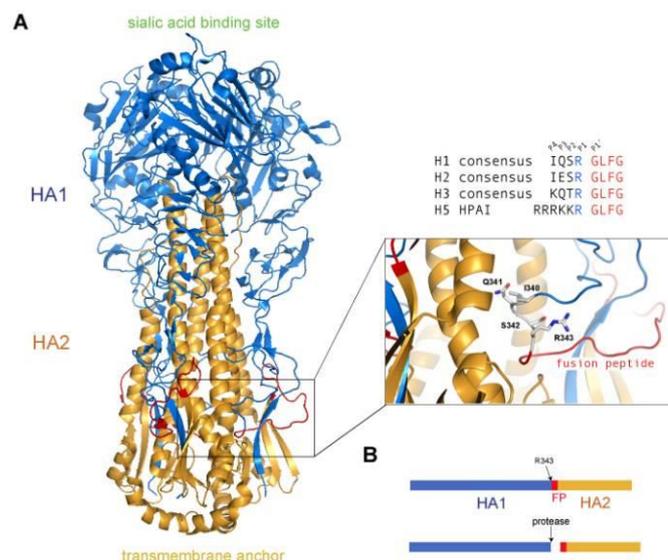


Рисунок 4. Структура гемагглютинаина (Hamilton et al, 2012).

Гемагглютинин синтезируется в виде неактивного предшественника, который обозначается как HA0. Он разделяется на два полипептида - HA1 и HA2 с помощью протеаз хозяина. HA1 отвечает непосредственно за связывание с сиаловой кислотой, а также инициирует эндоцитоз. Далее, уже внутри эндосомы белок HA2 обеспечивает слияние мембраны эндосомы с вирусной оболочкой, что приводит к выходу РНК вируса в цитоплазму (Hamilton et al, 2012).

Установлено, что различные типы гемагглютинаина отличаются по способности к распознаванию и связыванию с рецептором – сиаловой кислотой, которая связана в олигосахариде клеточных мембран с галактозой. Гемагглютинин вирусов гриппа человека связывается с остатками сиаловой кислоты, образующей  $\alpha$  2,6 связь с галактозой, а гемагглютинин птичьих вирусов распознает сиаловую кислоту в  $\alpha$  2,3 связи с остатками галактозы. Установлено, что в рецептор-связывающем кармане за дифференциацию двух типов рецепторов ответственны два аминокислотных остатка в положениях 226 и 228 (нумерация по H3). Штаммы вирусов гриппа, распознающие сиаловую кислоту в связи  $\alpha$  2,3, обычно содержат глутамин в положении 226 и глицин в положении 228. Вирусы, распознающие сиаловую кислоту в 2,6 ориентации, обычно содержат в положениях 226 и 228 лейцин и серин соответственно (Блинов, 1993).

Второй поверхностный белок вируса гриппа – **нейраминидаза (NA)**, которая представляет собой тетрамер из четырех идентичных полипептидов, содержащих 470 аминокислотных остатков.

Трехмерная структура нейраминидазы может быть представлена в виде стебля и глобулярной головки. Стебель формируют аминокислотные остатки с 36-го по 73-ий, головку образует остальная часть молекулы. Внутри головки полипептидная цепь образует несколько витков. Каталитический центр нейраминидазы расположен на поверхности головки каждой из субъединиц, поэтому тетрамер имеет четыре активных центра (Air, 2012), но по отдельности мономеры не активны.

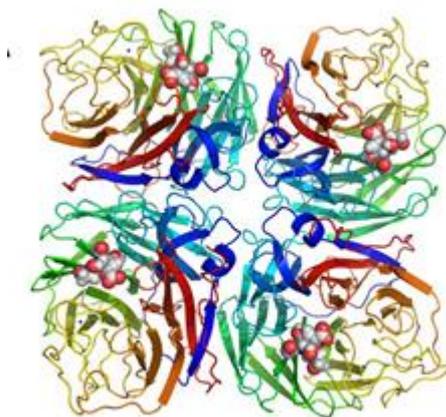


Рисунок 5. Структура нейраминидазы (Air, 2012).

Установлено, что основная функция NA состоит в отщеплении сиаловой кислоты от HA, так как без этого процесса вирус не может отпочковаться от клеточной мембраны (Yang et al, 1997). Также нейраминидаза участвует в начальных стадиях проникновения вируса в клетку – за счет ее действия гемагглютинин отщепляется от сиаловой кислоты и, соответственно, от клеточной мембраны, в том случае, если связывание произошло неправильным образом. В присутствии ингибиторов нейраминидазы вирусы остаются прикрепленными к клеточной мембране. (Ohuchi et al., 2006).

Оба поверхностных белка, NA и HA, погружены в липиды мембраны, на долю которых приходится 20% сухой массы вириона. Основная часть липидов (55–60%) – это фосфолипиды, а именно: фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, сфингомиелин и фосфатидная кислота. На долю нейтральных липидов, главным образом холестерина, приходится 35–40%. Эти липиды включаются в вирионы из мембран клеток хозяина, т.к. геном вируса гриппа не содержит информации для их синтеза. В структурном отношении липидная оболочка вируса мало отличается от обычных биологических мембран (Comrans et al, 1979).

Внутренняя поверхность мембраны выстлана **мембранным белком (M1-белком)**, который гидрофобен и находится в тесном контакте с липидной мембраной. Масса белка M1 составляет 25 кДа, он образует внутри вируса слой толщиной 35-40 ангстрем. На долю M1-белка приходится 40% всей массы белка вириона (Кингсбери, 1989).

M1-белок отвечает за взаимодействие с HA и NA. Предполагают, что его контакт с поверхностными белками связан с электростатическими взаимодействиями. Кроме этого, M1-белок взаимодействует с нуклеопротеином и РНК вируса.

Взаимодействие M1-белка с нуклеопротеином осуществляется с помощью его С-конца (аминокислотные остатки с 165 по 252) (Baudin et al, 2001). За связь с РНК отвечает гидрофильный домен с 93 по 127-й аминокислотный остаток, так называемый Zn-фингер мотив (Busher et al., 1980). Необходимо отметить, что этот домен связывается только с одноцепочечной РНК.

M1-белок также играет важную роль в определении формы вириона, его сборки и отпочковывания, контролирует вирусную транскрипцию и транспорт РНП в клетке (Peres et al, 1998). Участие M1-белка в нуклеоплазматическом транспорте определяется наличием в нем сигналов ядерной локализации.

Функция **M2-белка** – создание ионного канала, регулирующего pH в процессе «раздевания» вируса в эндосомах. Для этих процессов требуется pH около 5,5 и протоны накачиваются внутрь с помощью данного белка. В кислой среде вирус освобождается от оболочки и РНП может выйти наружу и попасть в ядро (Grambas et al, 1992).

M2-белок является тетрамером, каждый мономер состоит из 96 аминокислотных остатков, 23 из них составляют N-терминальный внеклеточный домен. Ионный канал образуют аминокислотные остатки с 30 по 41 (Pinto et al, 1997). За высокую протонную селективность отвечает остаток гистидина в 37 положении, а триптофан в 41 положении играет роль «ворот», открывая и закрывая ионный канал (Grambas et al, 1992).

**Нуклеопротеин (NP)** – полипептид с молекулярной массой 60 тыс.Да, взаимодействует с М-белком и с РНК (Кингсбери, 1989). Контакт с РНК наблюдается практически по всей длине молекулы, вероятно, за счет электростатического взаимодействия, при этом каждый мономер NP-белка взаимодействует с 24 нуклеотидами РНК (Elton et al, 1999).

NP-белок играет важную роль в транскрипции вирусного генома и транспорте вирусной РНК в ядро и из ядра клетки-хозяина. Выполнение белком NP транспортных функций связано с наличием в его структуре сигналов ядерной локализации. В его структуре обнаружено два типа таких сигналов. Первый состоит из одной области аминокислотных остатков, а второй включает в себя две области аминокислотных остатков, разделенных между собой последовательностью из 10 аминокислотных остатков (Weber et al., 1998).

**РНК-зависимая РНК-полимераза**, находящаяся в тесном контакте с NP-белком и РНК, является мультифункциональным комплексом и состоит из трех белков: PB1, PB2 и PA с молекулярными массами 96кДа, 87 кДа и 85 кДа, соответственно. (Voivin et al, 2010). Этот комплекс белков взаимодействует с

двумя концами каждого фрагмента РНК. Кроме того, комплекс PB1 и PB2 взаимодействует с NP-белком.



Рисунок 6. Трехмерная модель полимеразы вируса гриппа (Area et al,2004).

PB1-белок является сердцевинной полимеразного комплекса, он отвечает за катализ РНК зависимого РНК-синтеза, а также основной субъединицей для сборки вирусных полимераз. Он контактирует с PB2 и с PA, но контакта PB2 с PA не обнаружено (Toyoda et al,1996). Взаимодействие PB1 с PB2 осуществляется последовательностями аминокислотных остатков, находящимися, соответственно, на С-конце PB1 (158й аминокислотный остаток) и N-конце PB2 (249-й аминокислотный остаток), а взаимодействие PB1 и PA – посредством 150-го аминокислотного остатка на N-конце PB1 и С-конца молекулы PA (Peres et al, 1998).

PB2-белок отвечает за репликацию РНК и требуется для присоединения кэп-фрагментов от мРНК хозяина к вирусным. В его структуре есть две отдельные последовательности аминокислот, которые участвуют в связывании этих кэп-фрагментов. Одна последовательность находится на N-конце PB2 (240-252 аминокислотные остатки), другая – на С-конце молекулы между 538-м и 577-м аминокислотными остатками (Doan, 1999).

Субъединица PA не имеет гомологии с другими белками полимеразы. Она обладает эндонуклеазной активностью, именно она отщепляет кэп от мРНК хозяина. (Voivin et al, 2010). Кроме того, известно, что этот белок индуцирует

протеолитические процессы, приводящие к снижению уровня накопления собственного белка и коэкспрессируемых белков (Huarte et al, 2001).

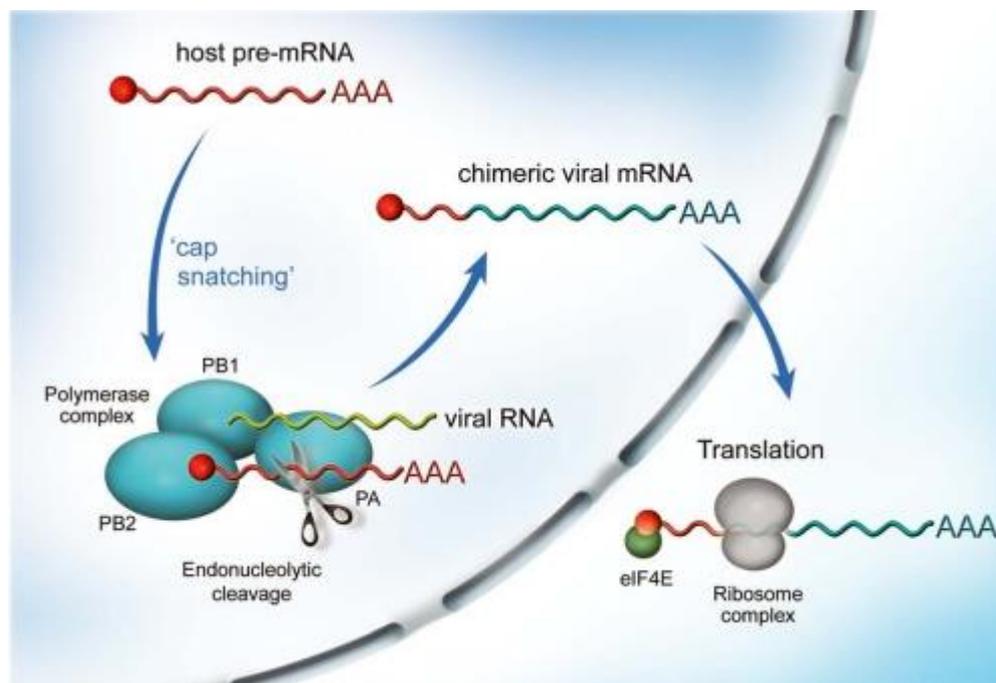


Рисунок 7. Отщепление кэпа от мРНК хозяйской клетки (Voivin et al, 2010).

Функции неструктурных белков **NS1** и **NS2 (NEP)** связаны с репродукцией вируса гриппа. **NS1-белок** снижает активность протеинкиназы, активируемой двухцепочечными РНК, что приводит к снижению синтеза интерферонов, т.е. подавлению антивирусного ответа со стороны хозяина (Wang et al, 2001). Кроме того, NS1 подавляет полиаденилирование мРНК хозяина, ингибирует транспорт хозяйских полиАмРНК из ядра в цитоплазму, сплайсинг пре-мРНК, стимулирует трансляцию вирус-специфических мРНК, модулирует транскрипцию и репликацию геномной РНК вируса (Ершов и др., 2005). Так как сам вирус не использует процесс полиаденилирования для своих мРНК, то подавляется ядерный экспорт только клеточных мРНК и вирусные мРНК получают преимущество.

**NS2-белок (NEP)** принимает участие в транспорте РНП из ядра в цитоплазму, что важно для дальнейшей сборке вириона. Это происходит путем взаимодействия NS2 с клеточным белком CRM1, который является клеточным

фактором транспорта белков из ядра в цитоплазму. На N-концах обоих белков обнаружены аналогичные лейцин-богатые последовательности (Ruigrok et al, 1998).

**Геном** вируса гриппа представлен одноцепочечной РНК негативной полярности (реализация информации такой РНК происходит путем синтеза мРНК на основе вирусной РНК, т.е. вирусная РНК сама не является матричной), на долю которой приходится 1–5% массы вириона.

Геном вируса гриппа состоит из 8 сегментов (см. таблицу 1), фланкированных обращенными короткими повторами, образующими двуспиральную шпильку. Образование шпильки приводит к циклизации сегмента вирионной РНК вируса. В области шпильки локализованы промоторные участки и участки инициации синтеза (+) и (-) цепей РНК. Эта же область несет функции сигнала капсидации (Покровский, 2005).

Таблица 1. Сегменты генома вируса гриппа типа А и функциональная роль продуктов экспрессии в репликативном цикле вируса (Покровский, 2005), (Muramoto et al, 2013) .

Сегмент	Название полипептида	Функции
I	PB2	Компонент транскриптазного комплекса: связывание 5`концевых кэпов мРНК
II	PB1	Компонент транскриптазного комплекса: элонгация синтеза РНК
	PB1-F2	Виропорин - вызывает образование пор в митохондриях и индуцирует апоптоз.
	PB1-N40	Функция неизвестна

III	PA PA-X PA-N155 PA-N182	Компонент транскриптазного комплекса: эндонуклеаза Функция неизвестна Функция неизвестна Функция неизвестна
IV	HA	Гемаггютинин: распознавание и связывание с рецептором. Нативная структура – тример. Фьюзогенные пептиды HA2 формируют атакующий комплекс
V	NP	Нуклеопротеин: основной компонент вирусного РНП, компонент транскриптазного комплекса, осуществляет контроль ядерно-цитоплазматического транспорта РНК
VI	NA	Нейраминидаза: отщепление остатков сиаловых кислот, освобождение вирусов от рецепторов плазматических мембран, почкование
VII	M1  M2	Основной компонент вирусных мембран. Обеспечивает процессы самосборки вирусных частиц и их почкование.  Образует ионный канал – протонную помпу
VIII	NS1  NS2(NEP)	Неструктурный белок: локализуется в ядре, контролирует сплайсинг и полиаденилирование.  Неструктурный белок, контролирует ядерно-цитоплазматический транспорт мРНК.

Центральный участок шпильки выполняет функции промотора. Концевые геномные шпильки являются важными элементами контроля репликации и

транскрипции фрагментов вирусного генома, их назначение состоит в генетическом контроле экспрессии генома вирусов гриппа А у различных хозяев (Scholtissek, 1996)

Большинство сегментов генома вируса гриппа кодируют по одному полипептиду. Это относится к фрагментам I, III, IV, V и VI. Фрагменты VII и VIII кодируют две рамки считывания, транскрипты которых подвергаются сплайсингу. В результате образуется по 2 мРНК, кодирующие соответственно белки M1 и M2, NS1 и NS2 (Wang et al., 2001).

Фрагмент II, как было обнаружено в 2001, также имеет дополнительную короткую рамку считывания, кодирующую белок длиной 87 аминокислотных остатков – PB1-F2 (Wang et al., 2001). Данный белок вызывает образование пор в митохондриях, что нарушает транслокацию одновалентных катионов и ионов H<sup>+</sup>, что приводит к деполяризации внутренних мембран митохондрий. Деполяризация приводит к блокаде транспорта электронов в цепи окислительного фосфорилирования, что, в свою очередь, приводит к выбросу в цитоплазму цитохрома C и индукции апоптоза (Ершов и др., 2005).

У вируса гриппа, как показали последние исследования, есть целый ряд небольших полипептидов, которые синтезируются с помощью сдвига рамки считывания. К этой категории относятся белки PB1-N40 (закодирован во втором фрагменте РНК) и PA-X, PA-N155, PA-N182 (в третьем фрагменте) (Muramoto et al, 2013). Функции этих белков пока остаются не до конца ясными.

**Жизненный цикл.** При заражении клетки молекула HA0 вируса гриппа с помощью трипсиноподобных ферментов вне клетки разделяется на HA1 и HA2. С помощью HA1, который взаимодействует с сиаловой кислотой клеточной поверхности, вирус прикрепляется к цитоплазматической мембране. После прикрепления к мембране, вирус проникает в клетку путем эндоцитоза. Аминоконцевой фрагмент HA2 играет ключевую роль в слиянии мембраны

клетки с вирусной мембраной и последующего проникновения РНК в цитоплазму (Покровский, 2005).

В отличие от многих РНК-содержащих вирусов, РНК-зависимая РНК-полимераза вируса гриппа не обладает способностью осуществлять кэпирование и инициацию синтеза молекул мРНК, в связи с чем вирус вынужден пользоваться 5' концом клеточных мРНК, синтезированных клеточной РНК-полимеразой II (Ruigrok et al, 1998). На первой стадии клеточная мРНК лизируется на расстоянии 10-15 нуклеотидных остатков от кэпа с помощью вирусной эндонуклеазы. На следующей стадии происходит присоединение к затравке остатка гуанина, что осуществляется вирусной транскриптазой. Дальнейшая элонгация происходит под действием того же фермента.

Далее, вирусу необходимо присоединить к мРНК полиаденилатный «хвост» для правильной трансляции. Клеточные мРНК получают его после того, как белок CPSF распознает специфическую последовательность AAUAAA в пре-мРНК и присоединяет туда полиаденилатную последовательность. Вирусные РНК не содержат такой последовательности, вместо этого вирусная полимераза остается связанной с 5' концом матрицы, что приводит к стерической блокаде в конце синтеза РНК. Каждый вирусный сегмент содержит отрезок из 5-7 урацилов, который в результате вирусная полимераза прочитывает несколько раз и формирует таким образом полиаденилатный «хвост» (Samji, 2009). Этот механизм называется «заиканием».

За репликацию отвечает тот же набор ферментов (PB1, PB2, PA и NP), что и за транскрипцию. Возможно, его альтернативное использование связано с изменениями концентрации одного или нескольких ферментов. Первичным продуктом репликации являются копии всех геномных фрагментов (кРНК). Эти копии, в отличие от мРНК, не содержат кэпов, и оба их конца строго комплементарны концам РНК-матриц. Эти антигеномные фрагменты, в свою

очередь служат матрицей для синтеза точной копии генома. И репликация, и транскрипция происходят в ядре (Кингсбери, 1989).

Репликация ведет к сборке новых нуклеокапсидов, истощающей пул нуклеокапсидных белков, в результате их концентрация уменьшается до уровня, при котором происходит переключение аппарата синтеза с репликации на транскрипцию и продолжается до тех пор, пока концентрация новосинтезированных белковых молекул не достигнет критической (Филдс и др, 1989).

По достижении критической концентрации, нуклеокапсидные белки связываются с матрицей и вызывают обратное переключение аппарата синтеза снова на репликацию.

Сборка оболочки начинается внутри клетки, на мембране эндоплазматического ретикулума (рис. 9), куда внедряются синтезирующиеся гликопротеины NA и HA. Мембранный аппарат обеспечивает их транспорт через комплекс Гольджи к клеточной поверхности. Далее происходит присоединение олигосахаридных цепей, их модификация, формирование третичной структуры и окончательная укладка изолированных белковых молекул в тримеры HA и тетрамеры NA. В отличие от других РНК-вирусов с наружной оболочкой, нуклеокапсид вируса гриппа собирается в ядре, а не в цитоплазме. При этом новосинтезированные нуклеокапсиды вируса гриппа должны проделать путь от ядерной мембраны через цитоплазму к поверхности клеточной мембраны, где расположены вирусные гликопротеины. Пространство между нуклеокапсидом и новосинтезированной вирусной оболочкой заполняется M1-белком. Для высвобождения вирионов из клетки важна NA, которая удаляет сиаловую кислоту от HA вирионов потомства, так как без этого процесса HA не может освободиться от поверхности клетки и участвовать в следующих циклах репродукции вируса (Yang et al, 1997). Таким образом, NA способствует освобождению вирусных частиц с поверхности клетки и распространению вируса в респираторном тракте (Wang et al, 2001).

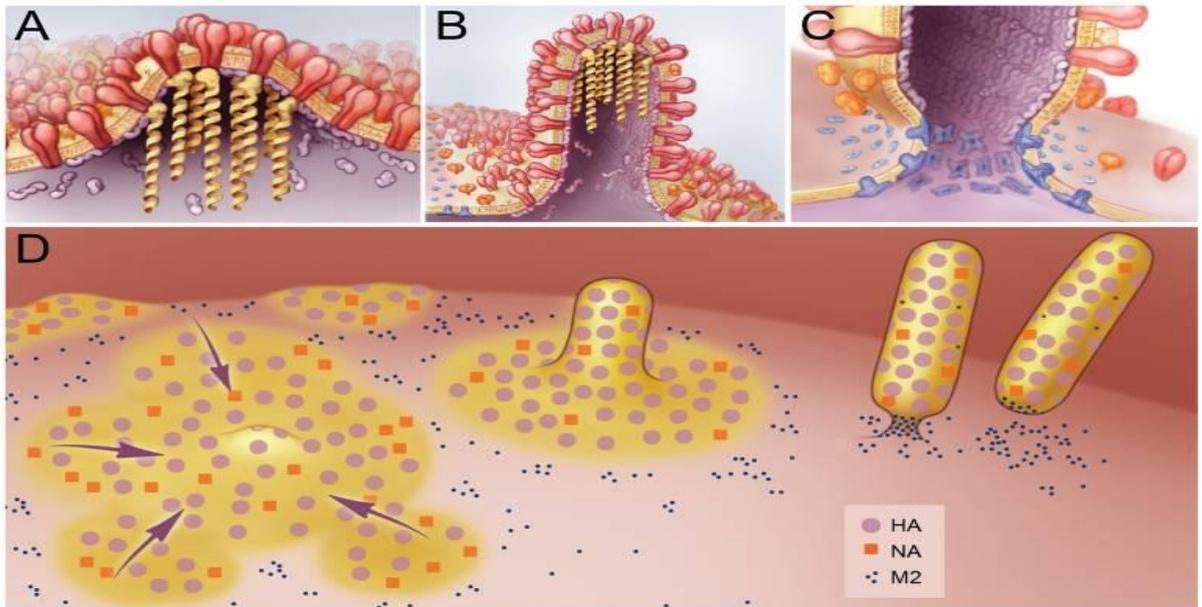


Рисунок 8. Почкование вируса гриппа (Rossman et al, 2011).

## 2.4. Современные методы профилактики и лечения гриппа

В настоящий момент основными методами борьбы с гриппозной инфекцией являются вакцинопрофилактика и химиотерапия. Оба эти метода имеют свои достоинства и недостатки, поэтому наилучший результат может быть получен при их совместном применении.

### 2.4.1. Вакцинопрофилактика

Вакцинопрофилактика относится к профилактическим методам борьбы с гриппом. За последнее время значительно улучшилось качество вакцинных препаратов, увеличился их ассортимент. При своевременной вакцинации можно либо предотвратить заболевание гриппом, либо болезнь у привитых протекает легче и без осложнений.

В России для специфической профилактики гриппа применяют живые (ЖГВ) и инактивированные (ИГВ) гриппозные вакцины. Живые вакцины производят из аллантоисной жидкости развивающихся куриных эмбрионов, для заражения которых используют аттенуированные вакцинные штаммы вируса. Применяемые вакцины являются поливалентными. Они, как правило, включают в себя три

эпидемически актуальных вируса гриппа - А (H1N1), А (H3N2) и В, в соответствии с рекомендациями ВОЗ (Литвинова и др., 2003).

