

На правах рукописи

Федорова Виктория Александровна

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИХ
ПРОИЗВОДНЫХ ЦИТИЗИНА В ОТНОШЕНИИ ВИРУСОВ ГРИППА И
ПАРАГРИППА

03.02.02 – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении
«Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор биологических наук
Зарубаев Владимир Викторович

Официальные оппоненты:

Ведущая организация:

Защита диссертации состоится _____ в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.043.01 при ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России (197376, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17), тел. (812) 499 15 90; e-mail: office@influenza.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева» Минздрава России (197376, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17); на сайте <http://www.influenza.spb.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
кандидат биологических наук

Амосова И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Вирусы парагриппа человека (ВПГЧ) известны, прежде всего, как возбудители респираторной инфекции у людей всех возрастных групп. У взрослых эти заболевания протекают легче и по клинической симптоматике практически неотличимы от других респираторных инфекций. ВПГЧ чаще поражают клетки гортани, и заболевание протекает с явлениями ларингита (сухой болезненный кашель, охрипший голос). У детей заболевания, вызываемые ВПГЧ, протекают более тяжело из-за сильной интоксикации. ВПГЧ 3 типа (ВПГЧ-3) является причиной 60-70% заболеваний нижних отделов дыхательных путей (бронхиолиты, пневмонии) у детей первых полутора лет жизни. Наиболее частыми осложнениями при парагриппозной инфекции является симптом «ложного крупа», возникающий в результате отека слизистой оболочки гортани, и вирус-бактериальная пневмония как следствие присоединения вторичной бактериальной флоры. Кроме того, на фоне парагриппозной инфекции у пациентов отмечается обострение хронических заболеваний.

Грипп в настоящее время является одним из самых распространенных заболеваний в мире, вызывая эпидемии и пандемии, которые наносят экономический ущерб и приводят к человеческим жертвам. В отличие от ВПГЧ, вирус гриппа поражает преимущественно верхние отделы дыхательных путей. Продукты распада пораженных клеток попадают в кровь, вызывая сильную интоксикацию и повышение температуры тела. Повышение проницаемости сосудов в ходе инфекционного процесса может стать причиной патологических изменений в различных органах: точечных кровоизлияний в трахее, бронхах, а иногда и отека мозга с летальным исходом. Восприимчивость к гриппу высокая, и им болеют люди всех возрастных групп. В результате перенесенного заболевания приобретает типоспецифический иммунитет, неспособный защитить от повторной инфекции штаммами вируса гриппа с новыми антигенными свойствами. В настоящее время доступно всего несколько противогриппозных препаратов, одобренных ВОЗ: ингибиторы нейраминидазы (осельтамивир и занамивир), блокаторы М2 канала (амантадин и ремантадин) и недавно одобренный балоксавир марбоксил, селективный ингибитор эндонуклеазы. В то же время высокая вариабельность вируса гриппа позволяет ему быстро вырабатывать устойчивость к имеющимся препаратам, например, почти все эпидемически актуальные штаммы вируса гриппа резистентны к блокаторам М2 каналов. В 2019 г. зафиксированы случаи резистентности к новому препарату - балоксавиру марбоксилу, допущенного к клиническому применению в 2018 г. Именно поэтому существует необходимость поиска новых соединений, которые были бы эффективны в отношении вирусов, устойчивых к действию уже имеющихся препаратов.

В отличие от гриппа, разрешенных противовирусных препаратов для лечения парагриппозной инфекции в настоящее время нет. Препарат «Рибавирин», демонстрирующий активность *in vitro* в отношении большинства РНК-геномных вирусов, в том числе и парамиксовирусов, обладает рядом побочных эффектов. Таким образом, существует необходимость поиска новых соединений, которые были бы менее опасны и более эффективны в отношении этих вирусов.

Степень разработанности темы. В настоящее время ведется активный поиск и разработка соединений, обладающих противогриппозной активностью. Широко используемые в клинической практике препараты направлены на ингибирование только нескольких белков вируса гриппа таких как, нейраминидаза (осельтамивир, занамивир, ланинамивир, перамивир), М2-протонный канал (амантадин, ремантадин), РНК-зависимая-РНК-полимераза (фавипиравир, рибавирин). Однако в ходе последних исследований были обнаружены препараты, воздействующие на другие вирусные белки: нуклеозин, ингибирующий NP (Amorim et al., 2013), соединение D715-2441 (1,3-дигидрокси-6-бензо[с]хромен) –ингибитор кэп-связывающей активности субъединицы РВ2 полимеразного комплекса (Liu et al., 2018), соединение MBX2546, ингибитор НА (Basu et al., 2017). Успешно прошел клинические испытания ингибитор кэп-связывающей активности субъединицы РВ2 полимеразного комплекса препарат пимодивир (ранее известный, как JNJ-63623872 и VX-787) и ингибитор эндонуклеазы РА препарат балоксавира марбоксил (ранее соединение S- 033188) (Hayden 2019).

Если говорить о терапии парагриппозной инфекции, то на настоящий момент для терапии нет лицензированных химиопрепаратов. Активностью *in vitro* в отношении вируса парагриппа человека 3 типа обладает фавипиравир – ингибитор РНК-зависимой-РНК-полимеразы (Jochmans et al., 2016). Более перспективными в отношении этого вируса оказались ингибиторы гемагглютинин-нейраминидазы – рекомбинантный белок DAS 181 (Jones et al., 2013) и соединения BCX2798 и BCX2855 (Alymova et al., 2009).

Цитизин – хинолизидиновый алкалоид, содержащийся в семенах и частях растений семейства Бобовые. В медицине цитизин и цитизинсодержащие растения использовались в качестве диуретиков и дыхательных аналептиков. В настоящее время цитизин входит в состав средств для борьбы с табакозависимостью за счет того, что его молекула обладает высокой аффинностью к никотиновым и ацетилхолиновым рецепторам в ЦНС и в периферических ганглиях. Кроме того, цитизин и его производные могут связываться с адреналиновыми, дофаминовыми, серотониновыми, гистаминовыми и мускариновыми рецепторами. Поэтому сейчас широко изучаются возможные противовоспалительные, спазмолитические, антиаритмические, противовирусные и нейротропные свойства этих молекул. Гипотеза об активности цитизина в отношении респираторных вирусов человека - вирусов гриппа и парагриппа на сегодняшний день не высказывалась в научных публикациях.

Цель исследования: Характеристика активности синтетических производных цитизина в отношении вирусов гриппа и парагриппа человека.

Задачи исследования:

1. Определить цитотоксичность синтетических производных цитизина на культурах клеток MDCK (клетки почки собаки) и MA-104 (клетки почки макаки резус).

2. Оценить противовирусную активность синтетических производных цитизина в опытах *in vitro* на культуре клеток MDCK в отношении вирусов гриппа А (H1N1, H1N1pdm09, H3N2, H5N1) и вирусов гриппа В.

3. Оценить противовирусную активность синтетических производных цитизина в опытах *in vitro* на культуре клеток MA-104 в отношении вируса парагриппа человека 3 типа.

4. На основании полученных результатов провести анализ «структура-активность», чтобы оценить роль функциональных групп в противовирусном эффекте синтетических производных цитизина.

5. Исследовать наиболее активные синтетические производные цитизина в опытах *in vivo* на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей.

6. Для активных синтетических производных цитизина определить стадию вирусной репродукции, на которой они ингибируют размножение вируса гриппа, в опытах на «время добавления».

7. Провести последовательное пассирование вируса гриппа и ВПГЧ-3 в присутствии синтетических производных цитизина. Оценить уровень резистентности вирусного потомства.

Научная новизна. Впервые охарактеризованы цитотоксичность и вирусингибирующая активность новых синтетических производных цитизина в отношении респираторных вирусов человека: вирусов гриппа А подтипов H1N1, H3N2, H5N2, вирусов гриппа В линий В/Ямагата и В/Виктория и вируса парагриппа человека 3 типа. Показана зависимость противовирусной активности соединений от их химической структуры.

Впервые изучено влияние синтетических производных цитизина на разные стадии репродукции вируса гриппа.

Впервые показано что синтетические производные цитизина не проявляют ингибирующую активность в отношении нейраминидазы вируса гриппа А.

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

Впервые изучена возможность селекции штаммов вируса гриппа и ВПГЧ3, резистентных к синтетическим производным цитизина.

Теоретическая и практическая значимость. Настоящая работа представляет собой исследование прикладной направленности. Полученные данные позволят создать новые лекарственные препараты, обладающие широким спектром действия в отношении респираторных вирусов человека.