Основное условие эффективности вакцин - соответствие антигенных свойств вакцинных штаммов вирусам, циркулирующим в природе и являющимся причиной текущих эпидемий гриппа. Практически все гриппозные вакцины имеют те или иные недостатки, к которым, прежде всего, относятся: низкая степень очистки и ряд противопоказаний к применению (ЖГВ), необходимость инъекционного введения, невозможность использования для защиты от гриппа самых младших возрастных групп населения (ИГВ). Кроме того, их главными общим недостатком является необходимость ежегодного обновления штаммового состава. Кроме того, ИГВ также имеют узкий диапазон защитного действия и недостаточную защиту из-за отсутствия формирования полноценного иммунитета клеточного типа.

#### **2.4.2. Химиотерапия гриппа**

Химиотерапия гриппа долгое время считалась менее перспективной областью по сравнению с вакцинопрофилактикой, однако иммунитет против конкретного штамма не обеспечивает абсолютную защиту организма от повторного заболевания, вызванного другим штаммом. Поэтому производство и использование химиопрепаратов является не только допустимым, но и необходимым. Существующие в настоящее время химиопрепараты имеют различные молекулярные мишени:

**Ингибиторы адсорбции** как правило, действуют на поверхностные белки вируса, нейраминидазу и гемагглютинин. Часто для этого используют отрицательно заряженные полисахариды, а именно декстраны. Самый известный из них — декстран сульфат, который ингибирует проникновение в клетку вирусов гриппа А и респираторно-синцитиального вируса. Наибольшей активностью обладает декстран сульфат с молекулярной массой 25-30 кДа (Hosoya et al., 1991).

**Ингибиторы декапсидации вируса** включают в себя хорошо известные производные адамантана - **амантадин** и **ремантадин** (Davies et al, 1964). Механизм действия препаратов данной группы заключается в ингибировании белка М2, который является «протонной помпой» и обеспечивает кислый рН внутри вириона, что необходимо для полноценного «раздевания» вируса в эндосоме (Нау et al, 1979). Структурные формулы этих соединений показаны на рисунках 10 и 11.

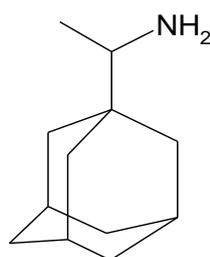


Рисунок 9. Химическая формула ремантадина (Davies et al, 1964).

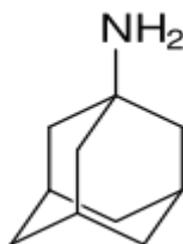


Рисунок 10. Химическая формула амантадина (Davies et al, 1964).

**Ингибиторы РНК-зависимой-РНК-полимеразы** стали использоваться в практике уже давно. Вирус гриппа имеет сегментированную вирусную РНК, где сегменты 1-3 кодируют компоненты РНК-зависимого РНК-полимеразного комплекса – PA, PB1 и PB2. Одним из наиболее известных ингибиторов синтеза вирусных нуклеиновых кислот является рибавирин (Smith et al, 1980) (рис. 11).

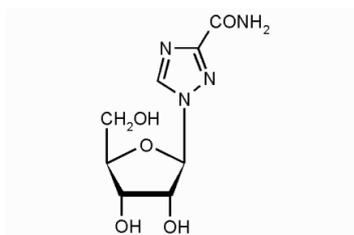


Рисунок 11. Химическая формула рибавирина (De Clercq, 1982).

**Рибавирин** (вирозол) представляет собой нуклеозидный аналог гуанозина, он действует на репликативную фазу жизненного цикла вируса гриппа за счет дестабилизации пула нуклеозидов в клетке. Механизм действия состоит в ингибировании инозин-5-монофосфатдегидрогеназы, и как следствие, уменьшении количества ксантозин— и гуанозин— монофосфата в инфицированных клетках. Это приводит к недостатку предшественников для синтеза РНК и ДНК на стадии репликации (De Clercq, 1982).

Спектр противовирусной активности рибавирина *in vitro* очень широк - он ингибирует размножение более 40 вирусов. Однако при внутривенном введении рибавирин вызывает побочные эффекты и поэтому назначается только в виде ингаляций (Wu et al, 2003).

К этой же группе примыкает препарат российского происхождения **арбидол** (рис.12). Препарат проявляет активность в отношении очень широкого спектра вирусов, включая геморрагические лихорадки и гепатиты, причем для разных вирусов он ингибирует разные стадии жизненного цикла либо действует непосредственно на клеточные белки (Blaising et al, 2014). Доказано, что в случае вируса гриппа арбидол взаимодействует с вирусным гемагглютинином (Leneva et al, 2009).

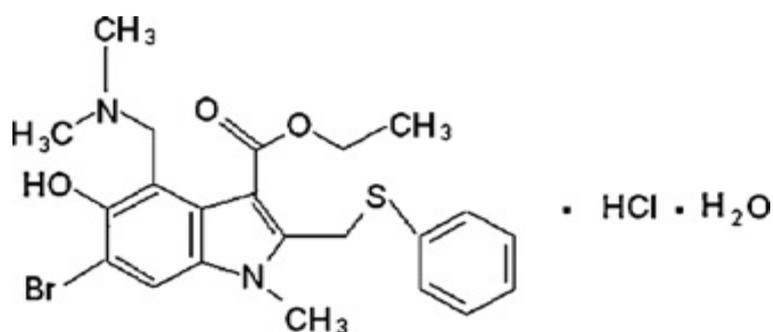


Рис. 12. Химическая формула арбидола (Leneva et al, 2009).

В настоящее время на третьей стадии клинических испытаний находится препарат **фавипиравир** (Т-705) - 6-фтор-3-гидрокси-2-пиазинкарбоксамид (рис.13) (Furuta et al, 2013). Под действием клеточных ферментов препарат

превращается в фавипавир-рибофуранозил-5`-трифосфат (ФРТФ), который вирусная полимераза ошибочно принимает за пуриновый нуклеотид. Помимо вируса гриппа, фавипиравир также обладает ингибирующими свойствами в отношении ряда аренавирусов (мачупо, хунин, пичинде), флебовирусов (лихорадки Рифт-Валли, Пунто Торо), хантавирусов (мапорал, добрава), флавивирусов (лихорадка Западного Нила и желтая лихорадка), энтеровирусов (полио- и риновирусов), альфавирусов, парамиксовирусов и т.д (Furuta et al, 2013).

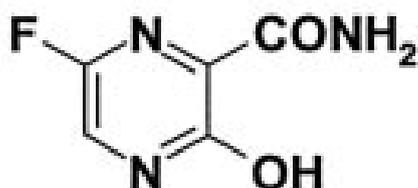


Рисунок 13. Химическая формула фавипиравира (Т-705) (Furuta et al, 2013).

**Ингибиторы нейраминидазы** являются очень широко распространенными препаратами.

Первым ингибитором нейраминидазы был препарат занамивир (Рис. 14), разработанный в начале 90х (Woods et al, 1993).

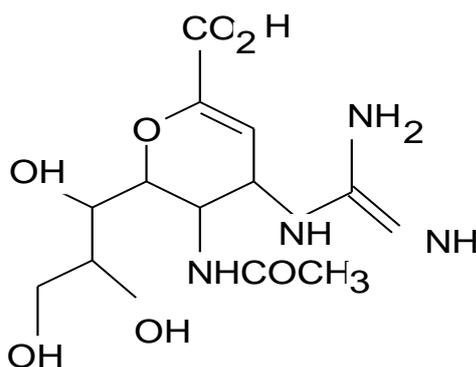


Рисунок 14. Химическая формула занамивира (McNicholl et al, 2001).

Вследствие низкой биодоступности занамивира (меньше 5%) он эффективен и используется в форме аэрозольной ингаляции (McNicholl et al, 2001) или интраназального спрея (Burls et al, 2002) что обеспечивает его доставку к месту

непосредственной репликации вируса в клетках респираторного тракта. Однако это может ограничивать его назначение людям пожилого возраста и детям, имеющим проблемы с вдыханием препарата из-за дискомфорта в носоглоточной полости (Loughlin et al, 2002). Кроме того, существует опасение возможности развития спазма у пациентов, страдающих бронхиальной астмой (Massarella et al, 2000). Были сделаны попытки применять занамивир внутривенно, но в клинической практике это методика не используется (Cole et al, 2002).

Фармацевтическая компания F. Hoffmann – La Roche (Швейцария, Базель) инициировала исследования по поиску другого нейраминидазного ингибитора, который был бы эффективен при системном применении (Schirmer et al, 2009). В результате синтеза и изучения большого количества ингибиторов нейраминидазы на фармацевтическом рынке появился **озельтамивир** (Тамифлю) (Рис. 15).

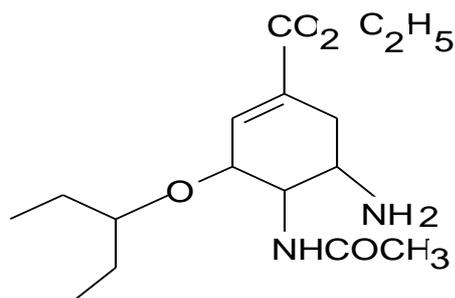


Рисунок 15. Формула озельтамивира (Schirmer et al, 2009).

В 1999 г. озельтамивир был утвержден для лечения и профилактики гриппа А и В у взрослых (Doucette et al, 2001) и детей, в настоящее время препарат производится в виде капсул по 75 мг, также для детей зарегистрирован порошок для приема внутрь в виде суспензии.

Также в Японии были разработаны еще два ингибитора нейраминидазы – перамивир (рис.16) и ланинамивир (рис.17). Перамивир используется для внутривенного введения, а ланинамивир – для ингаляций (Kubo et al, 2011). Широкого применения эти препараты не получили.

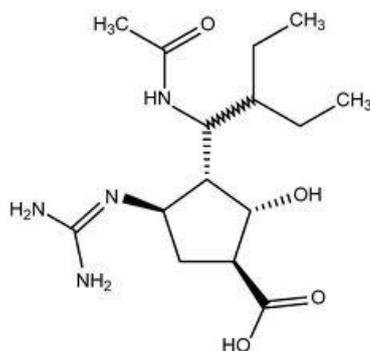


Рисунок 16. Формула перамивира (Kubo et al, 2011).

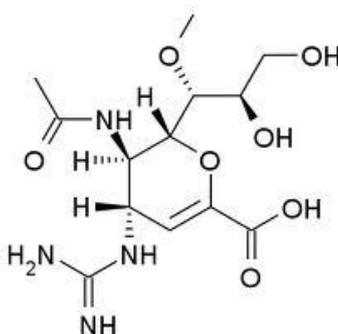


Рисунок 17. Формула ланимавира (Kubo et al, 2011).

**Индукторы интерферонов** представляют собой группу разнородных в химическом отношении веществ, объединенных способностью вызывать синтез интерферона. Эти препараты проявляют широкий спектр противовирусной активности и достаточную длительность действия. Среди веществ этой группы большой интерес представляют производные акридонов, например циклоферон (рис.18).

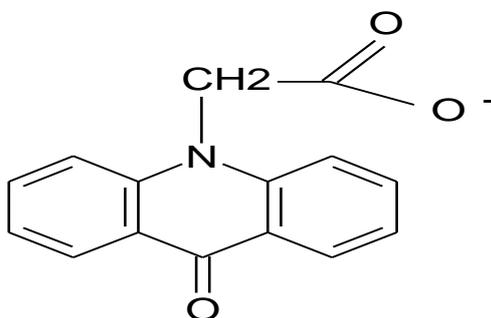


Рисунок 18. Формула циклоферона (Kramer et al, 1976).

Это вещество эффективно против бактерий, простейших, ингибирует рост злокачественных опухолей, обладает радиопротективной активностью.

Механизм действия препарата основан на индукции синтезе  $\alpha$ -интерферона (Inglot et al, 1985).

Другой низкомолекулярный индуктор интерферонов—это амиксин (тилорон) (рис.19), производное флуоренов.

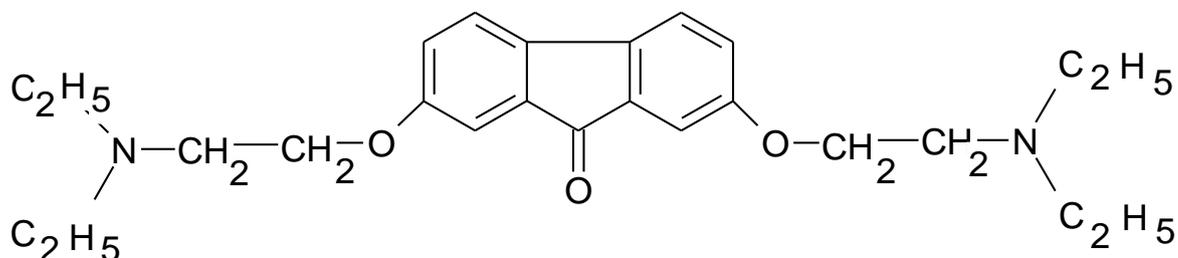


Рисунок 19. Формула амиксина (Chandra et al, 1974).

Амиксин индуцирует выработку интерферонов всех трех типов ( $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ ), а также напрямую подавляет репликацию вирусных нуклеиновых кислот (Покровский, 2005).

## 2.5 Биологическая активность усниновой кислоты и ее производных

### 2.5.1. Общие сведения.

Усниновая кислота (рис.20) (2,6-диацетил-7,9-дигидрокси-8,9b-диметил-1,3(2H,9bH)-добензофурандион) является одним из специфических веществ, которые образуются в процессе метаболизма лишайников относящихся к семейству Usneaceae и не встречаются в других группах организмов. Существует как в лево (-) -, так и правовращающей (+) форме (Лазуревский и др, 1966).

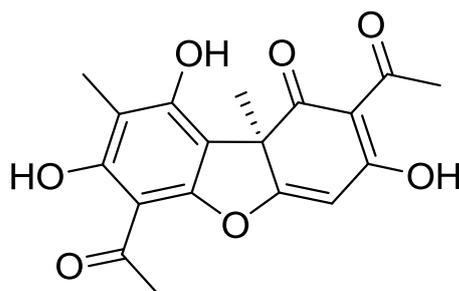


Рисунок 20. Формула (+) усниновой кислоты (Лазуревский и др, 1966).

Предполагают, что усниновая кислота выполняет в лишайниках роль защиты от излишней кислотности. Лишайники, имеющие в своем составе это вещество, поддерживают рН между 3,5 и 5,5 (чаще всего 4,0-4,5), чем облегчают фотосинтез водородословому компоненту лишайников (Nauck et al, 2008). Кроме того, усниновая кислота имеет горький вкус и защищает тем самым лишайник от поедания животными.

### **2.5.3. Антибактериальная активность усниновой кислоты.**

Самые первые исследования усниновой кислоты показали, что она обладает антибактериальной активностью в отношении многих грамм-положительных бактерий и микобактерий (Shibata et al, 1948), (Stoll et al, 1965).

В России из усниновой кислоты вырабатывают препарат бинан — мономерную натриевую соль, кристаллизующуюся с двумя молекулами воды. Бактериостатическое действие препарата отмечено в отношении золотистого стафилококка, различных стрептококков, анаэробов, пневмококков и туберкулезной палочки. Представляет собой эффективное наружное средство антимикробного действия для лечения нагноившихся раневых поверхностей. Применяется в хирургии для лечения свежих и инфицированных ран, варикозных и трофических язв и острого гнойного воспаления мягких тканей, а также при травматическом остеомиелите и ожогах II и III степени.

Показана высокая активность усниновой кислоты в отношении большого количества видов бактерий: *Clostridium perfringens*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides loeschii*, *Propionibacterium acnes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* и *Staphylococcus aureus* (Lauterwein et al, 1995). В данном случае антибиотическая активность была сравнима с ампициллином.

В ранних исследованиях было показано, что усниновая кислота подавляет рост штаммов *Streptococcus mutans*, извлеченных из кариесных полостей пациентов,

что привело к созданию зубной пасты, содержащей 1% (+) усниновой кислоты (Ghione et al, 1988). Вследствие того, что усниновая кислота подавляет многие микроорганизмы, ответственные за образование специфического запаха пота, она используется в некоторых дезодорантах, а так же в тональных кремах для предотвращения прыщей (Bergerhausen, 1976).

Наибольшее внимание привлекло использование усниновой кислоты при лечении туберкулеза. Кроме того, усниновая кислота выгодно отличается от других антибиотиков своей термостабильностью. Все эти факторы делают усниновую кислоту настолько привлекательной для терапии, что даже была предложена специальная диета для туберкулезных больных с добавлением лишайников (Савватеева и др, 2010).

Весьма интересным представляется применение усниновой кислоты против бактерий, устойчивых к действию традиционно используемых антибиотиков. Правовращающая (+) усниновая кислота оказалась активной в отношении мультирезистентного штамма *Mycobacterium aurum*, непатогенного микроорганизма, близкородственного возбудителя туберкулеза (Ingolfssdottir et al, 2002). В отношении энтерококков, устойчивых к ванкомицину, усниновая кислота была активна даже в небольших дозах (Dailey et al, 2008). Кроме того, показано, что усниновая кислота снижает рост метициллин-устойчивых штаммов *Staphylococcus aureus* и препятствует образованию биопленок и могут быть рекомендованы для больных муковисцедозом (Pompilio et al, 2013).

#### **2.5.4. Противопаразитарные свойства усниновой кислоты.**

Усниновая кислота также проявляет ингибирующие свойства в отношении некоторых простейших. При изучении влияния усниновой кислоты, полученной из *Cladonia substellata*, на паразитическое простейшее *Trypanosoma cruzi*, возбудителя сонной болезни, оказалось, что препарат оказывает ингибирующее действие на все жизненные формы трипаносомы. Наблюдался лизис

тропомастиготных форм, у эпимастиготных форм показано разрушение митохондрий и снижение объема кинетопласта. При воздействии на зараженных трипаносомами макрофагов наблюдались различные нарушения митохондрий и кинетопласта, вакуолизация цитоплазмы. Следует особо отметить, что существенных нарушений в структуре макрофагов хозяина при этом отмечено не было (De Carvalho et al, 2005).

Активность одной усниновой кислоты в отношении малярийного плазмодия не очень высока, однако, в сочетании с такими препаратами, как дигидроартемизин, она обеспечивает защиту от *Plasmodium falciparum*, в опытах *in vivo* на мышах (Bruno et al, 2013).

#### **2.5.5. Противоопухолевая активность усниновой кислоты.**

Противоопухолевые свойства усниновой кислоты изучаются уже давно. Еще в 1979 году Takai et al показали, что (-)усниновая кислота обладает цитотоксическими свойствами в отношении опухолевых клеток LI210 и P388.

Усниновая кислота также проявляет антипролиферативную активность в отношении клеток человеческой карциномы HaCaT, причем разрушения мембран клеток не наблюдается, так что активность является цитостатической, а не цитотоксической (Kumar et al, 1999). При исследовании противоопухолевой активности нанокапсул, содержащих усниновую кислоту в отношении асцитных опухолей показано их уменьшение на 26,4% (da Silva Santos et al, 2006).

При исследовании возможных механизмов действия предположили, что мишенью усниновой кислоты является белок p53 – клеточный антионкоген. Усниновую кислоту проверили на противовирусную активность в отношении опухолевых линий MCF7 с нормальным белком p53 и MDA-MB-231 с дефектным p53, так и линии H1299, где p53 отсутствует совсем. Показано, что этот препарат угнетал рост всех линий одинаково. Таким образом, можно твердо сказать, что

противоопухолевые свойства усниновой кислоты не связаны с белком p53 (Mayer et al, 2005).

### 2.5.6. Противовирусная активность усниновой кислоты.

Противовирусная активность усниновой кислоты значительно менее изучена, чем антибактериальная, однако отдельные работы в этом направлении ведутся. В частности, были получены данные о том, что усниновая кислота ингибирует мышинные полиовирус на культуре клеток 3Т6. Точный механизм действия еще не изучен, однако ясно, что противовирусная активность не связана с моментом входа вирусных частиц в клетку, кроме того, опыты по времени добавления показали, что присутствие усниновой кислоты наиболее критично для вируса в поздние сроки – 24 часа после инфицирования и более. Возможно, усниновая кислота блокирует выход вирионов из клеток, однако, есть также предположение, что она замедляет скорость транскрипции вирусных мРНК (Campanella et al, 2002).

Также усниновая кислота проявляет противовирусную активность в отношении вируса Эпштейн-Барр в клеточных культурах. Из лишайника *Usnea longissima* получили пять веществ – усниновую кислоту, барбатовую кислоту, еверниковую кислоту, диффрактивную кислоту и 4-О-диметилбарбатовую кислоту. Из них наибольшую активность проявила именно усниновая кислота, ее IC<sub>50</sub> составила 1.0 мкМ (Yamamoto et al, 1995) в то время как для остальных препаратов значения IC<sub>50</sub> были 5 мкМ и выше.

Было показано, что (+) усниновая кислота ингибирует цитопатическое действие вируса простого герпеса 1 типа и полиовируса 1 типа в культуре клеток BS-C-1, при чем ее не вводили в раствор, а наносили на диски из фильтровальной бумаги и прикладывали к инфицированным клеткам (Perry et al, 1999).

В клинических экспериментах, проведенных в Италии при участии 100 пациенток, усниновая кислота в сочетании с сульфатом цинка при

интравагинальном введении оказывала ингибирующее действие на генитальный папилломавирус (Scirpa et al, 1999).

Кроме того, усниновая кислота проявляет активность против против аренавируса Junin, возбудителя аргентинской гемморагической лихорадки (Fazio et al, 2007).

Таким образом, усниновая кислота является перспективным противовирусным препаратом, который требует дальнейшего изучения.

### **2.5.7. Токсикологические характеристики усниновой кислоты.**

Существенным недостатком усниновой кислоты является ее высокая токсичность, в особенности для тканей печени. Данный препарат входит в состав некоторых средств для похудения, описаны случаи острой печеночной недостаточности после 3 месяцев приема пищевой добавки, содержащей усниновую кислоту, причем в одном случае пациенту понадобилась пересадка печени. У другого пациента развился некроз печени, однако без пересадки удалось обойтись (Sanchez et al, 2006). К сожалению, авторы не уточняют название пищевой добавки.

Есть вероятность, что речь в данном случае идет о пищевой добавке Липокинетикс которая используется для снижения веса и содержит усниновую кислоту. После ее исследования на гепатотоксичность, оказалось, что данный препарат обладает ярко выраженной токсичностью для мышинных гепатоцитов. Введение препарата вызывало гибель до 98% клеток в течение 16 часов. Следует отметить, что все клетки погибли путем некроза, а не апоптоза. Непосредственной причиной гибели клеток стало нарушение процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях. После введения усниновой кислоты резко падал уровень АТФ в гепатоцитах (Novak et al, 2003).

Кроме того, токсическое действие усниновой кислоты связано с оксидативным стрессом. Доказательством служит то, что в случае предварительного введения антиоксидантов количество клеток, погибших от некроза, сокращалось до 70% при тех же дозах. Таким образом, усниновая кислота является сильным гепатотоксическим агентом, который запускает механизм оксидативного стресса и нарушает нормальные метаболические процессы в клетке (Han et al, 2004).

Усниновая кислота опасна не только для людей, но и для животных. Так, зимой 2004 года в Вайоминге была отмечена гибель около 450 лосей, предположительно из-за отравления лишайником *Chlorochroa Xanthoparmelia*, в состав которого в больших количествах входит усниновая кислота. Для проверки гипотезы, что усниновая кислота является непосредственной причиной смерти у животных, отравленных лишайником, было проведено исследование токсичности усниновой кислоты на домашних овцах.

После введения усниновой кислоты у овец наблюдались следующие симптомы: вялость, отсутствие аппетита, боли в животе. В сыворотке крови было значительно повышено по сравнению с нормой содержание креатинкиназы, аспаратаминотрансферазы и лактатдегидрогеназы. При вскрытии погибших животных отмечались дегенеративные изменения скелетной мускулатуры (Dailey et al., 2008 ).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что снижение веса, наблюдаемое при использовании усниновой кислоты является прямым следствием ее токсичности. Следует избегать ее назначения с данными целями. Однако, существует необходимость применения усниновой кислоты, например в качестве антибиотика. Для снижения ее токсического действия было предложено использовать нанокапсулы с полимерной поверхностью. При этом гепатотоксичность значительно снижалась, а биологическая активность оставалась высокой (da Silva Santos et al, 2006).

В целом, усниновая кислота является высокоактивным природным соединением, которое проявляет противобактериальные, противопаразитарные, противоопухолевые, а также противовирусные свойства. В настоящей работе оценен противовирусный потенциал УК и ее производных, исследовано их влияние на отдельные стадии вирусного жизненного цикла, а также изучена роль химической модификации в снижении токсичности наиболее активных соединений *in vivo*.