Методология и методы исследования. В работе использован широкий набор методик, включая вирусологические, биохимические, иммунологические, морфологические и электронно-микроскопические методы. Цитотоксические свойства химических соединений изучены при помощи метилтетразолиевого теста, противовирусная их активность оценена в системе *in vitro* в культурах клеток MDCK и MA-104 и *in vivo* - в опытах на животных на модели летальной гриппозной пневмонии. Данные о противовирусной активности соединений получены при помощи анализа динамики смертности животных, а также при помощи оценки инфекционного титра вируса в ткани лёгких. Анализ морфогенеза вируса гриппа на ультраструктурном уровне в присутствии изучаемых веществ проведён при помощи электронно-микроскопического анализа. Анализ распределения компонентов цитоскелета в инфицированных клетках проведен при помощи конфокальной микроскопии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Синтетические производные цитизина обладают противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа А подтипов H1N1, H3N2 и H5N2 и вирусов гриппа В линий В/Виктория и В/Ямагата, а также в отношении вируса парагриппа человека 3 типа. Соединения-лидеры этой группы проявляют умеренную противогриппозную активность *in vivo*.

2. Синтетические производные цитизина проявляют максимальную противовирусную активность на поздних стадиях репродукции вируса гриппа (6-10 ч после инфицирования). Последовательное серийное пассирование вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1) и вируса парагриппа человека 3 типа в присутствии синтетических производных цитизина не приводит к возникновению резистентности. Возможной мишенью для действия синтетических производных цитизина являются белки внутриклеточного транспорта - F-актин и тубулин.

Личный вклад автора. Автор лично принимал участие в проведении всех этапов лабораторных исследований: планирование опытов, отбор материалов, проведение первичного скрининга противовирусной активности соединений *in vitro*, исследование спектра активности соединений, эксперименты на «время добавления», а также опыты *in vivo*. Автором лично проведена обработка, анализ и обобщение полученных материалов с последующей их публикацией на различных конференциях. Синтез производных цитизина проведен сотрудниками института органической химии УНЦ РАН, г. Уфа. Приготовление ультратонких срезов для электронномикроскопического исследования, препаратов для изучения динамики структур цитоскелета клетки, а также конфокальная лазерная сканирующая микроскопия проведены сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность проведенных исследований подтверждена адекватным статистическим анализом данных. Материалы диссертации доложены на 3 отечественных и международных конференциях: 2nd Russian Conference on Medical Chemistry, Novosibirsk, Russia, July 5-10, 2015, International conference "Trends in Influenza Research", Saint-Petersburg, Russia, 18-20 September, 2017, 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry, Kazan, Russia, September 28 - October 3, 2017.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 научных работ: 2 статьи в российских журналах, входящих в перечень, рекомендованный ВАК, 3 в других изданиях, 2 из которых в зарубежных журналах, индексируемых в международных системах цитирования (библиографические базы SCOPUS, Pub Med) и в сборниках материалов 3 конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, перечня материалов и методов, изложения результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 126 страницах машинописного текста и проиллюстрирована 23 таблицами и 29 рисунками. Список цитируемой литературы включает 186 источника, из них 3 в отечественных и 183 в зарубежных изданиях.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Исследуемые вещества. Соединения класса производных цитизина были синтезированы в институте органической химии УНЦ РАН, г. Уфа. В качестве препаратов сравнения использовали осельтамивир и рибавирин.

Культуры клеток. Перевиваемые культуры клеток МА-104 (клетки почки макаки резус) и MDCK (клетки почки собаки) получены из коллекции Музея клеточных культур ФГБУ «НИИ Гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Среды. Для культивирования клеток в работе использовали питательную среду альфа MEM («Биолот», Россия), обогащенную L- глутамином, в которую добавляли бычий сывороточный альбумин (1,3 %) (Calbiochem, США) и трипсин (1мг/мл) (Fluca, США).

Для культивирования вирусов гриппа использовали питательную среду альфа MEM, обогащенную L-глутамином («Биолот», Россия) с добавлением 0,2 % раствора ципрофлоксацина и трипсина (1 мг/мл).