### **3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

#### **3.1. Исследуемые препараты**

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

#### **3.2. Вирусы и клетки**

В работе использовали штаммы вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1), A/Aichi/2/68 (H3N2), A/California/7/09(H1N1)pdm, 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 CO<sub>2</sub> 5% до образования клеточного монослоя на дне планшетов.

#### **3.3. 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.

#### **3.4. 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 CO<sub>2</sub> 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 ЦТД<sub>50</sub>, то есть дозу препарата в лунке, при которой происходит 50% деструкция клеточного монослоя. Исходя из значения ЦТД<sub>50</sub> рассчитывали рабочие концентрации препарата.

### **3.5. Подготовка вируса**

Вирусы гриппа культивировали в 10-11 дневных куриных эмбрионах, вводя в аллантаоисную полость 1-10 ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл вирусосодержащей аллантаоисной жидкости (ВАЖ) и инкубировали 48 часов при +37°C.

### **3.6. Определение противовирусной активности препаратов.**

В монослойную культуру клеток MDCK на 96-луночном планшете добавляли двукратные разведения препаратов, начиная с  $\frac{1}{2}$  ЦТД<sub>50</sub>, растворенные в клеточной среде, после чего выдерживали планшеты в CO<sub>2</sub> инкубаторе 1 час при 37°C. Далее клеточную культуру заражали 10-кратными разведениями вируса от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-6</sup>. В качестве контроля вместо препаратов вносили чистую культуральную среду. Микропланшеты с вирусом и препаратами инкубировали в CO<sub>2</sub> инкубаторе 48 часов при 37°C (5% CO<sub>2</sub>). 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 ЭД<sub>50</sub>, то есть дозу препарата, при которой титр вируса снижается вдвое. Основным критерием при изучении специфического противовирусного действия исследуемых соединений считали показатель ХТИ, определявшийся отношением ЦТД<sub>50</sub> к ЭД<sub>50</sub>. Активными считались препараты, ХТИ которых был 10 и выше.

### **3.7. 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 LD<sub>50</sub> (Reed, Muench, 1938). Мышей заражали дозами LD<sub>50</sub> и 10 LD<sub>50</sub> в объеме 50 мкл/мышь.

Препараты вводили внутривентриально. Вначале исследовали серию двукратных разведений для определения 50% летальной дозы препарата. Далее препараты

вводили в дозе  $1/5 LD_{50}$  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.

### **3.8. 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  $37^{\circ}\text{C}$  в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ .

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

### **3.9. Получение гистологических срезов и проведение гистологической и иммуногистохимической 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
- ксилол – 5 мин
- смесь спирт/ксилол (1:1) – 5 мин
- 96% спирт – 2 мин
- 96% спирт – 2 мин
- 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
- ксилол – 2 мин

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.

Для проведения иммуногистохимической окраски срезы дважды проводили через ксилол, далее четырежды через 96% этиловый спирт, потом помещали на 30 минут в 0,3% раствор перекиси водорода. По истечении данного времени срезы промывали в TBS-буфере (2,43г TRIS 17,5г NaCl /2 л дист. воды, pH=7,5). Далее наносили первичные антитела к NP-белку вируса гриппа и оставляли на ночь при температуре +5°. Утром срезы промывали в TBS-буфере и наносили вторичные антитела на 30 минут при комнатной температуре. Далее наносили DAB-chromogen (Abcam, США) на 5 минут, затем срезы снова промывали в TBS-буфере, вносили в гематоксилин на 3 минуты, промывали дистиллированной водой. Далее четырежды проводили через 96% этиловый спирт и дважды через ксилол.

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 далее исследовали под световым микроскопом.

### **3.10. 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°С.

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°С, 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 смены температур, точка 2 - через два часа после смены температур, точка 4 - через 4 часа после смены температур.

### **3.11. 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.

### **3.12. Изучение воздействия препаратов на гемагглютинин вируса гриппа.**

Метод адаптирован из протокола Maeda et al. (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  $\frac{1}{2}$  ЦТД<sub>50</sub>. 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 CaCl<sub>2</sub> 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 гемагглютинина в том случае, если значение ОП было ниже чем в контроле в два раза и более.

### **3.13. Определение ингибирования активности нейраминидазы флюоресцентным методом.**

В опыте использовали следующие реактивы:

Ферментный буфер: 32.5mM MES, pH 6.0 (Sigma, США) 4mM CaCl<sub>2</sub>

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.  $ED_{50}$  высчитывалась с помощью функции линейной регрессии в программе Microsoft Excel для Windows.

### **3.14. Компьютерное моделирование взаимодействия препаратов с рецептором.**

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.

### **3.15. 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  $1ED_{50}$ . Каждый следующий пассаж концентрацию вещества увеличивали вдвое до тех пор, пока конечная концентрация не достигала  $1/2$  ЦТД $_{50}$ . 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.

### **3.16. 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 °C – 2 мин, 94 °C – 20 с, 50 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин (30 циклов), 72 °C – 7 мин . Для амплификации использовали термоциклер C1000 (BioRad, США).

Анализ продуктов амплификации фрагментов генома вирусов 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).

### **3.17. Оценка гепатотоксичности усниновой кислоты и препарата 575.**

Для оценки гепатотоксичности соединения вводили здоровым мышам внутривбрюшинно в течение 4 дней, далее отбирали печень для гистологического исследования. Гистологическое исследование проводили как описано выше (раздел 3.9.)

### **3.18. 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.

## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 4.1. Оценка противовирусной активности препаратов в опытах *in vitro*.

#### 4.1.1. Первичный скрининг препаратов.

В качестве тестового вируса для скрининга был выбран вирус гриппа A/California/7/09 (H1N1pdm09), который является актуальным на протяжении нескольких сезонов и устойчив к препаратам адамантанового ряда.

На первой стадии экспериментов определяли 50% цитотоксическую дозу (ЦТД<sub>50</sub>) каждого препарата в культуре клеток MDCK. Далее оценивали противовирусную активность каждого препарата и определяли 50% эффективную дозу (ЭД<sub>50</sub>), а также вычисляли отношение ЦТД<sub>50</sub> к ЭД<sub>50</sub> – химиотерапевтический индекс (ХТИ). Полученные данные сравнивали с соответственными показателями ремантадина (ЦТД<sub>50</sub>=60, ЭД<sub>50</sub>=12, ХТИ=5) и озельтамивира карбоксилата (ЦТД<sub>50</sub> =300, ЭД<sub>50</sub>=0,3, ХТИ=1000). Препарат считался активным, если значение ХТИ превышало 10.

На рисунке 21 приведена общепринятая нумерация атомов остова усниновой кислоты. Она не совпадает с правилами нумерации IUPAC, однако, для природных соединений это допустимо в силу исторически сложившихся представлений.

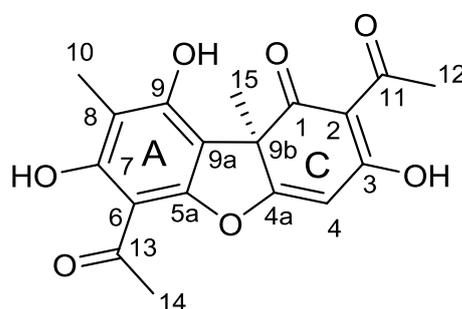


Рисунок 21. Нумерация атомов в молекуле (+) усниновой кислоты.

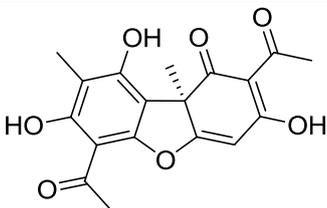
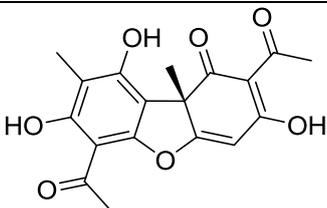
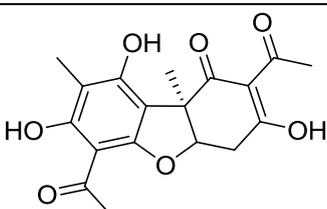
Лишайники различных видов продуцируют лево- и правовращающие энантиомеры усниновой кислоты с высокой оптической чистотой. Синтетические

трансформации в данной работе были выполнены, как правило, на базе обоих изомеров усниновой кислоты. Полученные соединения были поделены на группы и подгруппы в зависимости от пути химической трансформации и их строения.

В группе 1 представлены оба энантиомера усниновой кислоты и соединение 1027, претерпевшее незначительную модификацию, полученное восстановлением двойной связи в кольце С (+)-усниновой кислоты.

В таблице 2 представлены результаты первичного скрининга на противовирусную активность и цитотоксичность непосредственно усниновой кислоты, а также ее дигидропроизводного.

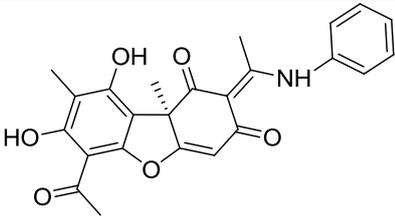
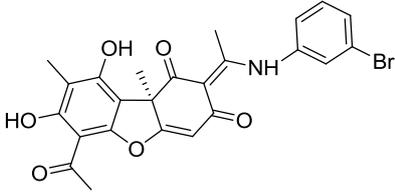
**Таблица 2. Активность изомеров усниновой кислоты и ее дигидропроизводного в отношении вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm *in vitro*.**

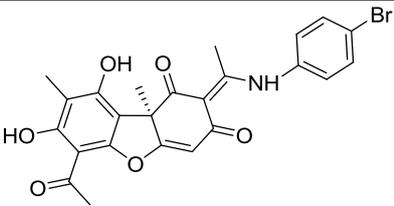
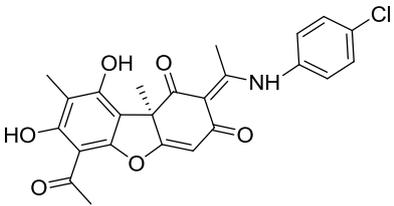
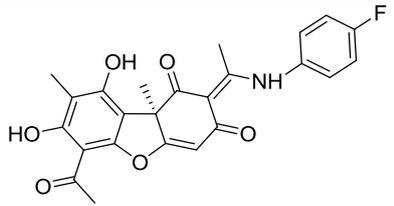
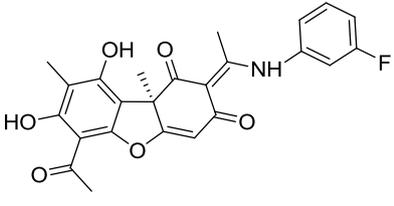
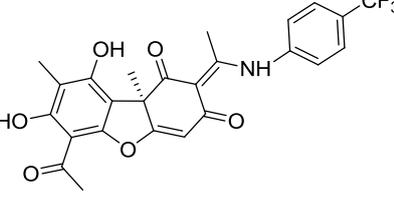
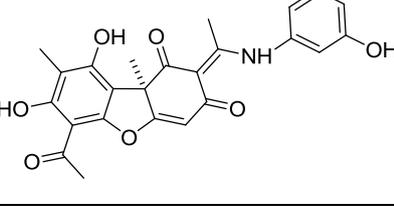
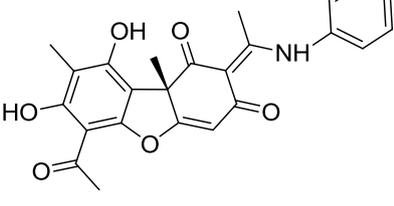
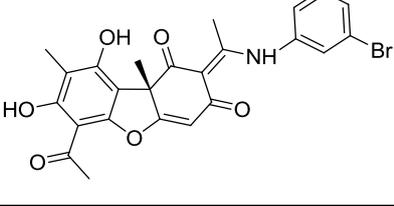
Препарат	Формула	ЦТД <sub>50</sub> , мкг/мл	ЭД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТИ
546 (+) усниновая кислота		146±10	17,8±3	8.2
547 (-) усниновая кислота		46±4	4.5±0,5	10.3
1027		4.9±0,3	2,8±0,2	1.8

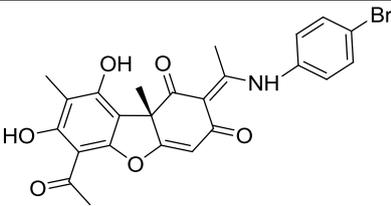
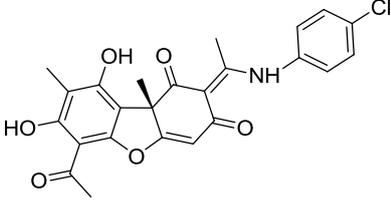
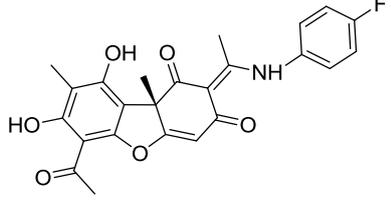
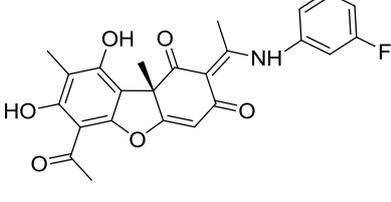
Из представленных данных видно, что (+) усниновая кислота менее токсична, чем ее энантиомер, но также и менее активна. Согласно используемым критериям, только (-) усниновая кислота может быть признана активной в отношении вируса гриппа, так как имеет значение ХТИ больше 10. Однако, при потере одной двойной связи (препарат 1027) токсичность соединения резко возрастает. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что данная двойная связь имеет существенное значение для относительно невысокой цитотоксичности усниновой кислоты.

Вторая группа препаратов (таблица 3) содержит енамины, производные усниновой кислоты с анилинами. Соединения получены реакцией экзоциклической карбонильной группы кольца С усниновой кислоты с первичными аминами ароматического строения (анилинами), сопровождающейся внутримолекулярной перегруппировкой. С целью выявления отношения «структура-активность» использованы анилины с варьированием природы и местоположения заместителей в ароматическом кольце.

**Таблица 3. Активность енаминовых производных УК с анилинами в отношении вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm *in vitro*.**

Препарат	Формула	ЦТД <sub>50</sub> , мкг/мл	ЭД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТ И
577		156±11	8.8±3	17.7
596		53±2	10±1	5.3

598		102±7	9.4±1,2	10.9
601		56±6	5.5±0,7	10.2
602		91±6	10.3±0,9	9
604		47±3	10±0,8	4.7
606		46±4	8.9±0,7	4.2
1053		2.2±0,1	1.5±0,2	1.2
576		360±25	56±4	6.4
597		43±3	10±1	4.3

599		40±3	7.3±0,4	5.5
600		56±5	5.5±0,3	10.2
603		153±12	40±3	3.8
605		40±2	4.6±0,3	8.6

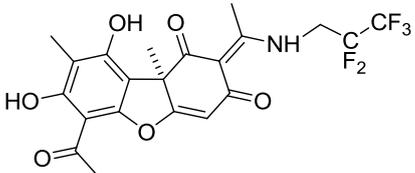
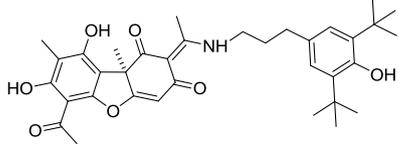
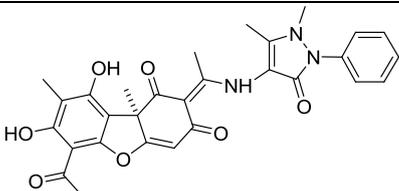
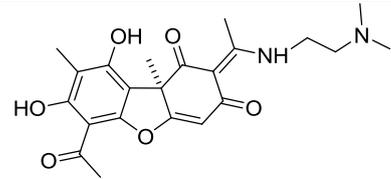
Вторую группу можно охарактеризовать как «умеренно активную». Она содержит 14 соединений, пять из которых (36%) могут быть признаны активными (имеют ХТИ больше 10). Препараты 601 и 600 представляют собой пару энантиомеров, у обоих в пара-положении присутствует атом хлора. Два других активных производных (+) усниновой кислоты (препараты 602 и 598) также имеют атом галогена (фтора или брома) в том же положении, однако их аналоги, производные (-) усниновой кислоты, активности не проявляют. Также ни один препарат, содержащий атом галогена в мета-положении не проявил активности.

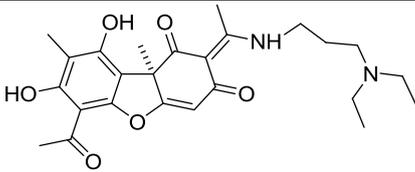
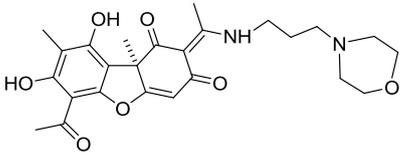
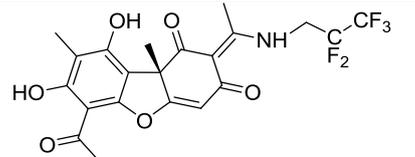
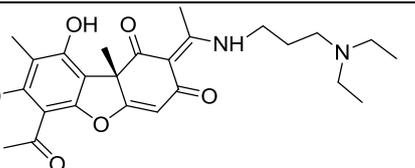
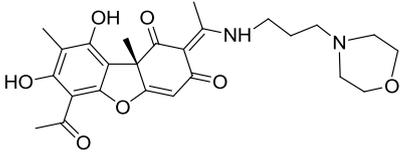
В паре 576 и 577, препаратов, не содержащих вообще ни одного атома галогена, активность проявил только препарат 577 – производное (+) усниновой кислоты.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что присутствие атома галогена в пара-положении повышает противовирусную активность соединения, особенно в случае производных (+) усниновой кислоты.

Третья группа (таблица 4) содержит енамины, производные усниновой кислоты с алифатическими аминами. Эти соединения, так же, как и в предыдущей группе, получены реакцией экзоциклической карбонильной группы кольца С усниновой кислоты с первичными аминами алифатического строения, сопровождающейся внутримолекулярной перегруппировкой. В пределах группы изучены амины с разнообразными фармакофорными фрагментами.

**Таблица 4. Активность енаминовых производных УК с алифатическими аминами в отношении вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm *in vitro*.**

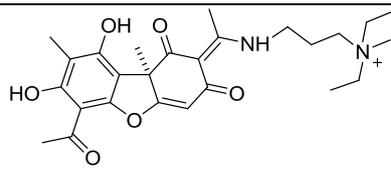
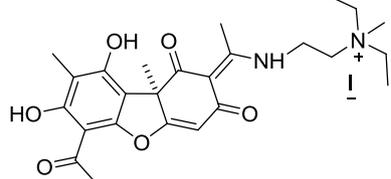
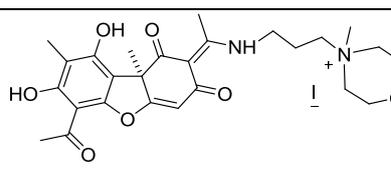
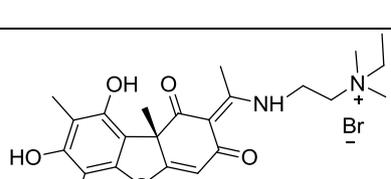
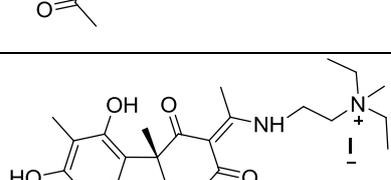
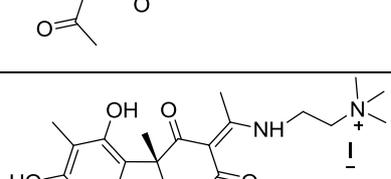
Препарат	Формула	ЦТД <sub>50</sub> , мкг/мл	ЭД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТИ
579		31.1±3	1.6±0, 2	19.4
542		58±6	7.4±0, 8	7
573		2.5±0,2	2.3±0, 3	1
1052		2±0,2	1.5±0, 1	1.3

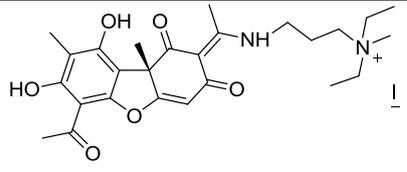
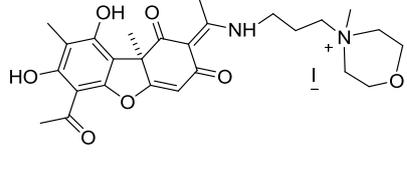
1049		5.5±0,2	3.5±0, 2	1.4
1044		79±7	10±0,8	7.9
578		195±13	16.9±0, ,9	11.5
1050		1±0,1	1±0,1	1
1041		1.6±0,2	1.6±0, 3	1
1040		56±3	6.3±0, 5	8.8

Из десяти соединений активными оказались два, 579 и 578 (20%) и они представляют собой пару изомеров. Оба содержат заместитель CF<sub>2</sub>-CF<sub>3</sub>, который, по-видимому, является важным для антивирусной активности.

В четвертую группу (таблица 5) вошли енамины, кватернизированные производные усниновой кислоты. Соединения были получены реакцией енаминов из третьей группы, содержащих третичный атом азота с иодистым метилом (реакция кватернизации). В результате получены четвертичные аммониевые соли, отличающиеся длиной линкера и объёмом заместителей у четвертичного атома азота.

**Таблица 5. Активность квартернизованных производных УК в отношении вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm *in vitro*.**

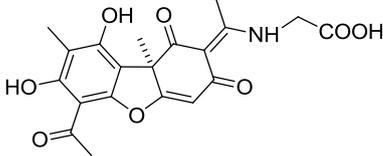
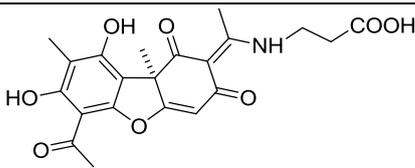
Препарат	Формула	ЦТД <sub>50</sub> , МКГ/МЛ	ЭД <sub>50</sub> , МКГ/МЛ	ХТИ
1042		2.3±0,2	2±0,1	1.1
1028		6.2±0,5	2.6±0,1	2.3
543		1.8±0,2	1.6±0,2	1.1
1029		5.8±0,2	2.4±0,2	2.4
1043		1.8±0,1	1.5±0,1	1
611		20±1	7.5±0,5	2.7
1045		4±0,3	3±0,2	1.3

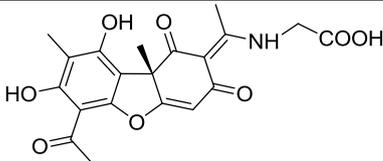
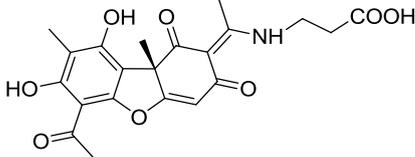
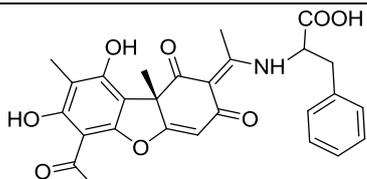
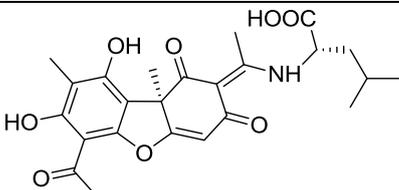
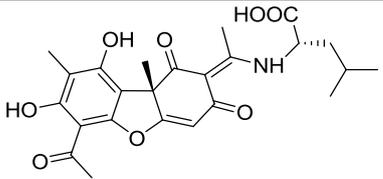
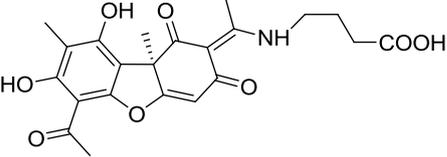
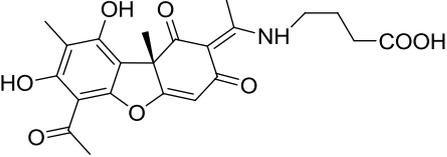
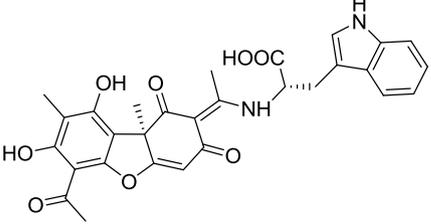
1030		5.2±0,5	3.1±0,2	1.6
1051		5.8±0,3	4±0,2	1.2

Среди соединений этой группы не было обнаружено ни одного активного соединения, что позволяет сделать вывод о том, что введение квартернизированного азота в производные усниновой кислоты резко повышает токсичность соединений, в то время как активность не повышается.

Следующая группа (таблица 6) содержит аминокислотные производные усниновой кислоты. Соединения получены реакцией экзоциклической карбонильной группы кольца С усниновой кислоты с аминогруппой аминокислот и содержат свободную карбоксильную группу.

**Таблица 6. Активность аминокислотных производных УК в отношении вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm *in vitro*. Группа 5.**

Препарат	Формула	ЦТД <sub>50</sub> , мкг/мл	ЭД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТИ
607		27±2	4.0±0,3	6
575		61±3	3±0,1	20

544		$60 \pm 2$	$4.3 \pm 0,3$	13.9
612		$60 \pm 4$	$6 \pm 0,5$	10
574		$10 \pm 0,5$	$2.9 \pm 0,3$	3.4
1449		$6 \pm 0,5$	$3 \pm 0,2$	2
1452		$15 \pm 2$	$3 \pm 0,2$	5
1447		$56 \pm 6$	$17 \pm 1$	3.9
1451		$36 \pm 5$	$12 \pm 1$	3
1450		$11 \pm 1$	$10 \pm 0,9$	1.1
1448		$10 \pm 1$	$2 \pm 0,1$	5

В этой группе активными оказались три из 11 соединений (37%), причем два из них (575 и 612) являются парой энантиомеров. Производное (+) усниновой кислоты проявляет активность в 2 раза большую по сравнению со своим изомером. Добавление фенольного заместителя (препарат 574) при равных показателях активности существенно повышает токсичность соединения и, таким образом, снижает значение его ХТИ. То же самое можно сказать и про серосодержащие, а также имидазольные производные УК. Препараты 1449 и 1452, содержащие в качестве заместителя валин, также были токсичными и неактивными.

Неожиданной оказалась высокая токсичность препаратов 1447 и 1451, которые весьма близки по структуре к наиболее активным в данной группе соединениям 612 и 575. Вероятно, повышенная токсичность в данном случае объясняется за счет большего размера аминокислотного заместителя.

Таким образом, можно охарактеризовать эту группу как «умеренно активную» и сделать вывод о том, что аминокислотная модификация повышает противовирусную активность производных УК при условии, что она не является объемной.

Группа №6 (таблица 7) содержит пиразольные производные усниновой кислоты (таблица 6). Соединения этой группы были получены реакцией экзоциклической карбонильной группы кольца С усниновой кислоты с фенилгидразинами, при этом протекает внутримолекулярная перегруппировка с образованием аннелированного кольца С усниновой кислоты пиразольного цикла. Помимо незамещенных фенилгидразинов использован фенилгидразин с трифторметильной группой в ароматическом кольце. Кроме того, получены пиразольные соединения с восстановленной эндоциклической карбонильной группой (до спиртовой) и более глубокими трансформациями кольца С (расширение и образование экзоциклического оксиранового фрагмента).

**Таблица 7. Активность пиразольных производных УК в отношении вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm *in vitro*.**

Препарат	Формула	ЦТД <sub>50</sub> , мкг/мл	ЭД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТИ
608		346±21	28±5	12
572		11±1	1±0,1	11
541		530±45	33±2	16
569		312±21	120±11	2.6
609		235±21	23±3	10
610		20±0,1	5±0,2	4

Из шести препаратов, входящих в данную группу, активными оказались 4(67%), это препараты 608, 572, 541 и 609. Для токсичности соединений очень важным оказалось положение 1 остова усниновой кислоты. В том случае, если в этом положении присутствовал кислород или оксирановая группа, то токсичность

колебалась в пределах 235-530 мкг/мл, однако при введении ОН-группы повышалась более, чем на порядок.

В следующей группе объединены хальконы УК (таблица 8). Синтезированные соединения содержат фрагмент, характерный для структуры природных хальконов (выделен на рисунке 22).

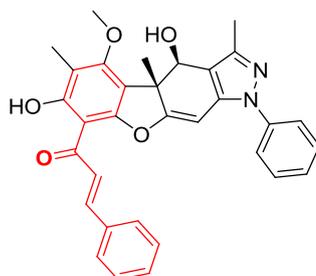
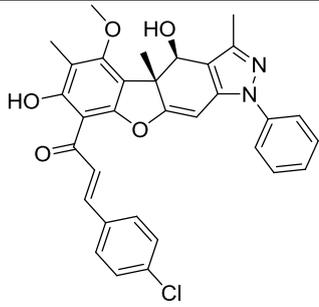
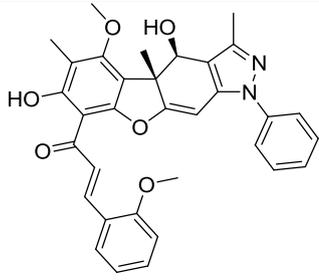
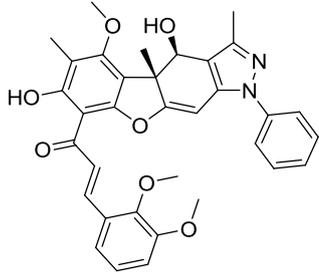
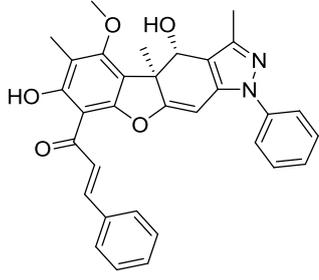
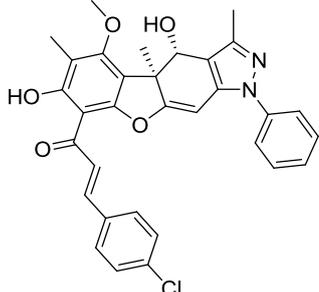
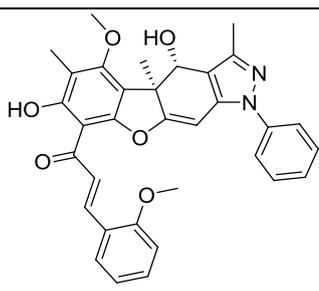


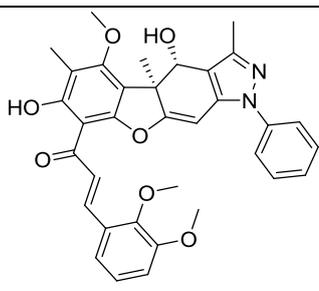
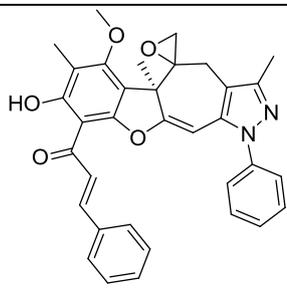
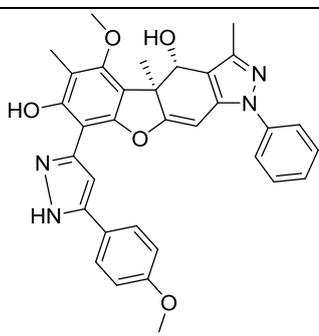
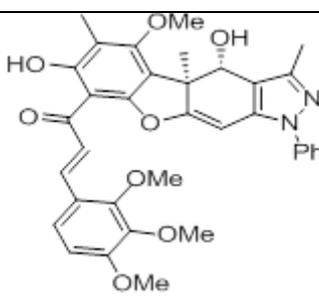
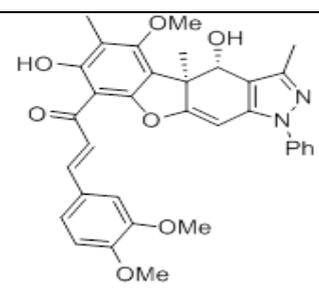
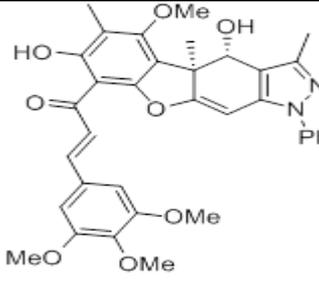
Рисунок 22. Общая формула хальконов.

Соединения были получены четырёхстадийным синтезом на основе пиразольных производных группы 6. На последней стадии синтеза использованы ароматические альдегиды с варьированием положения и природы заместителя в ароматическом кольце. На основе одного из соединений проведена более глубокая модификация с образованием ещё одного пиразолинового цикла.

**Таблица 8. Активность хальконовых производных УК в отношении вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm *in vitro*.**

Препарат	Формула	ЦТД <sub>50</sub> , мкг/мл	ЭД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТИ
1036		55±5	31±2	1.7

1038		64±5	44±3	1.5
1056		500±45	34±5	14
1059		500±33	44±4	11.3
1035		19±2	17±1	1,1
1037		140±10	30±2	4.6
1039		500±35	45±3	11

1064		500±44	28±2	17
570		10±1	3±0,2	3.3
1046		500±40	50±0,2	10
1371		170±13	20±1	8,5
1372		250±12	20±2	12,5
1373		60±5	5±1	12

1374		20±1	5±0,4	4
1446		300±25	15±1	20
1444		300±21	15±1,2	20
1443		300±15	30±2	10

Из 17 соединений данной группы активными оказались 10 (58%), являющихся производными как (+) так и (-) усниновой кислоты. Все активные соединения (кроме препарата 1443) содержали метокси-группу в пара-, орто – положениях или сразу в обоих. Таким образом, можно сделать вывод о том, что данная группа важна для антивирусной активности.

В следующую группу объединены ауруновые производные усниновой кислоты (таблица 9). Группа названа по сходству фрагмента строения синтезированных соединений со структурой природных соединений - аурунов (см. рис. 23).

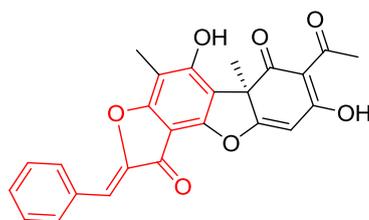
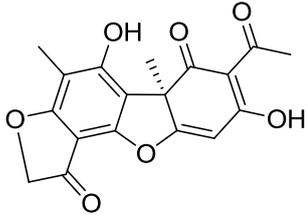
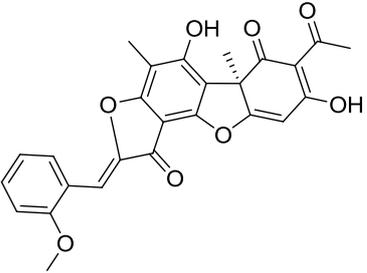
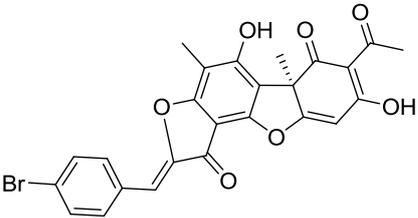
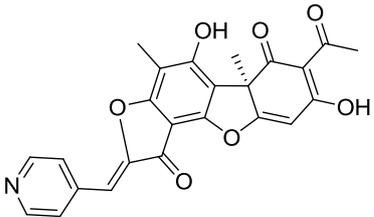
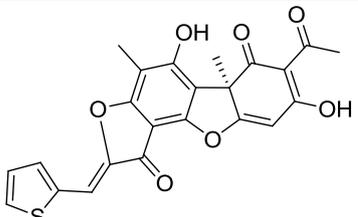
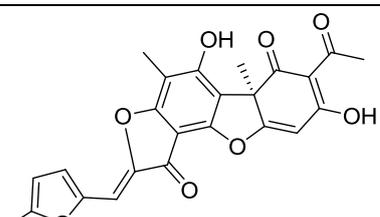
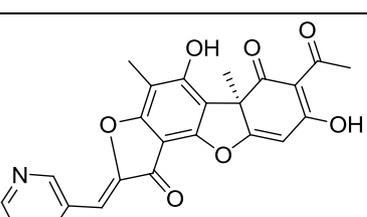


Рисунок 23. Общая формула ауриновых производных УК. Фрагмент, характерный для ауринов, выделен красным цветом.

Соединения были получены модификацией кольца А усниновой кислоты (трёхстадийный синтез) без изменения кольца С. Получены производные с варьированием структуры ароматического фрагмента и заместителей в нём.

**Таблица 9. Активность ауриновых производных УК в отношении вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm *in vitro*.**

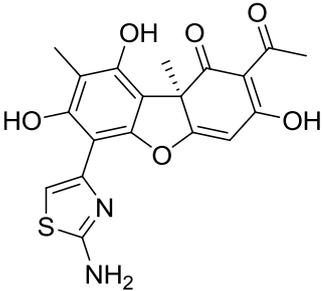
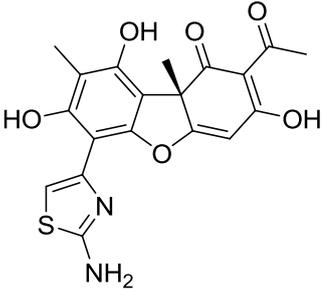
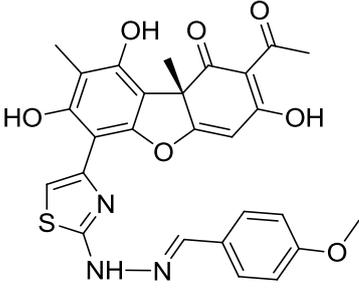
Препарат	Формула	ЦТД <sub>50</sub> , МКГ/МЛ	ЭД <sub>50</sub> , МКГ/МЛ	ХТИ
874		45±4	22±2	2.1
875		2.7±0,2	0.9±0,1	3
1034		3±0,1	3±0,1	1

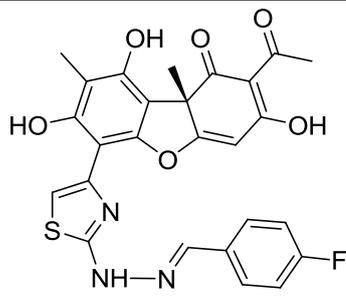
873		$40 \pm 3$	$22 \pm 1$	1.8
876		$15.2 \pm 1,3$	$2.2 \pm 0,3$	6.9
877		$20 \pm 0,2$	$2.4 \pm 0,1$	8.1
1054		$20 \pm 0,2$	$3 \pm 0,2$	6
1047		$3 \pm 0,2$	$3 \pm 0,2$	1
1048		$5 \pm 0,3$	$5 \pm 0,2$	1
1031		$23 \pm 2$	$3 \pm 0,2$	7,7

Данная группа не содержит активных соединений. Интересно, что препарат 876, который содержит метокси-группу в орто-положении, тем не менее, активным не является.

Следующая группа (таблица 10) содержит тиазольные производные усниновой кислоты. Соединения получены модификацией кольца А усниновой кислоты с формированием нового фармакофорного фрагмента – тиазольного цикла. В пределах этой группы получены производные с варьированием заместителей во вновь созданном тиазольном цикле.

**Таблица 10. Активность тиазольных производных в отношении вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm *in vitro*.**

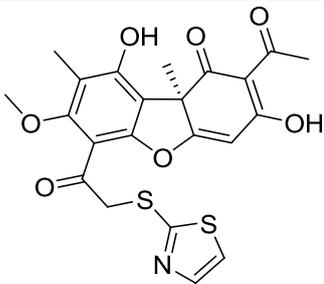
Препарат	Формула	ЦТД <sub>50</sub> , мкг/мл	ЭД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТИ
871		9.2±0,6	2.9±0,2	3.1
872		11±1	2±0,1	5.2
878		20±2	2±0,1	10

879		$8.7 \pm 0,7$	$1.3 \pm 0,1$	6.7
-----	---	---------------	---------------	-----

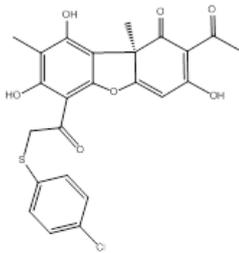
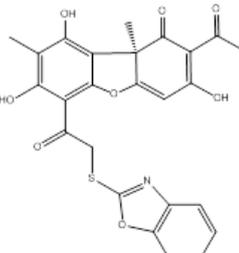
Единственное активное соединение данной группы (878) также содержит метокси-группу в пара-положении ароматического кольца заместителя, что подтверждает вывод, сделанный выше относительно хальконовых производных УК о том, что наличие метокси-группы повышает противовирусную активность соединения.

Следующая группа (таблица 11) содержит сульфидные производные усниновой кислоты (Таблица 10). Соединения получены двухстадийным синтезом и содержат гетероциклические заместители, присоединённые к ацетофеноновому фрагменту молекулы усниновой кислоты (ацильная группа в кольце А) через серный мостик. Таким образом, в этих соединениях максимально сохранён фрагмент нативной усниновой кислоты.

**Таблица 11. Активность сульфидных производных УК в отношении вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm *in vitro*.**

Препарат	Формула	ЦТД <sub>50</sub> , мкг/мл	ЭД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТИ
1032		$50 \pm 5$	$7 \pm 0,6$	7

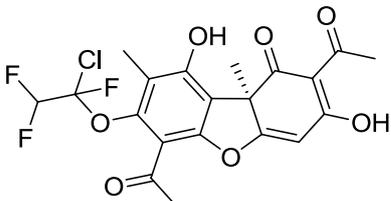
1033		300±25	13±1	23
1316		88±6	28±2	3.1
1317		420±30	72±5	5.8
1318		30±2,5	15±2	2
1319		90±4	12±1	7.5
1320		3±0,3	1±0,1	3

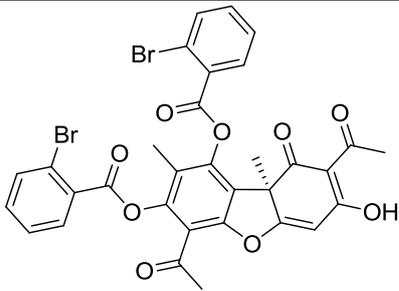
1321		$1 \pm 0,1$	$1 \pm 0,1$	1
1322		$1 \pm 0,1$	$1 \pm 0,1$	1

В группе можно наблюдать ту же тенденцию, что и в предыдущей – наиболее активным оказался препарат 1033, имеющий в составе метокси-группу в ароматическом кольце бензимидазольного заместителя и, кроме того, вторую метокси-группу в 7 положении кольца А. Замена метокси-группы в 7 положении на ОН-группу повышает токсичность (препараты 1316, 1318, 1320 и 1321).

Эфиры усниновой кислоты объединены в следующей группе (Таблица 12). Простой и сложный эфиры получены соответственно реакциями О-алкилирования и этерификации по фенольным гидроксильным группам усниновой кислоты.

**Таблица 12. Активность препаратов в отношении вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm *in vitro*. Группа 11.**

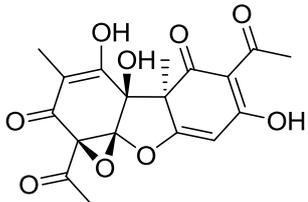
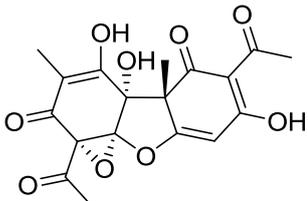
Препарат	Формула	ЦТД <sub>50</sub> , МКГ/МЛ	ЭД <sub>50</sub> , МКГ/МЛ	ХТИ
540		$46 \pm 5$	$3.2 \pm 0,5$	14

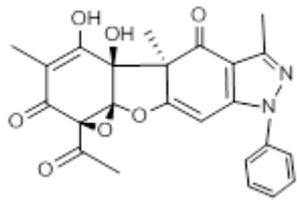
548		22±3	5.5±0,4	4
-----	---	------	---------	---

В этой группе содержатся всего два препарата, однако активное соединение имеет в своем составе CF<sub>3</sub>-группы, что подтверждает выводы, сделанные выше относительно препаратов 579 и 578 о том, что данная группа повышает противовирусную активность соединения.

Последняя группа (таблица 12) содержит производные усниновой кислоты, полученные окислением её надкислотами. Реакция сопровождается глубокой трансформацией кольца А, деароматизацией и образованием аннелированного оксиранового цикла (Таблица 12).

**Таблица 12. Активность окисленных производных УК в отношении вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1)pdm *in vitro*.**

Препарат	Формула	ЦТД <sub>50</sub> , мкг/мл	ЭД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТИ
545		88±7	4.4±0,5	22
571		57±4	10.8±1	5.3

1324		30±2	6±0,1	5
------	---	------	-------	---

Как видно из результатов, производное (+) усниновой кислоты в этой группе в 4 раза активнее, чем его (-) изомер, однако, при получении из него пиразольного производного, активность уменьшается, а токсичность повышается.

При обзоре всей группы 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 (группа 2) 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<sub>3</sub>-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<sub>3</sub>-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).

#### **4.1.2 . Изучение спектра противовирусной активности производных усниновой кислоты в отношении различных штаммов вируса гриппа**

Спектр противовирусной активности производных УК был изучен на следующем этапе исследований. С этой целью было проведено изучение активности наиболее перспективных препаратов в отношении штаммов вируса гриппа, различающихся по антигенной принадлежности, происхождению и чувствительностью к химиопрепаратам, используемым в настоящей работе. Эти данные представлены в таблице 13.

Как видно из представленных данных, активность препаратов в отношении различных вирусов в целом сходна, за исключением вируса А/Владивосток/2/09, который оказался более чувствительным к производным усниновой кислоты. Этот

факт представляет особенный интерес, поскольку данный вирус устойчив к ингибитору нейраминидазы (озельтамивиру) и несет мутацию N275Y (часто обозначается как N274Y, согласно нумерации в N2) (Aoki, 2007).

Анализ полученных данных позволяет сделать заключение о том, что активность всех исследованных производных УК оказалась ниже, чем препаратов сравнения, за исключением штаммов, устойчивых к ним.

**Таблица 13. Сравнительная активность производных усниновой кислоты в отношении различных штаммов вируса гриппа.**

Препарат	ЦТД <sub>50</sub> , мкг/мл	A/California/7/09 (H1N1pdm)		A/Aichi/2/68 (H3N2)		A/mallard/Pensilvania /10218/84 (H5N2)		A/Владивосток/2/09 (H1N1)		A/PR/8/34 (H1N1)	
		ЭД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТИ	ЭД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТИ	ЭД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТИ	ЭД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТИ	ЭД <sub>50</sub> , мкг/мл	ХТИ
544	60±2	4.3±0,3	13.9	4,1±0,2	14,3	3,8±0,2	15,5	3,2±0,3	18,3	4.4±0,5	13.9
545	88±7	4.4±0,5	22	4,1±0,3	21	3,9±0,1	22,5	3,8±0,2	22,9	4.1±0,3	22
547	46±4	4.5±0,5	10.3	3±0,5	15,3	2,8±0,1	16,5	2,7±0,1	16,9	4.4±0,4	10.3
575	61±3	3±0,1	20	2,7±0,2	22,5	3±0,1	19,8	2,3±0,1	26,8	3.1±0,2	20
608	346±21	28±5	12	30±1	11,3	27,6±2	12,5	22±2	15,6	30±5	11.5
609	235±21	23±3	10	23,5±3	10	19,5±1	12	15,6±1	15	19±3	12.3
612	60±4	6±0,5	10	5,5±0,1	11	6,1±0,5	9,8	4,4±0,3	13,5	5.9±0,5	10.1
Ремантадин	60±5	12±1	5	0,8±0,1	75	1±0,1	60	1,2±0,1	50	11±1	5.5
Озельтамивир	300±10	0,3±0,01	1000	0,5±0,1	600	0,5±0,1	600	60±6	5	0,4±0,01	750

#### **4.2. Исследование активности производных усниновой кислоты 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 **544, 575, 612, 608, 609, 1059** поскольку все они показали высокий уровень активности *in vitro* (ХТИ больше 10) и представляли собой структурно различающиеся классы производных. Препараты 575, 612 и 544 относятся к аминокислотным производным, 608 и 609 – к пиразольным, 1059 – к хальконам, а препараты 546 и 547 представляют собой саму усниновую кислоту в (+) и (-) изоформе.

Для определения рабочих концентраций в предварительных экспериментах определяли значения  $LD_{50}$  (50% токсической дозы). Для препаратов 546, 547, 575, 612, 608, 609 и 1059 значения  $LD_{50}$  составили 75, 350, 150, 150, 250, 250 и 250 мг/кг, соответственно. В качестве рабочих использовали концентрации  $1/5 LD_{50}$ .

Критериями активности соединений служили снижение смертности подопытных животных, увеличение средней продолжительности жизни, а также динамика снижения их веса. Доза вируса составила 1  $LD_{50}$ . Результаты представлены в таблице 14.

**Таблица 14. Протективная активность производных усниновой кислоты на модели гриппозной пневмонии у белых мышей. Вирус A/Aichi/2/68 (H3N2), доза вируса 1 LD<sub>50</sub>.\***

<b>Препарат, доза</b>	<b>Смертность,%</b>	<b>Средняя продолжительность жизни, сут</b>	<b>Индекс защиты, %</b>
<b>Контроль вируса</b>	<b>50%</b>	<b>11,7</b>	<b>-</b>
546 7,5 мг/кг	50%	11,6	0
546 15 мг/кг	50%	11,9	0
547 35 мг/кг	40%	12,1	20
547 70 мг/кг	40%	12,8	20
575 10 мг/кг	30%	13,3	40
575 30 мг/кг	20%	13,7	60
612 10 мг/кг	40%	12,3	20
612 30мг/кг	40%	12,7	20
1059 25 мг/кг	50%	11,9	0
1059 50 мг/кг	40%	12,6	20
608 25мг/кг	40%	12,3	20
608 50мг/кг	30%	13,1	40
609 25мг/кг	50%	11,7	0
609 50мг/кг	40%	12,2	20
Ремантадин 50 мг/кг	0%	14	100

\* нумерация и структуры соединений представлены в табл.1

Из данных, представленных в таблице 14 следует, что все изученные препараты в той или иной степени снижают смертность и повышают продолжительность жизни животных по сравнению с группой плацебо. Наибольшую активность проявил препарат 575, аминокислотное производное

енаминов усниновой кислоты. Индекс защиты для него составил 60% при дозе 30 мг/кг и 40% - в дозе 10 мг/кг. Таким образом, препарат 575 проявил умеренную противовирусную активность в опытах на животных. При этом, его активность осталась ниже, чем у препарата сравнения – ремантадина.

Для оценки противовирусного потенциала наиболее перспективных производных УК протективную активность также оценивали в эксперименте с высокой заражающей дозой вируса (10 LD<sub>50</sub>).

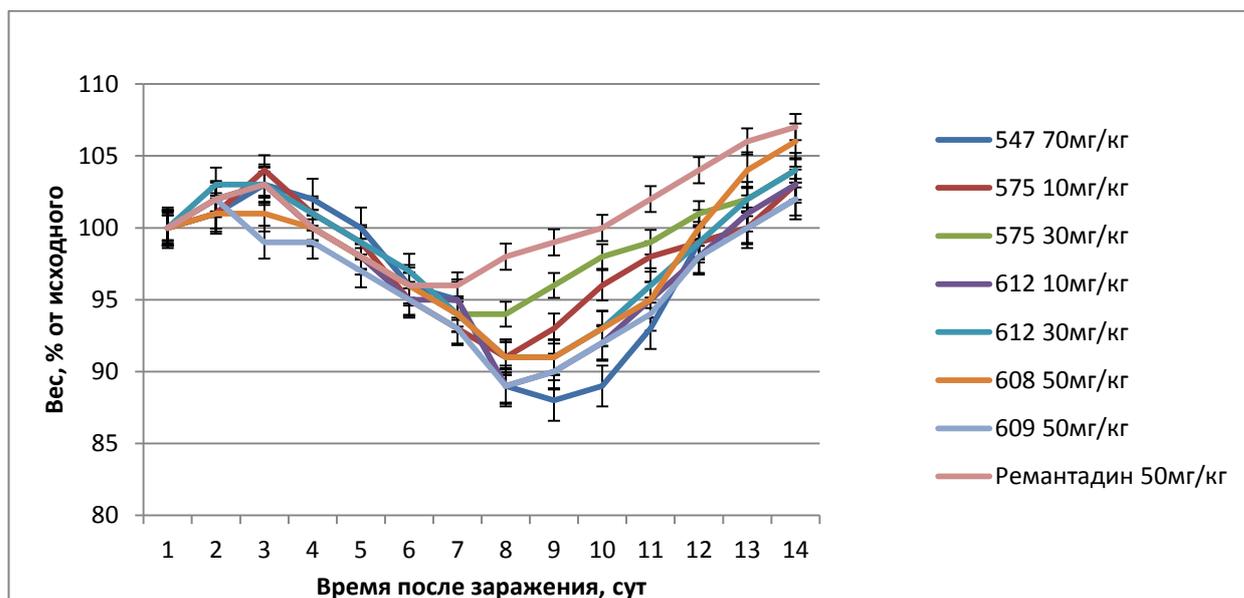
**Таблица 15. Протективная активность производных усниновой кислоты *in vivo* на модели гриппозной пневмонии у белых мышей. Вирус A/Aichi/2/68 (H3N2), доза вируса 10 LD<sub>50</sub>.\***

<b>Препарат, доза</b>	<b>Смертность, %</b>	<b>Средняя продолжительность жизни, сут</b>	<b>Индекс защиты, %</b>
<b>Контроль вируса</b>	<b>90%</b>	<b>8,2</b>	<b>-</b>
575 10 мг/кг	70%	11	22
575 30 мг/кг	60%	11,3	33
608 50мг/кг	70%	10,6	22
Ремантадин 50 мг/кг	30%	13	66,7

\* нумерация и структуры соединений представлены в табл. 1

Как видно из представленных данных, смертность в контрольной группе составила 90%. Индекс защиты ремантадина составил 66,7%, а препарата 575 – 33%. Таким образом, и при большой заражающей дозе вируса препарат 575 проявляет умеренную протективную активность, хотя и ниже, чем ремантадин.

Полученные данные были подтверждены при анализе динамики веса животных в ходе инфекции, данные суммированы на рис. 24



**Рисунок 24. Динамика веса мышей в ходе экспериментальной гриппозной инфекции. Доза вируса 1 LD<sub>50</sub>**

Как видно из графика, ремантадин и препарат **575** оказывают выраженное действие на нормализацию веса у зараженных гриппом животных. Уровень протективной активности по этому критерию у них примерно одинаков. Динамика и уровень снижения веса у животных, получавших в качестве противогриппозной терапии другие препараты, практически не отличаются от контрольной группы.

Для детальной характеристики влияния препаратов на ход патологического процесса было изучено их действие на репликацию вируса в легких животных (рис. 25).

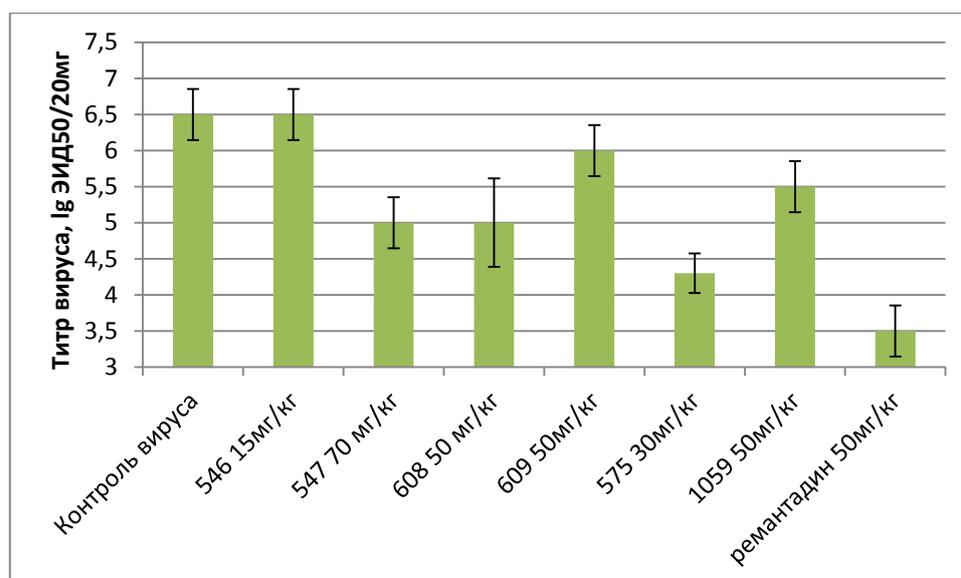


Рис. 25. Репликативная активность вируса в легочной ткани на третий день инфекции. Доза вируса 1 LD<sub>50</sub>

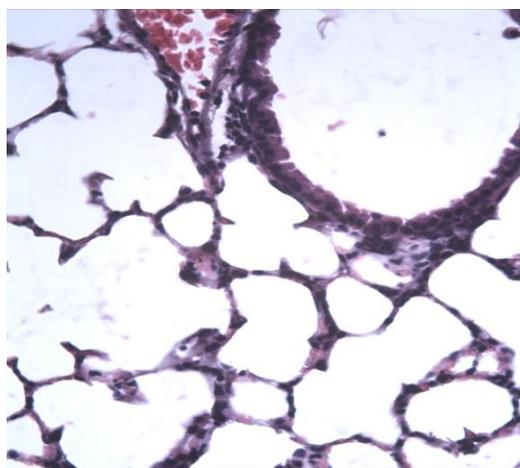
Как видно из графика, в контрольной группе животных, не получавших лечения, титр вируса составил 6,5 lg ЭИД<sub>50</sub>/20мг. Статистически достоверное снижение титра вируса отмечено для препаратов 547, 608, 575 и препарата сравнения ремантадина (U-критерий Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ), при этом наибольшее (на 2 lg ЭИД<sub>50</sub>/20мг) среди исследуемых препаратов снижение титра вируса выявлено для препарата 575.

#### 4.3. Влияние препаратов на морфогенез экспериментальной гриппозной инфекции у животных.

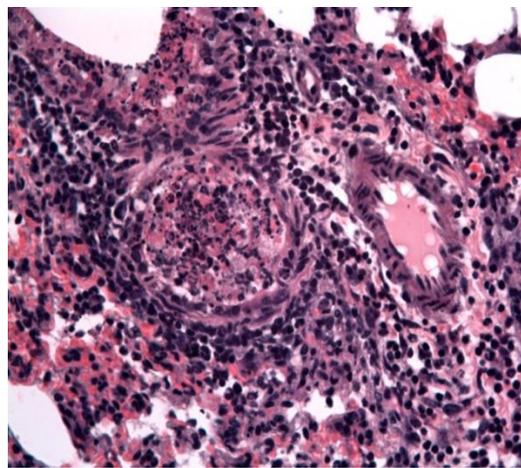
На следующем этапе исследований были изучены особенности морфогенеза гриппозной инфекции в организме животных в условиях применения производных усниновой кислоты. В качестве модельного вируса был использован штамм A/Aichi/2/68 (H3N2), не имеющий устойчивости к какому-либо из противогриппозных препаратов,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

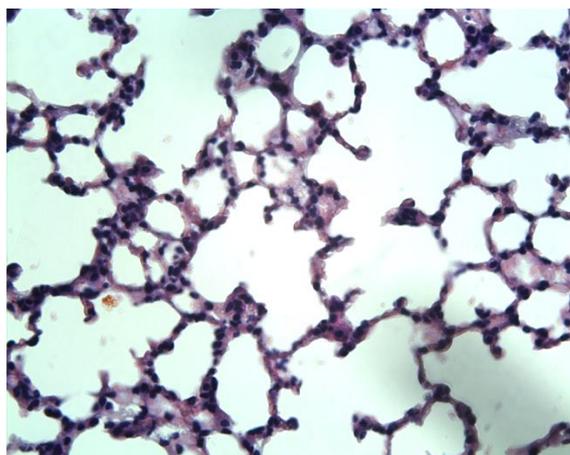
выглядели интактными – в них не отмечалось признаков вакуолизации, конденсации или фрагментации ядер, а также внутриядерных или цитоплазматических включений. В просветах бронхов не отмечалось экссудата и клеточного детрита, характерных для деструктивных процессов в ткани. Респираторные отделы выглядели воздушными, альвеолярные стенки не были утолщены, из клеток инфильтрата в легочной паренхиме отмечались отдельные альвеолярные макрофаги. Признаков серозного или геморрагического экссудата в альвеолярных полостях не обнаруживалось (Рис.26, а).



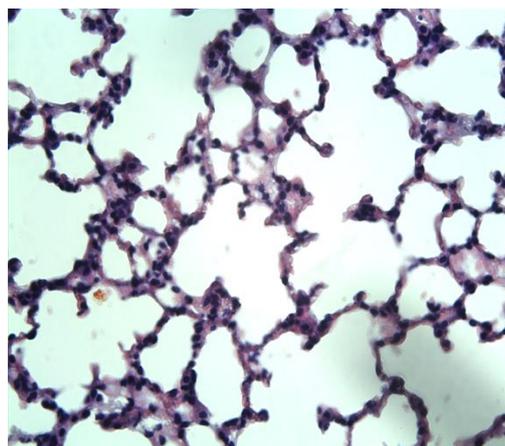
а



б



в



г

Рис.26. Поражения, вызванные гриппом в легочной ткани. а – интактные мыши, б – контроль вируса, в – ремантадин, г – препарат 575. Гематоксилин-эозин,  $\times 400$  (а).

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.26, б).

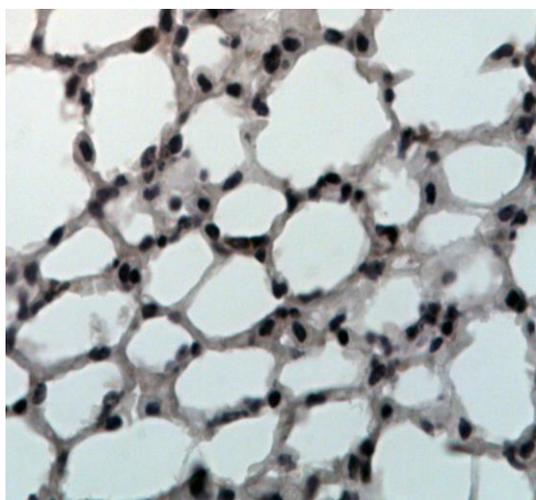
При использовании ремантадина признаки вирусспецифического и реактивного поражения ткани легких на острой стадии гриппозной пневмонии были резко ограничены. Клетки бронхиального эпителия выглядели сохранными (рис. 26, в), в отличие от разрушенных клеток с многочисленными вирусными включениями у контрольных 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. 26, г).

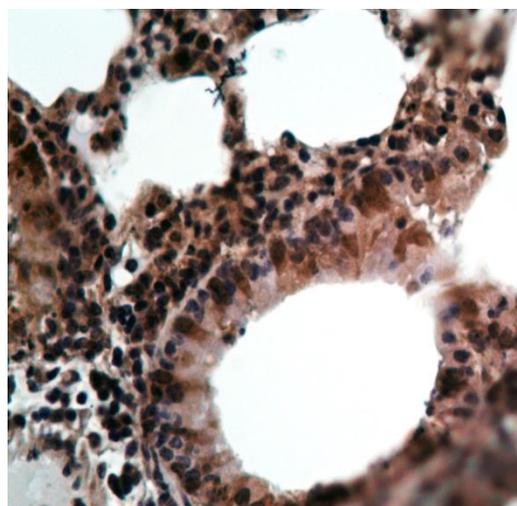
Таким образом, использование препарата 575 приводило к ограничению размеров очагов пневмонии у животных, нормализации структуры легочной ткани, в том числе повышению степени воздушности респираторных отделов, хотя и в меньшей степени, чем при использовании ремантадина.

Помимо гистологического, в настоящей работе также проводили иммуногистохимическое исследование легочной ткани для изучения

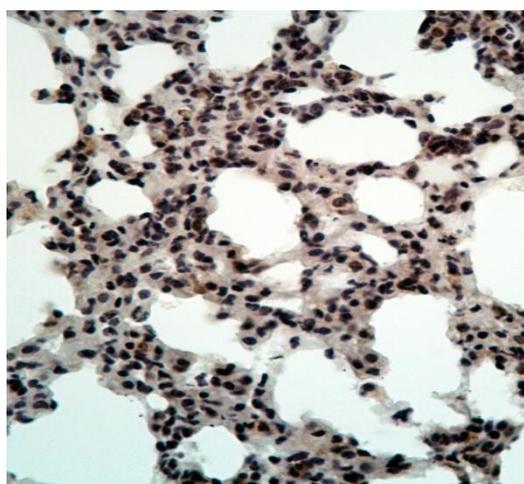
локализации и количества вирусного антигена. У интактных животных (рис.27, а) вирусный антиген не был обнаружен. У зараженных животных (рис. 27, б), не получавших лечения, антиген обнаруживался в клетках бронхиального эпителия, в альвеолах, а также среди клеточного детрита в просвете бронха.



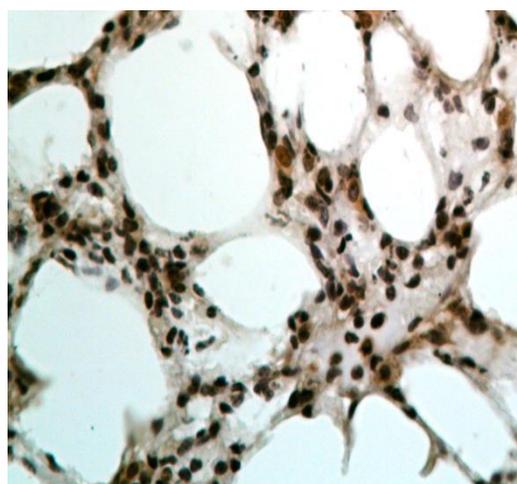
а



б



в



г

Рис.27. Вирусный антиген в легком мыши на 3 день после заражения. а – интактные мыши, б – контроль вируса, в – ремантадин, г – препарат 575.

Пероксидазная реакция с докраской гематоксилином,  $\times 400$  (а).

При использовании ремантадина (рис. 27, в) вирусный антиген обнаруживался в незначительном числе клеток, что свидетельствует о том, что ремантадин снижает вирусную репродукцию в клетках легких и препятствует распространению вирусного антигена.

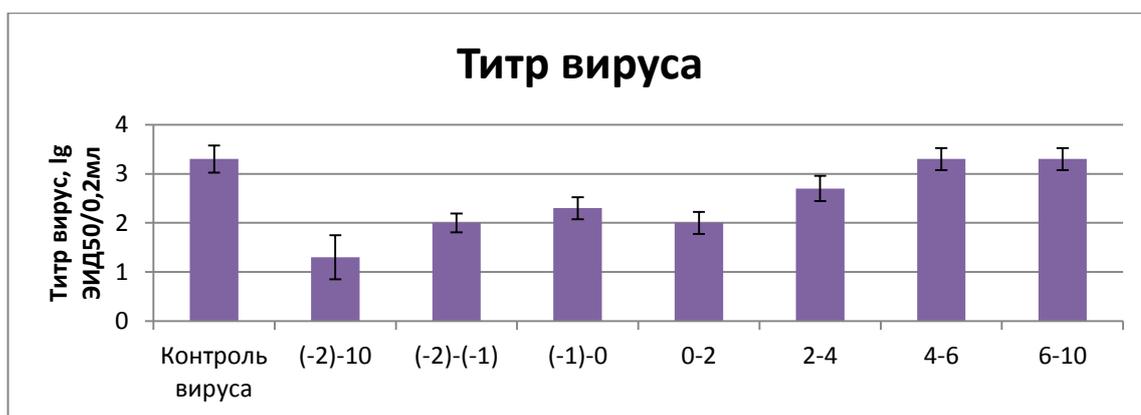
При использовании препарата 575 (рис.27, г) вирусный антиген, обнаруживался в клетках альвеол, однако, его количество было значительно меньше, чем в контроле, хотя и больше, чем в легких животных, получавших в качестве лекарственного препарата ремантадин. Количество клеточного детрита по сравнению с легкими животных, не получавших лечения, было снижено.

Таким образом, препарат 575, хотя и не препятствовал проникновению вирусного антигена в клетки легочного эпителия, однако снижал репродукцию вируса в них.

Использованная модель, к сожалению, не позволяет оценить влияние препаратов на распространение вируса в нижние отделы респираторного тракта, поскольку вирус вносится непосредственно в них при заражении с использованием эфирного наркоза. Таким образом, для того, чтобы изучить влияние производных УК на распространение вируса по организму, требуется провести дополнительные исследования.

#### **4.4. 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 (H1N1pdm), после чего оценивали разницу в титрах вируса по сравнению с контролем (рисунок 28). Цифрами (в часах) обозначено время контакта препарата с культурой клеток относительно момента 0 – входа вируса в клетку.



**Рисунок 28. Зависимость интенсивности вирусной репродукции от времени внесения препарата 575.**

Как видно из представленных результатов, титр вируса в контроле составил 3,3 lg ЭИД<sub>50</sub>/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 lg ЭИД<sub>50</sub>/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 точку (-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 можно 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 мышиноного 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.

#### **4.5. 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. 29).

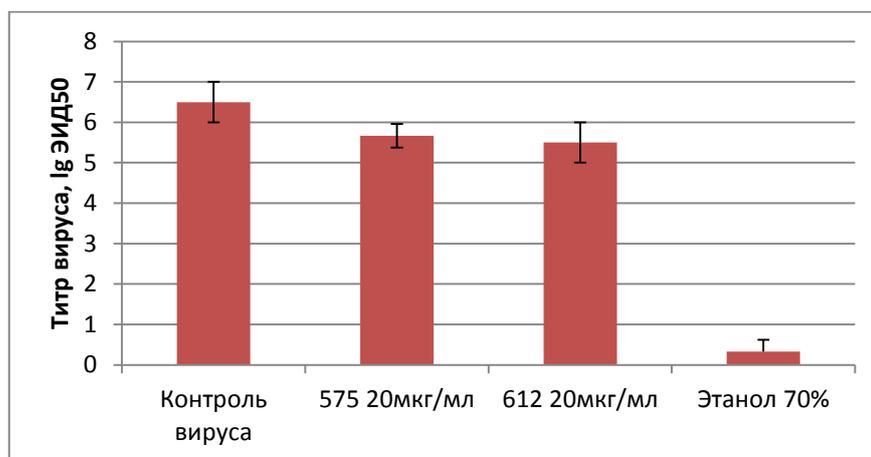


Рисунок 29. Оценка вирулицидного действия производных усниновой кислоты.

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.

#### **4.6. Изучение воздействия производных УК 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 16. 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

Ни один из исследованных препаратов в изученных концентрациях (1/2 ЦТД<sub>50</sub>) 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.

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

В свете вышеприведенных данных о большей чувствительности озельтамивир-устойчивого вируса А/Владивосток/2/09 к производным усниновой кислоты возникла гипотеза о возможном механизме действия этих препаратов, связанных с ингибированием вирусной нейраминидазы. Для проверки данной гипотезы оценили ингибирование нейраминидазной активности с помощью MUNANA-теста, для препаратов вычисляли значение 50% эффективной дозы (ЭД<sub>50</sub>). Данные о способности этих соединений ингибировать активность вирусной нейраминидазы суммированы в таблице 17. В качестве положительного контроля использовали известный ингибитор нейраминидазы озельтамивир, а в качестве отрицательного контроля – препарат 574, не проявивший никакой противовирусной активности.

**Таблица 17. Исследование ингибирующей активности производных усниновой кислоты в отношении нейраминидазы вируса гриппа А/California/7/09 (H1N1)pdm09 и А/Владивосток/2/09 (H1N1).**

<b>Препарат</b>	<b>Вирус</b>	<b>ЭД<sub>50</sub>, pM</b>
Озельтамивир	А/California/7/09 (H1N1)pdm09	7,4x10 <sup>2</sup>
575	А/California/7/09 (H1N1)pdm09	2,3x10 <sup>7*#</sup>
574	А/California/7/09 (H1N1)pdm09	1,1x10 <sup>13*</sup>
574	А/Владивосток/2/09 (H1N1)	2,3x10 <sup>12*</sup>
575	А/Владивосток/2/09 (H1N1)	7,6x10 <sup>7*#</sup>
Озельтамивир	А/Владивосток/2/09 (H1N1)	3x10 <sup>13</sup>

\*значения статистически достоверно (t-критерий Стьюдента, p<0,05) отличаются от значения ЭД<sub>50</sub> озельтамивира в отношении штамма А/California/7/09 (H1N1)pdm09

# значения статистически достоверно (t-критерий Стьюдента, p<0,05) отличаются от значения ЭД<sub>50</sub> озельтамивира в отношении штамма А/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).

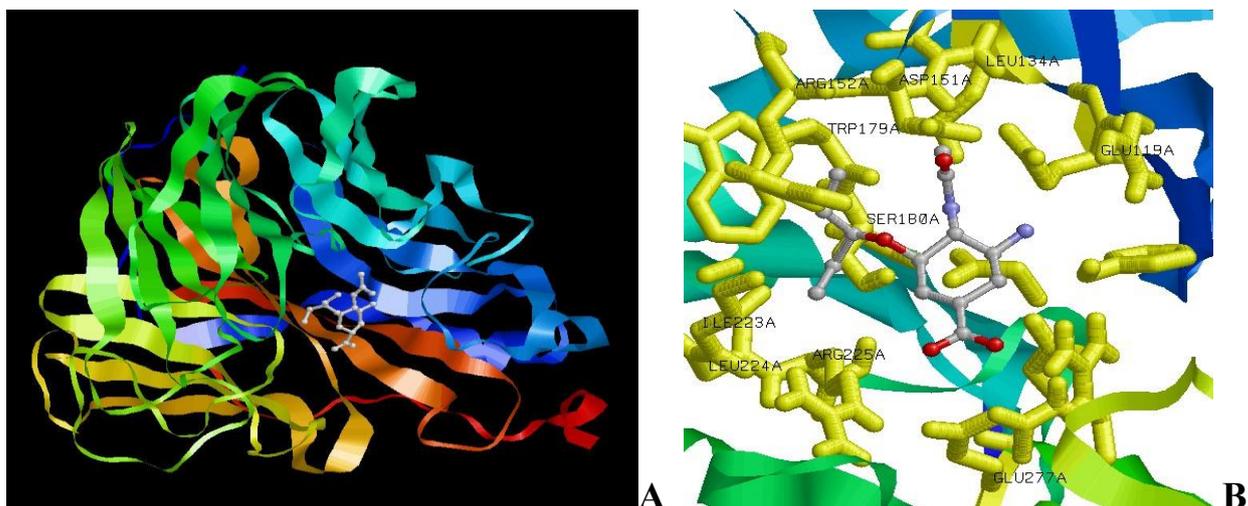
Препарат 575, хотя и ингибирует вирусную нейраминидазу крайне слабо по сравнению с озельтамивиром, однако его активность проявляется независимо от наличия или отсутствия устойчивости к озельтамивиру, которая у штамма A/Владивосток/2/09 вызвана мутацией N274Y. Это позволяет сделать предположение, что 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.

#### **4.8. 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.

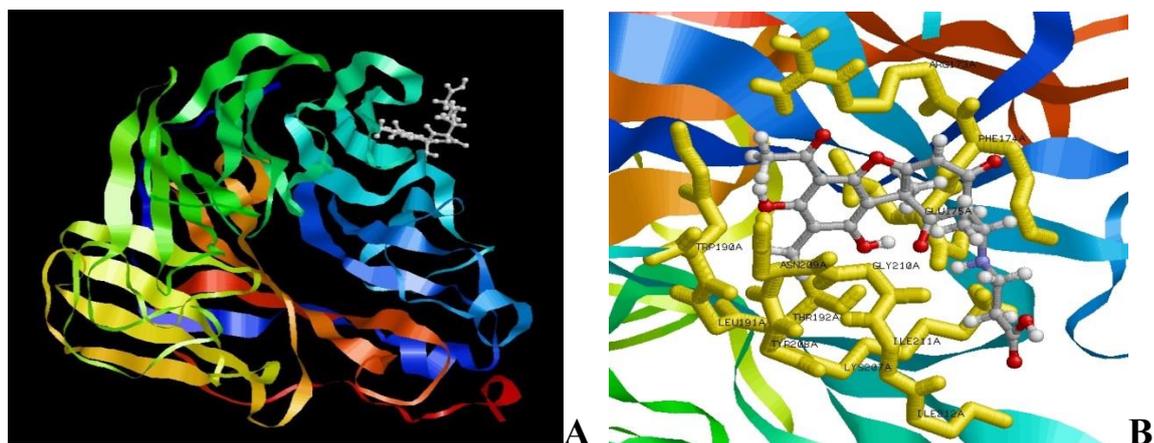
Для верификации модели в качестве лиганда был использован известный ингибитор нейраминидазы - озельтамивир (см рис. 30).



**Рис. 30. Связывание озельтамивира с активным центром нейраминидазы вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1pdm09) (А – общий вид молекулы нейраминидазы с препаратом, В – непосредственно сайт связывания с выделением ближайших аминокислот).**

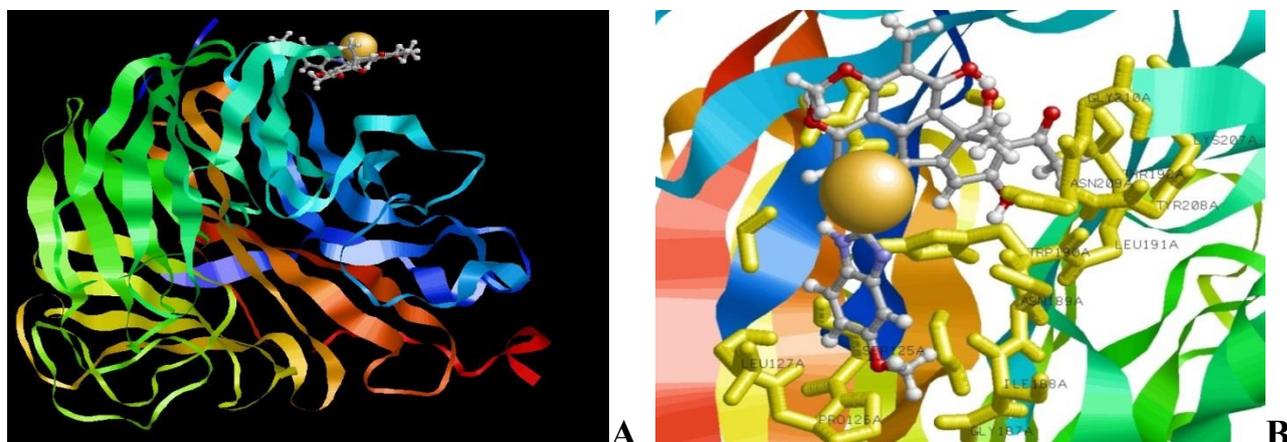
Как видно из рисунка 33, при взаимодействии с нейраминидазой озельтамивир оказывается в непосредственной близости от следующих аминокислот: Glu119, Leu134, Asp151, Arg152, Trp179, Ser180, Leu224, Ile223, Arg225 и Glu277. Положения Glu119, Asp151, Arg152, Trp179 описаны как функционально важные для сайта связывания озельтамивира с нейраминидазой в работе Durrant et al (2010), положение Ile223 – в работе Van der Vries et al (2012). Используемая программа для моделирования связывания, таким образом, является адекватной.

На рисунках 31, 32 и 33 представлены модели связывания нескольких активных препаратов, наиболее отличающихся по химическому строению - 575, 1033 и 1064, соответственно, с нейраминидазой вируса гриппа A/California/4/09 (H1N1pdm09).



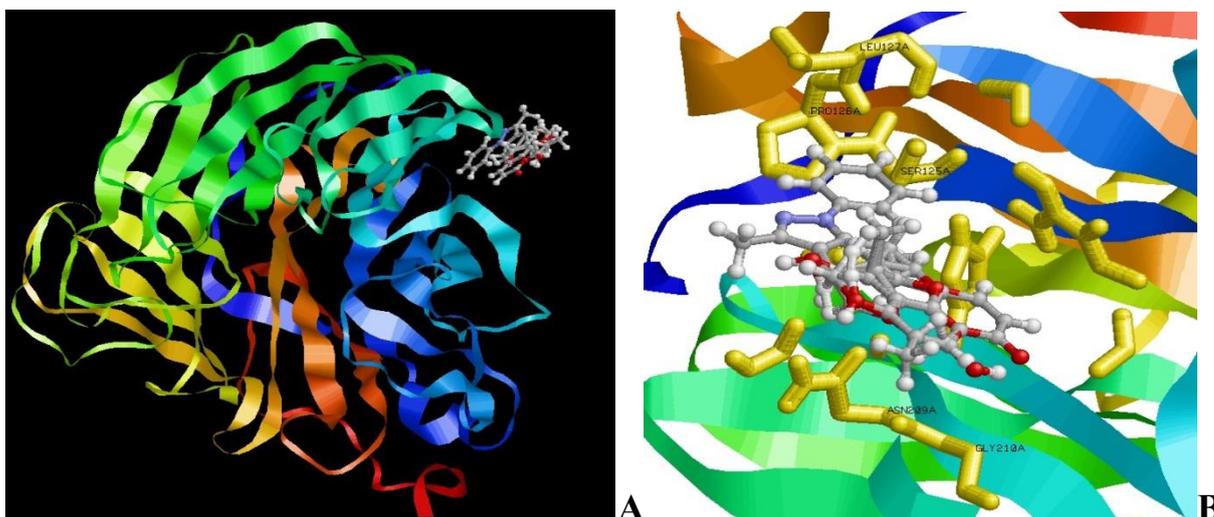
**Рис. 31. Связывание препарата 575 с нейраминидазой вируса гриппа (А – общий вид молекулы нейраминидазы с препаратом, В – непосредственно сайт связывания с выделением ближайших аминокислот).**

Из представленного рисунка видно, что препарат 575 непосредственно связан со следующими аминокислотами: Phe174, Glu175, Trp190, Leu191, Thr192, Lys207, Tyr208, Asn209, Gly210, Ile211 и Ile212.



**Рис. 32. Связывание препарата 1033 с нейраминидазой (А – общий вид молекулы нейраминидазы с препаратом, В – непосредственно сайт связывания с выделением ближайших аминокислот).**

Из представленного рисунка видно, что препарат 1033 связывается с аминокислотами в положениях Ser125, Pro126, Leu127, Gly187, Ile188, Asn189, Trp190, Leu191, Thr192, Lys207, Tyr208, Asn209 и Gly210.



**Рис. 33. Связывание препарата 1064 с нейраминидазой (А – общий вид молекулы нейраминидазы с препаратом, В – непосредственно сайт связывания с выделением ближайших аминокислот).**

Из представленного рисунка видно, что препарат 1064 связывается с аминокислотами в положениях Ser125, Leu127, Pro128, Asn209 и Gly210.

Таким образом, общими сайтами связывания для всех трех препаратов, проявивших ранее вирусингибирующие свойства, оказались аминокислоты в положениях Asn209 и Gly210, кроме того, препараты 575 и 1033 также связываются с аминокислотами в положениях Trp190, Leu191, Thr192, а препараты 1033 и 1064 связываются с аминокислотами в положениях Ser125, Leu127, Pro128. Ни одна аминокислота из данного списка не входит в число тех, которые образуют каталитический центр молекулы нейраминидазы (Durrant et al, 2010).

Таким образом, если производные усниновой кислоты и связываются с молекулой нейраминидазы, то связывание это происходит вне каталитического центра.

#### **4.9. 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 мы использовали вирус А/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. 17.

**Таблица 17. Сравнение активности препарата 575 в отношении вируса А/PR8/34 (H1N1) до и после совместного пассирования с нарастающими концентрациями этого препарата.**

Вирус	Снижение титра вируса в присутствии препарата 575, (lg ЭИД <sub>50</sub> /0,2мл)			
	50 мкг/мл	17 мкг/мл	5 мкг/мл	1,7 мкг/мл
А/PR8/34 (H1N1) исходный	4,5	1,5	0,5	0
А/PR8/34 (H1N1) после 13 пассажей с препаратом 575	3,5	1,0	0,5	0

Из таблицы видно, что снижение вирусной репродукции под воздействием препарата 575 в одинаковых дозах также было сходным. 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.

Аминокислотные последовательности просеквенированных участков представлены в приложениях 1, 2, 3, из них видно, что в 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.

#### **4.10. Оценка гепатотоксичности усниновой кислоты и ее производного – препарата 575.**

В связи с вышеприведенными данными о гепатотоксичности усниновой кислоты (см. «Обзор литературы») было проведено дополнительное исследование воздействия усниновой кислоты и препарата 575 на ткани печени. Для этого мышам вводили (+) усниновую кислоту и препарат 575 в дозе 30 мг/кг ежедневно в течение 4 дней, затем отбирали печень для гистологического исследования.

В печени интактных животных, не подвергавшихся воздействию препаратов, печеночные дольки были представлены центральными венами с радиально расположенными печеночными балками. Гепатоциты оставались интактными, цитоплазма была гомогенной либо слабо вакуолизированной.

Признаков деструкции клеток или воспалительной инфильтрации не было (рис.34).

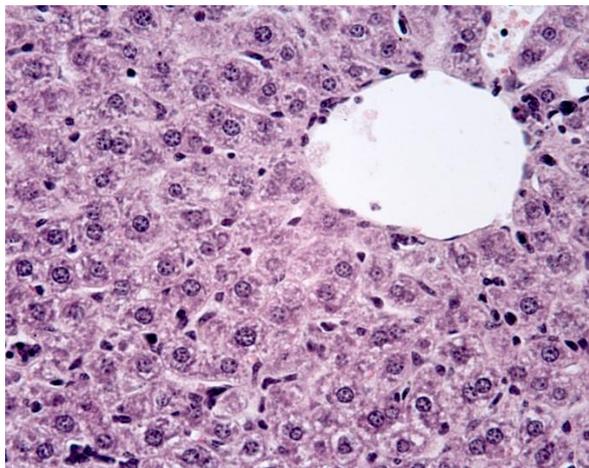


Рис.34. Печеночная долька интактной мыши. Печеночные балки сохранены, вакуолизация гепатоцитов и признаки клеточного распада отсутствуют. Гематоксилин-эозин, х400

Печеночная паренхима животных, получавших усниновую кислоту, была представлена гепатоцитами, находящимися на разных стадиях дегенерации, о чем свидетельствовала ярко выраженная вакуолизация цитоплазмы. В ткани печени часто встречались очаги клеточного распада и инфильтрации полиморфно-ядерными лейкоцитами. Перечисленные признаки характерны для токсического поражения печени и свидетельствуют о высокой гепатотоксичности усниновой кислоты в использованной дозе (рис.35).

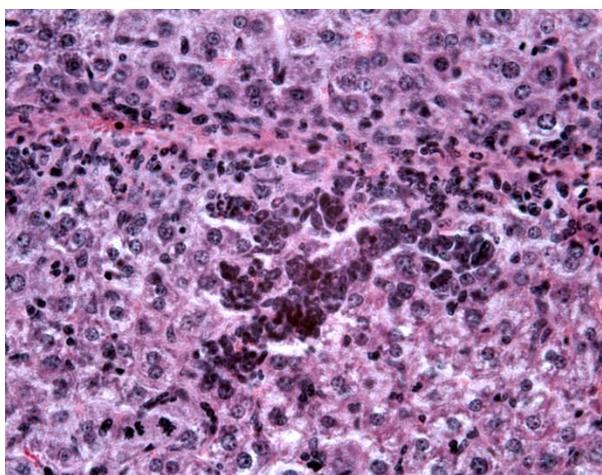


Рис.35. Ткань печени мыши в условиях применения усниновой кислоты (30мг/кг). Выраженная деградация гепатоцитов, интенсивная инфильтрация нейтрофилами и клеточный распад. Гематоксилин-эозин, х400

Признаки гепатотоксичности у мышей, получавших препарат 575 в той же дозе, были выражены слабее. Гепатоциты были умеренно вакуолизированы, структура печеночных балок не нарушена, очаги клеточного распада и инфильтрации встречались реже и имели меньшие размеры (рис.36).

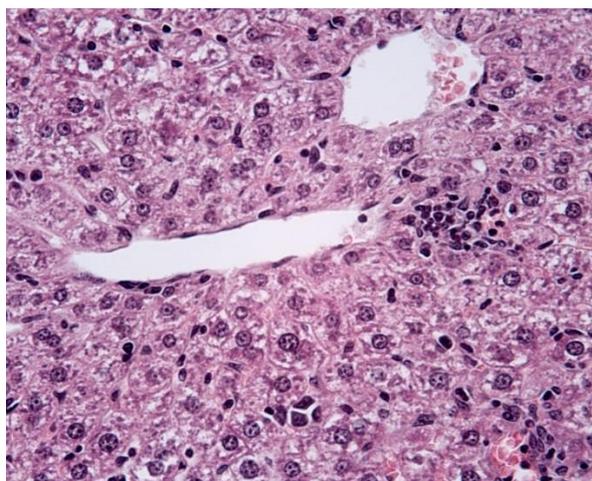


Рис. 36. Печеночная долька мыши в условиях применения препарата 575 (30мг/кг). Умеренная вакуолизация гепатоцитов, слабо выраженная воспалительная инфильтрация. Гематоксилин-эозин, х400

Таким образом, можно сделать вывод о том, что данная модификация усниновой кислоты позволяет снизить ее токсичность для тканей печени, повышая в то же время противовирусные свойства. Тем не менее, требуются дальнейшие исследования в направлении снижения гепатотоксичности данной группы соединений.

## 5. ОБСУЖДЕНИЕ.

Грипп является опасным респираторным заболеванием, которое ежегодно вызывает эпидемии, наносящие существенный ущерб населению. Ввиду высокой изменчивости вирус гриппа легко приобретает устойчивость к существующим противовирусным препаратам. Использование растительных метаболитов в качестве исходных соединений для создания новых биологически активных агентов – приоритетное направление современной медицинской химии. Одним из доступных растительных метаболитов является усниновая кислота, мажорный вторичный метаболит ряда лишайников. Это соединение обладает широким спектром биологической активности – антибиотической, противотуберкулезной, анальгетической, и, в том числе, противовирусной; является основным действующим началом многих биологически активных препаратов. Лишайники различных видов продуцируют лево- и правовращающие энантиомеры усниновой кислоты с высокой оптической чистотой. Недостатком природной усниновой кислоты является относительно низкая эффективность по сравнению с существующими препаратами и низкая водорастворимость. Поэтому приобретает актуальность направленный синтез на её основе веществ с улучшенными биодоступностью и целевой активностью.

В данной работе проведен систематический анализ 95 производных усниновой кислоты. Все они, кроме одного соединения, были синтезированы впервые. В ходе работы был оценен уровень и спектр противовирусной активности, изучены протективные свойства УК на модели гриппозной инфекции у животных, определен предполагаемый механизм действия препаратов, а также получены устойчивые мутанты.

Приблизительно треть всех препаратов принадлежала к категории енаминов, где заместители присоединяли через атом азота в 12 положении. Енамины, содержащие в качестве заместителей анилина, проявляют противовирусную активность в том случае, если содержат атом галогена (фтора или брома) в пара-положении, особенно ярко эта тенденция выражена для производных (+) усниновой кислоты (препараты 598, 601 и 602).

Среди енаминовых производных усниновой кислоты с алифатическими аминами активность проявили только два, которые являются парой изомеров (препараты 578 и 579) и содержат заместитель  $CF_2-CF_3$ , который, по-видимому, является важным для антивирусной активности.

Енамины с квартернизированным азотом не содержат ни одного активного соединения вследствие высокой токсичности соединений, которая снижает значения химиотерапевтического индекса до значений, близких к 1.

Высокую активность среди енаминов проявляют аминокислотные производные УК, в данной группе содержится соединение 575, имеющее ХТИ равный 20, что в два раза выше порога активности. Данное соединение также проявило проективные свойства *in vivo* на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей. Однако, селективность препаратов данной группы существенно снижается за счет токсичности при введении объемного заместителя.

Пиразольные производные усниновой кислоты также проявили умеренную активность (препараты 608, 572, 541 и 609), при этом крайне важным для токсичности соединений оказалось положение 1 остова усниновой кислоты. При наличии в этом положении окси- или оксирановой группы, значения 50% цитотоксической дозы были примерно в 10 раз выше, чем при введении в данном месте ОН-группы. Таким образом, можно сделать вывод о важности данного положения для цитотоксичности соединений.

Среди хальконовых производных активными оказались 58% соединений (препараты 1056, 1059, 1039, 1064, 1046, 1372, 1373, 1446, 1444 и 1443), причем все они, кроме одного (1443) содержали метокси-группу в пара-, орто-положениях заместителя или сразу в обоих. Следует также отметить, что в пределах этой группы никакой зависимости от изомерного состояния фармакофора - усниновой кислоты - не отмечалось.

Среди ауриновых производных не оказалось ни одного активного, несмотря на то, что один из препаратов данной группы (876) содержит метокси-группу.

Из тиазоловых производных активность проявило одно соединение (препарат 878), содержащее метокси-группу в пара-положении ароматического кольца заместителя. Таким образом, среди тиазолов наблюдается та же тенденция, что и среди хальконов – наличие метокси-группы уменьшает токсичность соединения и увеличивает таким образом его селективность.

Такая же тенденция наблюдается и среди сульфидных производных. Единственный активный препарат данной группы (1033) содержит метокси-группу в ароматическом кольце бензимидазольного заместителя. Интересно отметить, что, кроме того, все препараты данной группы также содержат метокси-группу в 7 положении кольца А, что не оказывает никакого эффекта ни на активность, ни на токсичность.

В группе эфиров усниновой кислоты также содержатся всего два препарата, один из них активен (540) и несет в своем составе CF<sub>3</sub>-группу, что подтверждает выводы, сделанные выше относительно препаратов 579 и 578 о том, что данная группа повышает противовирусную активность соединения.

В группе окисленных производных было всего три препарата, из них активен оказался один (545), и это был аналог (+) усниновой кислоты. Его (-) изомер активности не проявил.

На основе полученных данных, можно сформулировать основные принципы зависимости «структура-активность» производных усниновой кислоты *in vitro*:

1. Антивирусная активность производных (+) усниновой кислоты выше либо равна активности их (-) изомеров.

2. При наличии ароматического кольца в енаминовых производных активность повышается после введения атома галогена в пара-положении.

3. Наличие  $\text{CF}_3$ -группы, как правило, повышает противовирусную активность таких соединений, как 579, 578 и 540.

4. Наличие аминокислот в енаминовых производных повышает активность, при условии, что эти аминокислоты не несут никакого объёмного ароматического заместителя.

5. Внедрение дополнительного цикла – пиразольного – повышает селективность за счёт снижения цитотоксичности.

6. 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.

Для удобства оценки зависимости «структура-активность» молекула усниновой кислоты была разделена на зоны, обозначенные буквами (рис.37).

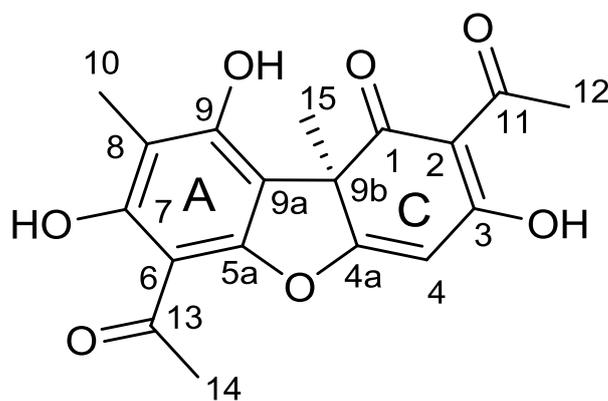
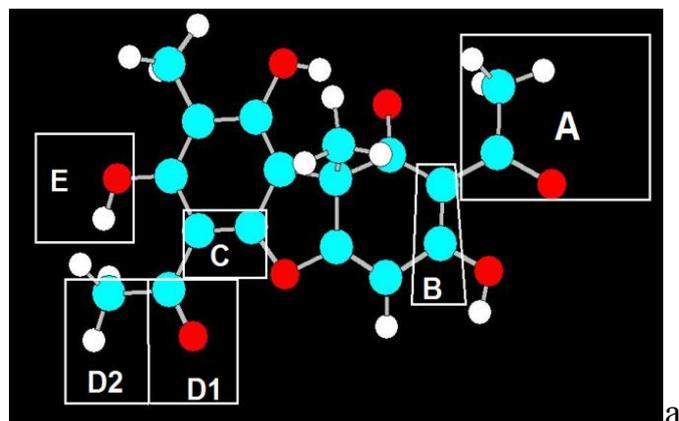


Рис. 37. а - Схема расположения заместителей в молекуле усниновой кислоты, б – нумерация атомов в молекуле усниновой кислоты.

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 остатков (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 енаминовых 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.

В настоящее время подробно изучены разнообразные биологические свойства собственно усниновой кислоты, однако данных о ее производных немного. Все описанные в литературе производные относятся к двум группам – усимины и енамины. В рамках проведенного исследования усимины не использовались.

Bruno et al (2013) рассматривали енаминовые производные усниновой кислоты с точки зрения их ранозаживляющих свойств. Интересно отметить, что

одно из исследованных авторами веществ (№6 в статье) совпадает с препаратом 607, использованным в настоящей работе. Конкретно данное соединение жаживляющих свойств не имеет, однако, близкий к нему по строению препарат №9 оказался высокоэффективным.

Исследования противораковых свойств (Bazin et al, 2008) показали, что цитотоксический эффект усниновой кислоты в отношении опухолевых клеточных линий может быть усилен после добавления полиаминовой цепи. Такие соединения по сути также представляют собой енамины, но ни один препарат, описанный в статье, не совпадал с исследованными в настоящей работе.

Ни в одной из работ, доступных на интернет-ресурсе PubMed, не были исследованы противовирусные свойства каких-либо производных усниновой кислоты. В то же время сама усниновая кислота – фармакофор исследованной группы – показала активность в отношении вирусов Эпштейна-Барр (Yamamoto et al, 1995), герпеса и полиовируса (Perry et al, 1999), (Campanella et al, 2002), папилломавируса (Scripa et al, 1999) и аренавируса Junin, возбудителя аргентинской геморрагической лихорадки (Fazio et al, 2007).

В настоящей работе оценивался спектр активности производных усниновой кислоты в экспериментах с различными штаммами вируса гриппа. Все препараты, которые были активны при первичном скрининге на штамме A/California/7/09, подтвердили свою активность и при использовании других штаммов. Особый интерес представляет тот факт, что значения химиотерапевтического индекса для штамма A/Владивосток/2/09, устойчивого к озельтамивиру, оказались выше, чем для других штаммов, а также намного выше, чем ХТИ озельтамивира. Однако, активность всех исследованных препаратов оказалась ниже, чем у препаратов сравнения – ремантадина и озельтамивира (для чувствительных штаммов).

В опытах *in vivo* на модели гриппозной пневмонии у белых мышей производные усниновой кислоты проявили умеренный (препарат 575) или низкий уровень активности. Значения индекса защиты препарата 575 составили 60% в дозе вируса 1 LD<sub>50</sub> и 33% в дозе вируса 10 LD<sub>50</sub>, кроме того, данный препарат уменьшал потерю веса у животных в ходе инфекции. Репликативная активность вируса гриппа в легочной ткани под воздействием препарата 575 также снижалась.

Результаты гистологического исследования показали, что производные УК проявляют свойства, типичные для противовирусных препаратов. Так, использование препарата 575, как и препарата сравнения ремантадина, привело к ослаблению патологического процесса, уменьшению площади очагов воспаления, сохранности альвеол.

В экспериментах по определению возможного механизма действия препаратов наиболее активного препарата (575) было показано, что вирулицидной активностью соединение не обладает.

Результаты опытов по определению стадии жизненного цикла вируса гриппа, на которую действует препарат 575, свидетельствуют о том, что мишенью его действия являются ранние стадии жизненного цикла. При этом снижение вирусного титра наблюдали либо при профилактическом внесении, либо в период адсорбции вируса на клеточной поверхности, либо непосредственно во время входа вируса в клетку и его «раздевания», однако наибольшее падение титра происходило в том случае, когда препарат находился в контакте с зараженными клетками все время эксперимента. Таким образом, можно сделать вывод о том, что противовирусное действие препарата 575, вероятно, носит кумулятивный характер и включает в себя нарушение таких стадий жизненного цикла, как адсорбция, проникновение и «раздевание».

Из литературных данных известно, что усниновая кислота эффективна на поздних стадиях жизненного цикла мышинового полиовируса (Campanella et al,

2002). Механизм действия авторам точно не известен, однако они предполагают, что усниновая кислота, вероятно, блокирует выход зрелых вирионов из клеток либо замедляет скорость транскрипции вирусных мРНК. Разница в результатах настоящей работы и данных Campanella et al. вероятно объясняется как различиями в строении и жизненном цикле вируса гриппа и полиовируса, так и разницей в химическом строении препарата 575 и его фармакофора.

Было сделано предположение о том, что мишенью производных УК является гемагглютинин. Для подтверждения этого предположения была изучена степень гемолиза куриных эритроцитов при активации гемагглютинина в присутствии и отсутствии препаратов. Показано, что препараты не оказывают влияния на активность вирусного гемагглютинина, как агента, разрушающего мембраны эритроцитов. В то же время предварительная обработка вируса перед контактом с клетками не привела к его инаktivации (см. выше), что позволяет сделать вывод о том, что, несмотря на активность препаратов на ранних стадиях жизненного цикла вируса гриппа, гемагглютинин не является их мишенью.

В связи с полученными данными о том, что чувствительность озельтамивир-устойчивого вируса А/Владивосток/2/09 к производным усниновой кислоты оказалась сильнее, чем у других вирусов, была изучена их ингибирующая активность в отношении вирусной нейраминидазы. Препарат 575, хотя и ингибировал вирусную нейраминидазу слабо по сравнению с озельтамивиром, однако делал это независимо от наличия или отсутствия устойчивости к озельтамивиру, которая у штамма А/Владивосток/2/09 вызвана мутацией Н274У. Это позволяет сделать предположение, что производные усниновой кислоты способны связываться с нейраминидазой.

Компьютерное моделирование сайта связывания препаратов с вирусной нейраминидазой показало, что все наиболее активные производные усниновой

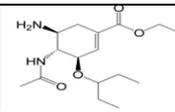
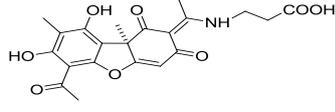
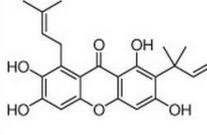
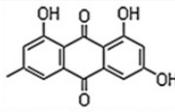
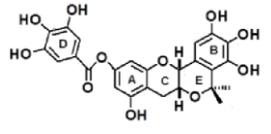
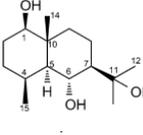
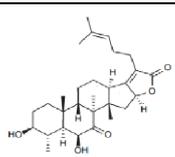
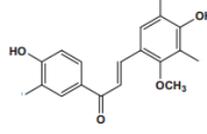
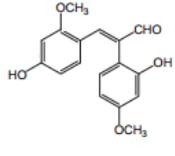
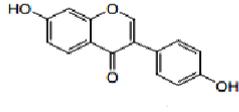
кислоты связываются с аминокислотами нейраминидазы в положениях 209 и 210. Оба эти положения выходят за пределы каталитического центра молекулы нейраминидазы. Следовательно, если активность препарата 575 обусловлена анти-нейраминидазной активностью, то работает он как аллостерический ингибитор.

Аллостерические ингибиторы известны для многих ферментов. Они открыты для клеточных протеинкиназ (Rastelli et al, 2014), протеосомных белков (Witkowska et al, 2014) и многих других белков. В настоящее время ведутся работы по разработке аллостерических ингибиторов обратной транскриптазы и интегразы ВИЧ (Al-Mawsawi et al, 2011).

Есть сведения также об аллостерическом ингибировании нейраминидазы вируса гриппа. По данным Wu et al (1995) триацетазон, бактериостатический агент, использующийся в терапии туберкулеза, является неспецифическим ингибитором нейраминидазы вируса гриппа A/WSN/33. Механизм действия заключается в том, что триацетазон конкурирует с ионами  $Ca^{2+}$ , которые поддерживают вирусную нейраминидазу в активном состоянии. К сожалению, данное вещество оказалось неспособным ингибировать нейраминидазы других штаммов. Таким образом, предположение о неспецифическом связывании производных УК с вирусной нейраминидазой представляется вероятным.

Также известно о существовании ингибиторов нейраминидазы среди веществ природного происхождения. Среди них встречаются моно-, ди- и трициклические соединения различной структуры. В таблице №19 приведены химические формулы этих веществ, а также значения ЭД<sub>50</sub>.

**Таблица 19. Ингибиторы нейраминидазы, обнаруженные среди веществ природного происхождения.**

Препарат (класс веществ)	Формула	ЭД <sub>50</sub> , нМ	Статья
Озелтамивир		0.7	Собственные данные
575		2300	Собственные данные
(Ксантон)		80	Ryu et al, 2009
Эмодин		2810	Lee et al, 2003
(Флавоноид)		50000	Kang et al, 2014
(Сесквитерпеноид)		600	Song et al, 2014
Стрептосеолактон		3000	Jiao et al, 2013
(Халькон)		12000	Dao et al, 2011
(Стилбеноид)		14000	Nguyen et al, 2010
(Изофлавоон)		22000	Liu et al, 2008

Как видно из представленной таблицы, препарат 575, хотя и уступает по своей активности озельтамивиру, однако, является более активным, чем ингибиторы нейраминидазы класса флавоноидов (Kang et al, 2014), изофлавонов (Liu et al, 2008) и стилбеноидов (Nguen et al, 2010) и сопоставим по активности с такими веществами, как эмодин (Lee et al, 2003) и стрептосеолактон (Jiao et al, 2013). Интересно, что представители класса хальконов также проявляли анти-нейраминидазную активность (Dao et al, 2011), что согласуется с данными о противовирусной активности хальконовых производных усниновой кислоты, приведенных выше.

Весьма высокую анти-нейраминидазную активность проявляли вещества класса ксантонов, которые, также как и производные усниновой кислоты, представляют собой трициклические соединения с атомом кислорода в центральном кольце (Ryu et al, 2009). Также высокую активность проявило вещество класса сесквитерпеноидов (Song et al, 2014)

Таким образом, производные усниновой кислоты проявляют анти-нейраминидазную активность на уровне, близком к другим ингибиторам нейраминидазы, полученными из природных соединений, а также сходны по строению с некоторыми из них.

Для того чтобы более детально изучить механизм действия производных УК, была проведена селекция вирусных штаммов, устойчивых к препарату 575, после чего определена первичная последовательность вирусных генов для выявления мутаций, которые могут быть ответственны за приобретение резистентности. После 13 пассажей в присутствии препарата 575 не выработалось фенотипической устойчивости, а генетические исследования показали, что в генах гемагглютинирина, нейраминидазы и M2 не выработалось никаких мутаций, что является несомненным достоинством. Существует два вероятных объяснения данного факта:

1. Связывание производных УК с нейраминидазой является 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 противовирусной активности

В пользу первой гипотезы говорит тот факт, что препарат 575 проявлял активность, значительно меньшую по сравнению такими ингибиторами нейраминидазы, как озельтамивир или занамивир. В случае, если производные усниновой кислоты имеют клеточную мишень, отсутствие устойчивых штаммов естественно, однако остается неясным, какая именно это мишень. Противовирусные неэтиотропные препараты делятся на несколько групп: противовоспалительные средства, интерфероны и их индукторы, ингибиторы клеточных сигнальных путей, используемых вирусами.

Принадлежность производных усниновой кислоты к противовоспалительным соединениям представляется маловероятной, поскольку они проявляли свою противовирусную активность не только на животных, но и *in vitro* на культуре тканей, где полноценный воспалительный процесс невозможен.

Более интересно предположение о возможной индукции интерферонов под действием производных УК. По своим химическим свойствам индукторы интерферона принадлежат к ароматическим углеводам (циклоферон, амиксин), нуклеиновым кислотам (полудан, ридостин), полифенолам (кагоцел) и др. (Ершов и др., 2005). Лишайниковых веществ или их производных в этой группе нет, также как и сведений об индукции интерферонов под действием усниновой кислоты или ее производных, однако полностью исключить эту вероятность невозможно.

Принадлежность производных УК к ингибиторам клеточных сигнальных путей, используемых вирусами, также вероятна. Например, при инфицировании вирусом гриппа активируется сигнальный путь NF-κB, который регулирует острый воспалительный ответ, апоптоз и ответ на вирусную инфекцию. Данный сигнальный путь оканчивается активацией каспаз, которые вызывают деградацию ядерных пор и облегчают диффузию вирусных РНП из ядра, где происходит их синтез (Mazur et al, 2007). К препаратам данной группы относится, например, бортезомиб. Противоречит предположению о таком механизме противовирусной активности тот факт, что усниновая кислота является индуктором, а не ингибитором апоптоза в раковых клеточных линиях за счет активации каспазы-3 (Baskorova et al, 2012).

Еще один клеточный механизм, используемый вирусом гриппа – это сигнальный путь Raf/MEK/ERK, который используется вирусом для транспорта РНП к плазматической мембране (Olschläger et al, 2004). Данные о взаимодействии усниновой кислоты или ее производных с компонентами данного пути отсутствуют, однако ингибиторы этого пути используются в качестве противораковых средств, в то время как антионкогенные свойства усниновой кислоты широко известны (Mayer et al, 2005), (da Silva Santo et al, 2006), (Kumar et al, 1999). То же самое можно сказать и о сигнальном пути C-Jun киназы, которая также используется вирусом гриппа.

Ингибиторы тирозин-киназных рецепторов также проявляют противогриппозную активность (Kumar et al, 2011). Препараты этой группы ингибируют синтез вирусспецифических РНК, блокируют ядерный экспорт вирусных РНП, а также предотвращают почкование дочерних вирусных частиц. Так как все три процесса относятся к поздним стадиям жизненного цикла вируса гриппа, то участие производных УК в ингибировании тирозин-киназных рецепторов представляется маловероятным.

Одним из важных процессов, обеспечивающих репликацию вируса гриппа, является аутофагия. По данным Zhou et al (2009) гриппозная инфекция запускает в зараженных клетках образование аутофагосом, при ингибировании этого процесса вортманином инфекционность вирусного потомства снижается примерно на порядок. Точный механизм данного типа взаимоотношений вируса и клетки остается до конца невыясненным. Вероятность использования производными УК аутофагии нельзя исключить.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод о том, что механизм действия производных УК может заключаться либо в аллостерическом ингибировании вирусной нейраминидазы, либо в индукции интерферона, либо в ингибировании таких клеточных сигнальных путей как Raf/MEK/ERK, C-Jun киназный путь, тирозинкиназный путь, либо образования аутофагосом. Для точного ответа на этот вопрос требуются дополнительные исследования.

В связи с упоминанием в литературе высокой гепатотоксичности усниновой кислоты было проведено гистологическое исследование тканей печени мышей, получавших усниновую кислоту и препарат 575. Показано, что при применении препарата 575 токсическое поражение печени выражено в значительно меньшей степени, чем в случае введения усниновой кислоты, однако полностью не устранено. Таким образом, показано, что аминокислотная модификация снижает гепатотоксичность усниновой кислоты.

### **Заключение.**

В настоящей работе проведено исследование противовирусной активности производных усниновой кислоты. Из 95 исследованных при первичном скрининге соединений 27 проявили противовирусную активность. Показано, что наибольшую активность проявляют енаминовые производные, несущие аминокислотные заместители; производные, несущие CF<sub>3</sub>-группу; пиразольные производные, а также хальконы и тиазольные производные, несущие метокси-группу.

Часть из наиболее активных препаратов была исследована *in vivo* в опытах на летальной гриппозной пневмонии у белых мышей. Наиболее активным зарекомендовал себя препарат 575, аминокислотное производное енамина усниновой кислоты, чей индекс защиты составил 60%. Кроме того, данный препарат уменьшал потерю веса в ходе инфекции, уменьшал титры вируса в легочной ткани, а также снижал гриппозное поражение легких.

Далее в серии экспериментов было показано, что препарат 575 обладает наибольшей активностью на ранних стадиях жизненного цикла вируса гриппа, однако не оказывает вирулицидного действия либо влияния на гемагглютинин вируса гриппа. При этом препарат 575 обладает 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 гемагглютинина, нейраминидазы или M2-белка вируса гриппа.

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

В заключение следует отметить, что результаты, полученные в настоящей работе, служат указанием для синтеза нового класса лекарственных веществ широкого спектра действия.

### **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 vitro*. Наиболее активен препарат 575, аминокислотное 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 устойчивость к препарату 575 не вырабатывается.

## Список литературы:

1. Блинов В.М. Анализ потенциальных участков рекомбинации в генах гемагглютинина вирусов гриппа животных в отношении их адаптации к новому хозяину – человеку. / В.М. Блинов, О.И. Киселев, С.М. Ресенчук // *Вопр. Вирусологии* – 1993 – №38 – С.263-268
2. Ершов Ф.И. Интерфероны и их индукторы / Ф.И. Ершов, О.И. Киселев – СПб, 2005.
3. Кингсбери Д. Вирусология / Д. Кингсбери – М.: Мир, 1989 – №2 – 448 с.
4. Киселев О.И. Пандемический грипп 2009 года в России. Диагностика и молекулярно-биологическая характеристика вируса / О.И. Киселев, А.Б. Комиссаров, М.А. Стукова и др. // *Вопр. Вирусологии* – 2011 – №56(1) – С.17-21
5. Лазуревский Г.В. Практические работы по химии природных соединений / Г.В. Лазуревский, Е.В. Терентьева, А.А. Шамшуринов – М.: Высшая школа, 1966.
6. Ленева И.А. Грипп А(H1N1): Стратегия выбора противовирусных препаратов для лечения гриппа и ОРВИ / И.А. Ленева // Доклад на Всерос. ежегод. конгр. «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика») – СПб, 2010
7. Литвинова О. М. Этиология современного гриппа / О. М. Литвинова, Е.А. Смородинцева, Э.Г. Деева и др. // *Грипп и другие респираторные вирусные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия* – СПб, 2003.
8. Покровский В.И. Грипп птиц: происхождение инфекционных биокатастроф / под ред. В.И. Покровского, Л.С. Сандахчиева, В.В. Малеева и др. – СПб.: изд-во «Росток», 2012. – 358 С.
9. Савватеева Л. Ю. Научное обоснование и перспективы пищевого использования ягеля, содержащего усниновую кислоту / Л. Ю. Савватеева, Е. Г. Туршук // *Актуальные вопросы развития профилактической медицины и формирования здорового образа жизни* – Иркутск: РИО ИГИУВа, 2010. – 180 с.
10. Слепушкин А.Н. Эпидемиологические особенности гриппа последних лет / А.Н. Слепушкин, Д.К. Львов, И.Г. Маринич и др. // *Вопр. вирусологии.* – 1998. - №2 – С. 59-62.
11. Филдс Б. Вирусология / Б. Филдс, Д. Найп. – М.: Мир - 1989 - № 2.
12. Air GM. Influenza neuraminidase / G.M. Air // *Influenza Other Respi Viruses* – 2012 – №6 – p.245–256.
13. Al-Mawsawi L.Q. Allosteric inhibitor development targeting HIV-1 integrase / L.Q. Al-Mawsawi N. // *Chem Med Chem* – 2011 – №6 (2) –p. 228-41.
14. Ambrose C. S. The rationale for quadrivalent influenza vaccines / C. S.Ambrose, M. J. Levin // *Hum Vaccin Immunother* – 2012 – №8(1) – p. 81–88.

15. Aoki F.Y. Influenza virus susceptibility and resistance to oseltamivir / F.Y. Aoki, G. Boivin, N. Roberts et al // *Antivir Ther* – 2007 – №12 – p.89–97
16. Area E. Three-dimensional structure of the influenza virus RNA polymerase: localization of subunit domains / E. Area, J. Martín-Benito, P. Gastaminza et al // *Proc. Nat Acad. Sci. USA* – 2004 – №101 – p.308–313.
17. Ashton L.V. In vitro susceptibility of canine influenza A (H3N8) virus to nitazoxanide and tizoxanide / L.V. Ashton, R.L. Callan, S. Rao et al // *Vet Med Int* – 2010 - №1- p.1-4
18. Backorova M. Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines / M. Backorova, R. Jendželovský, M. Kello et al // *Toxicol In Vitro* – 2012 – №26(3) – p.462-8
19. Baudin F. In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein / F. Baudin, I. Petit, W. Weissenhorn, R.W. Riegrok // *Virology* – 2001 – №281 – p.102-108.
20. Bazin M.A. Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives / M.A. Bazin, A.C. Le Lamer, J.G. Delcros et al // *Bioorg Med Chem* – 2008 – №16(14) – p.6860-66
21. Bergerhausen, H. Deodorizing action of a complex of usnic acid / H. Bergerhausen // *Cosm Toiletries* - 1976 – №91 – p.25–26.
22. Besselaar T.G. Widespread oseltamivir resistance in influenza A viruses (H1N1), South Africa / T.G. Besselaar, D. Naidoo, A. Buys et al // *Emerg Infect Dis* – 2008 – №14 – p.1809-10
23. Blagburn B.L Comparative efficacy evaluation of dicationic carbazole compounds, nitazoxanide and paromomycin against *Cryptosporidium parvum* infections in a neonatal mouse model / B.L Blagburn, K.L. Drain, T.M. Land et al // *Antimicrob. Agents Chemother* – 1998 – №42 – p. 2877–2882
24. Blaising J. Arbidol as a broad-spectrum antiviral: an update / J. Blaising, S. J. Polyak, E.I. Pécheur // *Antiviral Research*- 2014 - №107 –p. 84–94
25. Boivin S. Influenza A virus polymerase: structural insights into replication and host adaptation mechanisms // S. Boivin, S. Cusack, R.W. Ruigrok et al// *J Biol Chem* – 2010 – №285(37) – p.28411-17.
26. Bruno M. Synthesis of a Potent Antimalarial Agent through Natural Products Conjugation / M. Bruno, B. Trucchi, D. Monti et al. // *Chem Med Chem.* – 2013 – №8(2) – p.221-5
27. Bruno M. (+)-Usnic acid enamines with remarkable cicatrizing properties / M.Bruno, B. Trucchi, B. Burlando et al. – *Bioorg Med Chem* – 2013 – №21(7) – p.1834-43

28. Burls A. Zanamivir for the treatment of influenza in adults: a systematic review and economic evaluation / A. Burls, W. Clark, T. Stewart et al. // Health Technol Assess – 2002 – №6(9) – p.81-87
29. Busher D.J. Incorporation of influenza virus M-protein into liposomes / D.J. Busher, J.G. Kharitonov, J.A. Zakordin et al // J Virol – 1980 – №36 – p.586-590.
30. Campanella L. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription / L. Campanella, M. Delfini, P. Ercole et al // Biochimie – 2002 – №84(4) – p.329-34.
31. Cavier R. Etude de diverses associations d'anthelminthiques chez la souris / R. Cavier, J.F. Rossignol // Rev. Méd. Vét – 1982 - №133 - p. 779–783
32. Chandra P. Influence of tilorone and cogeners on the secondary structure and template activity of DNA / P. Chandra, M. Woltersdorf // FEBS Lett – 1974 - №41(1) – p.169-73.
33. CDC. Updated interim recommendations for the use of antiviral medications in the treatment and prevention of influenza for the 2009-2010 season – 2010 – Режим доступа: <http://www.cdc.gov/H1N1flu/recommendations.htm>
34. CDC. Key Facts About Seasonal Influenza – 2009 – Режим доступа: <http://www.cdc.gov/flu/keyfacts.htm>
35. Cole N.B. Compendium of drugs commonly used in molecular biology research / N.B. Cole // Curr Protoc Mol Biol – 2002 – №10 – p.1002-6
36. Compans R. Influenza lipid membrane / R. Compans, H. Klenk // Complehen. Virol – 1979 – №13 – p.293-407
37. Dao T. Chalcones as novel influenza A (H1N1) neuraminidase inhibitors from *Glycyrrhiza inflata* / T.Dao, P.Nguyen, H.Lee et al // Bio Med Chem Lett – 2011 – №21(1) – 294-298
38. Dailey R.N. Toxicity of the lichen secondary metabolite (+)-usnic acid in domestic sheep / R.N. Dailey, D.L. Montgomery, J.T. Ingram et al // Vet Pathol. – 2008 – №45(1) – p.19-25.
39. De Carvalho E.A. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study / E.A. De Carvalho, P.P. Andrade, N.H. Silva et al // Phytother Res – 2005 – №36(2) – p.155-61.
40. Davies W. Anti-viral activity of R-adamantanamine / W. Davies, R.R. Grunnert, R.R. Haff et al // Science – 1964 - №144 – p.862-863
41. Doan L. Metal ion catalysis of RNA cleavage by the influenza virus endonuclease / L. Doan, B. Handa, N.A. Roberts // Biochemistry – 1999 – №38 – p.5612-5629
42. Doucette K.E. Oseltamivir: a clinical and pharmacological perspective / K.E. Doucette, F.Y. Aoki // Expert Opin Pharmacother – 2001 - №2(10) – p.1671-83.

43. Dubreuil L. *In vitro* evaluation of activities of nitazoxanide and tizoxanide against anaerobes and aerobic organisms / L. Dubreuil, I. Houcke, Y. Mouton et al // *Antimicrob Agents Chemother* – 1996 – №40 - p. 2266–2270
44. Durrant J.D. Potential drug-like inhibitors of Group 1 influenza neuraminidase identified through computer-aided drug design / J.D. Durrant, J.A. McCammon // *Comput Biol Chem* – 2010 – №34(2) – p.97-105
45. Elton D. Identification of amino acid residues of influenza virus nucleoprotein essential for RNA binding / D. Elton, L. Medcalf, K. Bishop et al // *J Virol* – 1999 – № 73 – p.7357-7367
46. Fazio A.T. Lichen secondary metabolites from the cultured lichen mycobionts of *Teloschistes chrysophthalmus* and *Ramalina celastri* and their antiviral activities. / A.T. Fazio, M.T. Adler, M.D. Bertoni et al // *C. Naturforsch* – 2007 – № 62(7-8) – p.43-9.
47. Fielding J.E. Moderate influenza vaccine effectiveness in Victoria, Australia, 2011 / J.E. Fielding, K.A. Grant, T. Tran et al // *Euro Surveill.* – 2012 – №15 – p.11-17
48. Furuta Y. T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA viral infections / Y. Furuta , K. Takahashi, K. Shiraki et al // *Antiviral Res.* – 2009. – №82. – p.95-102
49. Furuta Y. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor / Y. Furuta, B.B. Gowen, K. Takahashi et al // *Antiviral Res* – 2013 – №100(2) – p.446-54.
50. Ghione M. Usnic acid revisited, its activity on oral flora / M. Ghione, D. Parrello, L. Grasso et al // *Chemioterapia* – 1988 – № 7 – p. 302–305.
51. Govorkova E.A. Antiviral resistance among highly pathogenic influenza A (H5N1) viruses isolated worldwide in 2002-2012 shows need for continued monitoring / E.A. Govorkova, T. Baranovich, P. Seiler et al // *Antiviral Res* – 2013 – №98(2) – p.297-304
52. Grambas S. Influence of amantadine resistance mutations on the pH regulatory function of the M2 protein of influenza A viruses / S. Grambas, M.S. Bennett, A.J Hay // *Virology* – 1992 – №2 – p.541–549
53. Hamilton B.S. Influenza virus-mediated membrane fusion: determinants of hemagglutinin fusogenic activity and experimental approaches for assessing virus fusion / B.S. Hamilton, G.R. Whittaker, S. Daniel // *Viruses* – 2012 – №4(7) – p.1144-68.
54. Han D. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress / D. Han, K. Matsumaru, D. Rettori et al // *Biochem Pharmacol* – 2004 – №67(3) — p.439-51.

55. Hauck M. Usnic acid controls the acidity tolerance of lichens / M. Hauck, S.R. Jürgens // Environ Pollut – 2008 – №156(1) – p.115-22
56. Hay A.J. The matrix protein gene determines amantadine-sensitivity of influenza viruses / A.J. Hay, N.T.C. Kennedy, J.J. Skehel et al // J Gen Virol – 1979 - №42 – p.189-191
57. Hosoya M. Differential inhibitory effects of sulfated polysaccharides and polymers on the replication of various myxoviruses and retroviruses, depending on the composition of the target amino acid sequences of the viral envelope glycoproteins / M. Hosoya, J. Balzarini, S. Shigeta et al // Antimicrob Agents Chemother –1991 – №12 – 2515-20.
58. Huarte M. PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators / M. Huarte, J.J. San-Ezquerro, F. Ronsal et al // J Virol – 2001– №75 – p.8597-8604
59. Jiao R.H. Neuraminidase inhibitors from marine-derived actinomycete *Streptomyces seoulensis* / R.H. Jiao, H. Xu, J.T. Cui et al // Journal of Applied Microbiology – 2013 – №114(4) – p. 1046–1053
60. Jong J.S. Influenza A (H5N1) in Hong Kong: Forerunner of pandemic or just a scientifically interesting phenomenon and useful exercise in pandemiology? / J.S. Jong., E.C. Claas, A.D. Osterhaus // Ned Nijdschr Geneeskrd – 1998 – №142 – p. 1252-1256.
61. Inglot A.D. Induction of interferon in mice by sodium salt of 9-oxo-10-acridineacetic acid: specific enhancement by analogs / A.D. Inglot, J. Młochowski, Z. Szulc et al // Arch Immunol Ther Exp (Warsz) – 1985 - №33(2) – p.275-85
62. Ingolfssdottir K. Usnic acid / K. Ingolfssdottir // Phytochemistry – 2002 – №61 – p.729-33
63. Kang J. Studies on the bioactive flavonoids isolated from *Pithecellobium clypearia* Benth / J. Kang, C.Liu, H. Wang et al // Molecules – 2014 - №19(4) – p.4479-4490
64. Kramer M.J. Antiviral activity of 10-carboxymethyl-9-acridanone / M.J. Kramer, R. Cleeland, E. Grunberg // Antimicrob Agents Chemother – 1976 - №9(2) – p.233-8
65. Kubo S. Laninamivir prodrug CS-8958, a long-acting neuraminidase inhibitor, shows superior anti-influenza virus activity after a single administration / S. Kubo, T. Tomozawa, M. Kubata et al // Antimicrob Agents Chemother – 2010 – №54 – p.1256–1264.
66. Kumar K.C.S. Lichen metabolites. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic and diffractaic acid on human keratinocyte growth / K.C.S. Kumar, K. Muller // J. Nat. Prod – 1999 – №62 – p. 821–823
67. Kumar N. Receptor tyrosine kinase inhibitors that block replication of influenza a and other viruses / N. Kumar, N.R. Sharma, H. Ly et al // Antimicrob Agents Chemother – 2011 – №55(12) –p.5553-9.

68. Lauterwein M. In Vitro Activities of the Lichen Secondary Metabolites Vulpinic Acid,(+)-Usnic Acid, and (-)-Usnic Acid against Aerobic and Anaerobic Microorganisms / M. Lauterwein, M. Oetinger, K. Belsinger et al // *Antimicrobial agents and chemotherapy* – 1995 – № 39 (11) – p. 2541–2543
69. Lee C. H. Neuraminidase inhibitors from *Reynoutria elliptica* / Lee C. H., Kim SI, Lee KB et al // *Arch Pharm Res* – 2003 – №26 (5) – p.367-74
70. Leneva I.A. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: Implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol / I.A. Leneva, Rupert J. Russell c, Yury S. Boriskind et al // *Antiviral Research* – 2009 - №81 – p.132-140
71. Liu A. Structure–activity relationship of flavonoids as influenza virus neuraminidase inhibitors and their in vitro anti-viral activities /A.Liu, H.Wang, S.Lee et al // *Bio Med Chem Lett* – 2008 - №16(15) – p.7141-7147
72. Loughlin J.E. Risk for respiratory events in a cohort of patients receiving inhaled zanamivir: a retrospective study / J.E. Loughlin, T.D. Alfredson, A.N. Ajene et al // *AM. Clin Ther* – 2002 – №24(11) –p.1786-99.
73. Maeda T. Activation of influenza virus by acidic media causes hemolysis and fusion of erythrocytes / T. Maeda, S. Ohnishi // *FEBS Lett* – 1980 – №122(2) – p.283-7
74. Massarella J.W. The pharmacokinetics and tolerability of the oral neuraminidase inhibitor oseltamivir (Ro 64-0796/GS4104) in healthy adult and elderly volunteers / J.W. Massarella, G.Z. He, A. Dorr et al // *J Clin Pharmacol.* – 2000 – №40(8) – p.836-43
75. Massa EM Effect of auto-oxidized phospholipids on oxidative enzyme assays based on tetrazolium salt reduction / Massa EM Fariás RN // *Biochim Biophys Acta* – 1983 – №746(3) – p.209-15
76. Mayer M. Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties / M. Mayer, N.A. O'Neill , K.E. Murray et al // *Anticancer Drugs* – 2005 – №16(8) – p.805-9
77. Mazur I. Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF-kappaB-inhibiting activity / I. Mazur, W.J. Wurzer, C. Ehrhardt et al // *Cell Microbiol* – 2007 – №9(7) – p.1683-94
78. McNicholl I.R. Neuraminidase inhibitors: zanamivir and oseltamivir / I.R. McNicholl, J.J. McNicholl // *Ann Pharmacother* – 2001 – №35(1) – p.57-70.
79. Murakami T. Direct virus inactivation of tachyplesin I and its isopeptides from horseshoe crab hemocytes / Murakami T. Niwa M, Tokunaga F. et al // *Chemotherapy* – 1991 – №37 – p.327–34.
80. Muramoto Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA / Y. Muramoto, T. Noda, E. Kawakami et al // *J Virol* – 2013 – №87(5) – p.2455-62.

81. Nguen P. New stilbenoid with inhibitory activity on viral neuraminidases from *Erythrina addisoniae* / H.Nguen, M.Na, T.Dao et al // Bio Med Chem Lett – 2010 - №20(22) – p.6430-34
82. Novak D. Drug-induced liver disease / D. Novak, J.H. Lewis // Curr Opin Gastroenterol – 2003 – №19(3) –p.203-15
83. Ohuchi M. Roles of neuraminidase in the initial stage of influenza virus infection / M. Ohuchi, N. Asaoka, T. Sakai et al // Microb Inf – 2006 – №8 – p.1287-1293
84. Olschläger V. Lung-specific expression of active Raf kinase results in increased mortality of influenza A virus-infected mice / V. Olschläger, S. Pleschka, T. Fischer et al // Oncogene – 2004 – №23(39) – p.6639-46.
85. Palese P. Why do influenza virus subtypes die out? A hypothesis / P. Palese, T. T. Wang // mBio – 2011– № 2(5) – p.150-11.
86. Peres D.R. The matrix 1 protein of influenza A virus inhibits the transcriptase activity of a model influenza reporter genome in vivo / D.R. Peres, P. Donis // Virology – 1998 – №249 – p.52-59
87. Perry N.B. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens / N.B. Perry, M.H Benn, N.J. Brennan et al // Lichenologist. – 1999 – №31 – p.627-36
88. Pinto L.H. A functionally defined model for the M2 proton channel of influenza A virus suggests a mechanism for its ion selectivity / L.H. Pinto, C.S. Diekmann, C.G. Gandi et al // Proc Nat Acad Sci USA – 1997 – V.94 – p.11301-11306
89. Pompilio A. Antimicrobial and antibiofilm activity of secondary metabolites of lichens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cystic fibrosis patients / A. Pompilio, S. Pomponio, V. Di Vincenzo et al // Future Microbiol – 2013 – №8 – p.281-92
90. Rastelli G. Structure-based discovery of the first allosteric inhibitors of cyclin-dependent kinase 2 / G. Rastelli, A. Anighoro, M. Chripkova et al // Cell Cycle – 2014 – №13(14) – p. 2296-305
91. Reed L.J. Simple method of estimating fifty per cent endpoints / L.J. Reed, H.A. Muench // Am J Hyg – 1938 –№27 – p.493–497
92. Ruigrok R.W.H. Textbook of influenza // под ред. K. Nicholson, R.Webster, A.Hay – 1998 – P.29-42
93. Rota P.A. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983 / P.A. Rota, T.R. Wallis, M.W. Harmon et al // Virology – 1990 – №175 – p.59–68.
94. Rossman J.S. Influenza virus assembly and budding / J.S. Rossman, R. A. Lamb // Virology – 2011 –№411(2) – p. 229–236.
95. Ryu Y. B. Characteristic of neuraminidase inhibitory xanthenes from *Cudrania tricuspidata* /Y. B. Ryu, M. J. Curtis-Long, J.W. Lee et al // Bio Med Chem – 2009 – №7(1) – p.22744-50
96. Samji T Influenza A: understanding the viral life cycle / Samji T // Yale J Biol Med – 2009 – №82(4) – p.153-9

97. Sanchez W. Severe hepatotoxicity associated with use of a dietary supplement containing usnic acid / Sanchez W, Maple JT, Burgart LJ, Kamath PS // Mayo Clin Proc – 2006 - №81(4) – p.541-4.
98. Schirmer P. Effective detection of the 2009 H1N1 influenza pandemic in U.S. Veterans Affairs medical centers using a national electronic biosurveillance system / P. Schirmer, C. Lucero, G. Oda et al // PLoS One – 2010 – №5(3)
99. Scholtissek C. How to overcome resistance of influenza A viruses against adamantane derivatives / C. Scholtissek, G. Quack, H.D. Klenk et al // Antiviral Research – 1998 – №37 – p.83–95
100. Scholtissek C. Molecular evolution of influenza viruses / Scholtissek C // Virus Genes – 1996 – №11 – p.209-215
101. Schotsaert M. Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments / M. Schotsaert, M. De Filette, W. Fiers et al // Expert Rev Vaccines – 2009 – №8(4) – p.499–508.
102. Scirpa P. A zinc sulphate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy ingential lesion by human papillomavirus / P. Scirpa, G. Scambia, S. Masciullo et al // Minerva Ginecol – 1999 – №51 – p.255–260.
103. da Silva Santos N.P. Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity / N.P. da Silva Santos, S.C. Nascimento, M.S. Wanderley et al // Eur J Pharm Biopharm – 2006 – №64(2) – p.154-60
104. Scharfenorth H. Zur Epidemiologie und Klinik der Influenza C-Infektion / H. Scharfenorth, H. Glathe, H. Giese et al // ZKM: Z Klin Med – 1991 – №46 – p.1183-1187
105. Shibata S. Relation between chemical constitutions and antibacterial effects of usnic acid and derivatives / S. Shibata, T. Ukita, T. Tamura et al // Jap Med J – 1948 – №1 – p.152–155.
106. Smith C.B. Ribavirin: a broad spectrum antiviral agent / C.B. Smith, W. Kirkpatrick // Academic press, New York – 1980 - №1 – p.237-9
107. Song J.Y. Clinical, laboratory and radiologic characteristics of 2009 pandemic influenza A/H1N1 pneumonia: primary influenza pneumonia versus concomitant/secondary bacterial pneumonia / J.Y. Song, H.J. Cheong, J.Y. Heo et al // Influenza Other Respir Viruses – 2011– №5(6) – p.535-43
108. Song A. Discovery of a new sesquiterpenoid from *Phellinus ignarius* with antiviral activity against influenza virus / A. Song, X. Sun, C. Kong et al // Archives of Virology – 2014 – №159 (4) – p.753-760
109. Stoll A. Die Wirkung von Flechtenstoffen auf Tuberkelbakterien und auf einige andere Mikroorganismen. Schweiz Z / A. Stoll, A. Brack, J. Renz, et al // Path Bakt – 1950 – № 13 – p.729–751.

110. Suarez D.L. Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A virus isolated from humans and chickens from Hong Kong / D.L. Suarez, M.L. Perdue, N.J Cox. et al // *J Gen Virol* – 1998 – №72. – p.6678-6688.
111. Takai M. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents / M. Takai, Y. Uehara, J.A. Beisler et al // *J Med Chem* – 1979 – № 22 – p.1380–1384.
112. Tong S. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses / S. Tong, X. Zhu, Y. Li et al // *PLOS Pathogens* – 2013 – №1
113. Toyoda T. Molecular assembly of the influenza virus RNA polymerase: determination of the subunit-subunit contact sites / T. Toyoda, D.M. Adyshev, Kobayashi M. et al // *J Gen Virol* – 1996 – №77 – p.2149-2157
114. van der Vries E. H1N1 2009 pandemic influenza virus: resistance of the I223R neuraminidase mutant explained by kinetic and structural analysis / E. van der Vries, P.J. Collins, S.G. Vachieri et al // *PLoS Pathog* – 2012 – №8(9)
115. Wahlgren J. Influenza A viruses: an ecology review / J. Wahlgren // *Infect Ecol Epidemiol* – 2011– №1
116. Wang T. Comparative binding energy (COMBINE) analysis of influenza neuraminidase-inhibitor complexes / T. Wang, R.C Wade // *J Med Chem* – 2001 – №44 – p.961-971
117. Weber F. A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins / F. Weber, G. Kochs, S. Gruber et al // *Virology* – 1998 – №250 – p.9-18
118. Webster R.G. Evolution and ecology of influenza A virus. / R.G. Webster, W.J. Bean, O.T. Gorman et al // *Microbial Rev* –1992 – №56 – p.152-179
119. WHO. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H5N1) reported to who – 2012 – Режим доступа:  
[Http://www.Who.Int/influenza/human\\_animal\\_interface/h5n1\\_cumulative\\_table\\_archives/en/index.Html](http://www.Who.Int/influenza/human_animal_interface/h5n1_cumulative_table_archives/en/index.Html)
120. WHO. Influenza A(H1N1) Virus Resistance to Oseltamivir: 2008 Southern Hemisphere Influenza Season – 2008 – Режим доступа:  
[http://www.who.int/csr/disease/influenza/oseltamivir\\_summary\\_south\\_2008/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/influenza/oseltamivir_summary_south_2008/en/index.html)
121. Witkowska J. Dissecting a role of a charge and conformation of Tat2 peptide in allosteric regulation of 20S proteasome / J. Witkowska, P. Karpowicz, M. Gaczynska et al // *J Pept Sci* – 2014 – № 20(8) – p.649-56
122. Woods J. M. 4-Guanidino-2,4-dideoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminic acid is a highly effective inhibitor both of the sialidase (neuraminidase) and of growth of a wide range of influenza A and B viruses in vitro / J. M. Woods, R. C. Bethell, J. A. Coates et al // *Antimicrob Agents Chemother* – 1993 - №37(7) – p.1473-1479

123. Wu J.C. Non-sialate inhibitor of influenza A/WSN/33 neuraminidase / J.C. Wu, G.W. Peet, S.J. Coutts et al // *Biochemistry* – 1995 – №34(21) – p.7154-60.
124. Wu J.Z. Ribavirin, viramidine and adenosine-deaminase-catalysed drug activation: implication for nucleoside prodrug design / J.Z. Wu, C.C. Lin, Z.J. Hong // *Antimicrob Chemother* - 2003 - №52(4) – p.543-6.
125. Yang P. Hemagglutinin specificity and neuraminidase coding capacity of neuraminidase-deficient influenza viruses / P. Yang, A. Bansal, C. Lui et al // *Virology* – 1997 – №229 – P.771-776
126. Yamamoto Y. Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation / Y. Yamamoto, Y. Miura, Y. Kinoshita et al // *Chem Pharm Bull (Tokyo)* – 1995 – №43(8) – p.1388-90.
127. Zhou Z. Autophagy is involved in influenza A virus replication / Z. Zhou, X. Jiang, D. Liu et al // *Autophagy* – 2009 – №5(3) – p.321-8.

**Приложение 1. Аминокислотные последовательности в гемагглютинине вируса A/PR8/34 (H1N1). S – исходный штамм, R – вирус после 13 пассажей в присутствии препарата 575.**

Вирус	Последовательность
A/PR/8/34	1- MKANLLVLLSALAAADADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLED SHNGKLCR
S	1- MKANLLVLLSALAAADADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLED SHNGKLCR
R	1- MKANLLVLLSALAAADADTICIGYHANNSTDTVDTVLEKNVTVTHSVNLLED SHNGKLCR
A/PR/8/34	61-LKGIAPLQLGKCNIA GWLLGNPECDPLL PVR SWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELRE
S	61-LKGIAPLQLGKCNIA GWLLGNPECDPLL PVR SWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELRE
R	61-LKGIAPLQLGKCNIA GWLLGNPECDPLL PVR SWSYIVETPNSENGICYPGDFIDYEELRE
A/PR/8/34	121-QLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKS
S	121-QLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKS
R	121-QLSSVSSFERFEIFPKESSWPNHNTNGVTAACSHGKSSFYRNLLWLTEKEGSYPKLNKS
A/PR/8/34	181-YVNKKGKEVLVLWGIHHPNSKEQQNIYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQA
S	181-YVNKKGKEVLVLWGIHHPNSKEQQNIYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQA
R	181-YVNKKGKEVLVLWGIHHPNSKEQQNIYQENAYVSVVTSNYNRRFTPEIAERP KVRDQA
A/PR/8/34	241-GRMNYYWTL LKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLG
S	241-GRMNYYWTL LKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLG
R	241-GRMNYYWTL LKPGDTIIFEANGNLIAPMYAFALSRGFGSGIITSNASMHECNTKCQTPLG
A/PR/8/34	301-AINSSLPYQNIHPVTIGEC PKYVRS AKLRMVTGLRNTPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGM
S	301-AINSSLPYQNIHPVTIGEC PKYVRS AKLRMVTGLRNTPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGM
R	301-AINSSLPYQNIHPVTIGEC PKYVRS AKLRMVTGLRNTPSIQSRGLFGAIAGFIEGGWTGM
A/PR/8/34	361-
S	DGWYGYHHQNEQSGSYAADQKSTQNAINGITNKVNTVIEKMNIQFTAVGKEFNKLEKRM
R	361- DGWYGYHHQNEQSGSYAADQKSTQNAINGITNKVNTVIEKMNIQFTAVGKEFNKLEKRM 361- DGWYGYHHQNEQSGSYAADQKSTQNAINGITNKVNTVIEKMNIQFTAVGKEFNKLEKRM
A/PR/8/34	421-
S	ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLV LLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGC
R	421- ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLV LLENERTLDFHDSNVKNLYEKVKSQ LKNNAKEIGNGC

421-

ENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLDFHDSNVKNLYEKVKSQKNNAKEIGNGC

A/PR/8/34

481-FEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPKYSEESKLNREKVDGVKLESMGIYQILAIYSTVASSL

S

481-FEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPKYSEESKLNREKVDGVKLESMGIYQILAIYSTVASSL

R

481-FEFYHKCDNECMESVRNGTYDYPKYSEESKLNREKVDGVKLESMGIYQILAIYSTVASSL

**Приложение 2. Аминокислотные последовательности в нейраминидазе вируса A/PR8/34 (H1N1). S – исходный штамм, R – вирус после 13 пассажей в присутствии препарата 575.**

Вирус	Последовательность
A/PR/8/34	1- MNPNQKIITIGSICLVVGLISLILQIGNIISIWISHSIQTGSQNHTGICNQNIIITYKNST
S	1- MNPNQKIITIGSICLVVGLISLILQIGNIISIWISHSIQTGSQNHTGICNQNIIITYKNST
R	1- MNPNQKIITIGSICLVVGLISLILQIGNIISIWISHSIQTGSQNHTGICNQNIIITYKNST
A/PR/8/34	61-WVKDTTTSVILTGNSSLCPIRGWAIYSKDNSIRIGSKGDVVFVIREPFISCSHLECRTFFLT
S	61-WVKDTTTSVILTGNSSLCPIRGWAIYSKDNSIRIGSKGDVVFVIREPFISCSHLECRTFFLT
R	61-WVKDTTTSVILTGNSSLCPIRGWAIYSKDNSIRIGSKGDVVFVIREPFISCSHLECRTFFLT
A/PR/8/34	121-GALLNDKHSSGTVKDRSPYRALMSCPVGGEAPSPYNSRFESVAWSASACHDGMGWLTIIGI
S	121-QGALLNDKHSSGTVKDRSPYRALMSCPVGGEAPSPYNSRFESVAWSASACHDGMGWLTIIGI
R	121-QGALLNDKHSSGTVKDRSPYRALMSCPVGGEAPSPYNSRFESVAWSASACHDGMGWLTIIGI
A/PR/8/34	181-SGPDNGAVAVLKYNGIITETIKSWRKKILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGLASYKI
S	181-SGPDNGAVAVLKYNGIITETIKSWRKKILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGLASYKI
R	181-SGPDNGAVAVLKYNGIITETIKSWRKKILRTQESECACVNGSCFTIMTDGPSDGLASYKI
A/PR/8/34	241-FKIEKGKVTKSIELNAPNSHYEECSYPDTGKVMCVCRDNWHGNSRNPWVSFDQNLDYQIG
S	241-FKIEKGKVTKSIELNAPNSHYEECSYPDTGKVMCVCRDNWHGNSRNPWVSFDQNLDYQIG
R	241-FKIEKGKVTKSIELNAPNSHYEECSYPDTGKVMCVCRDNWHGNSRNPWVSFDQNLDYQIG
A/PR/8/34	301-YICSGVFGDNPRPEDGTGSCGPVYVDGANGVKGFSYRYGNGVWIGRTKSHSSRHGFEMIW
S	301-YICSGVFGDNPRPEDGTGSCGPVYVDGANGVKGFSYRYGNGVWIGRTKSHSSRHGFEMIW
R	301-YICSGVFGDNPRPEDGTGSCGPVYVDGANGVKGFSYRYGNGVWIGRTKSHSSRHGFEMIW
A/PR/8/34	361-PNGWTETDSKFSVRQDVVAMTDWSGYSGSFVQHPELTGLDCMRPCFWVELIRGRPKEKT
S	361-PNGWTETDSKFSVRQDVVAMTDWSGYSGSFVQHPELTGLDCMRPCFWVELIRGRPKEKT
R	361-PNGWTETDSKFSVRQDVVAMTDWSGYSGSFVQHPELTGLDCMRPCFWVELIRGRPKEKT
A/PR/8/34	421-IWTSASSISFCGVNSDTV DWSWPDGAELPFSIDK
S	421-IWTSASSISFCGVNSDTV DWSWPDGAELPFSIDK
R	421-IWTSASSISFCGVNSDTV DWSWPDGAELPFSIDK

**Приложение 3. Аминокислотные последовательности в М-2 белке вируса А/PR8/34 (H1N1). S – исходный штамм, R – вирус после 13 пассажей в присутствии препарата 575.**

Вирус	Последовательность
A/PR/8/34	1-MSLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSDPLTIAANIIGILHLTLWILDRLFFKCIYRRFKYGLK
S	1-MSLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSDPLTIAANIIGILHLTLWILDRLFFKCIYRRFKYGLK
R	1-MSLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSDPLTIAANIIGILHLTLWILDRLFFKCIYRRFKYGLK
A/PR/8/34	61-GGPSTEGVPKSMREEYRKEQQSAVDADDGHFVSIELE
S	61-GGPSTEGVPKSMREEYRKEQQSAVDADDGHFVSIELE
R	61-GGPSTEGVPKSMREEYRKEQQSAVDADDGHFVSIELE