Вирусы. В работе использовали штаммы вирусы гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1), A/California/7/09(H1N1)pdm09, A/Владивосток/2/09 (H1N1), A/Aichi/2/68(H3N2), A/Mallard/Pennsylvania/10249(H5N2), B/Malaysia/2506/04 (линия В/Виктория), B/Florida/04/06 (линия В/Ямагата) и штамм вируса парагриппа человека 3 типа из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Исследование токсичности синтетических производных цитизина. Токсичность соединений тестировали на культурах клеток МА-104 и MDCK. Для каждого соединения готовили серию трехкратных разведений на среде альфа MEM до получения соответствующих концентраций. Клетки MDCK инкубировали 48 часов, а МА-104 96-120 часов при 37°C в 5% CO₂ в присутствии растворенных производных цитизина. По истечении необходимого времени степень деструкции клеточного монослоя оценивали с помощью метилтетразолиевого теста (Mosmann, 1983). На основании полученных данных вычисляли ЦТД₅₀ (50% цитотоксическая доза) - дозу вещества в лунке при которой наблюдается деструкция 50% клеточного монослоя. Исходя из полученного значения ЦТД₅₀, рассчитывали рабочую концентрацию вещества.

Подготовка вируса. Штаммы вируса гриппа культивировали в 10-12 дневных куриных эмбрионах, вводя в аллантоисную полость 1-10 ЭИД₅₀/0,2 мл вирусосодержащей аллантоисной жидкости инкубировали в течение 48 часов при температуре +37°C для вирусов гриппа А и 72 часа при +34°C для вирусов гриппа В.

Вирус парагриппа 3 типа культивировали на культуре клеток МА-104 в культуральных флаконах (Orange Scientific, США) в течение 96-120 часов при 37°C в атмосфере 5% CO₂ до состояния 70% деструкции монослоя.

Определение противовирусной активности синтетических производных цитизина в отношении вирусов гриппа. Для каждого соединения готовили серию трехкратных разведений, начиная с ½ ЦТД₅₀. В лунки 96-луночного планшета с монослойной культурой клеток MDCK вносили раствор исследуемого соединения и помещали на 1 час в CO₂ – инкубатор (37°C). Далее в лунки вносили 10 –кратные разведения (10⁻¹ – 10⁻⁶). В качестве контроля в лунки вместо веществ вносили чистую культуральную среду. Планшеты инкубировали в течение 48 часов для вирусов гриппа А и 72 часа для вирусов гриппа В при 37°C и 5% CO₂.

Инфекционную активность вируса оценивали с помощью реакции гемагглютинации (РГА) с куриными эритроцитами (Influenza virus. Methods and protocols, 2018). На основании полученных данных рассчитывали ЭД₅₀ (50% эффективная доза) – дозу исследуемого соединения, при которой титр вируса снижается вдвое. Далее в ходе исследования определяли ИС (индекс селективности) - основной показатель при изучении специфического действия противовирусных лекарственных средств, позволяющий количественно определить противовирусную активность вещества. ИС определяется отношением ЦТД₅₀ к ЭД₅₀. Активными считали соединения с ИС>10.

Определение противовирусной активности синтетических производных цитизина в отношении вируса парагриппа человека 3 типа. Для каждого вещества готовили серию трехкратных разведений, начиная с $\frac{1}{2}$ ЦТД₅₀. В лунки планшетов с монослойной культурой клеток MA-104 вещество и вирус вносили как было описано выше. Планшеты инкубировали 96-120 часов при 37°C в атмосфере 5%CO₂.

Инфекционную активность вируса оценивали при помощи регистрации характерного вирусспецифического цитопатогенного действия (ЦПД) в лунках. На основании полученных результатов рассчитывали ЭД₅₀ и ИС для каждого из тестируемых соединений.

Изучение стадии репродукции вируса гриппа – мишени действия синтетических производных цитизина. Эксперимент проводили на культуре клеток MDCK. Соединение с высоким индексом селективности вносили в культуру клеток в нетоксичной концентрации до, после или одновременно с внесением вируса. Время внесения вещества отсчитывали от точки 0 – времени, когда вирус входит в клетку.

Вирус добавляли к клеткам в момент времени, условно обозначаемый как точка -1, после чего планшеты с клетками выдерживали в течение 1 часа при температуре +4°C. Затем вирус удаляли и промывали планшеты два раза чистой культуральной средой. Далее, в точке 0, в клетки вносили препарат и помещали планшет в CO₂ – инкубатор при 37°C, где он находился в течение 10 часов, до окончания эксперимента.

Исследуемое вещество вносили в следующие сроки относительно добавления вируса: (-2) - (-1) – препарат внесен за час до добавления вируса, (-1) - 0 – одновременно с вирусом, 0 – 2, 2 – 4, 4 – 6, 6 – 10 часов после заражения. В качестве позитивного контроля использовали интервал (-2) – 10, где исследуемое вещество присутствовало в течение всего эксперимента.

После этого в надосадочной жидкости определяли титр вируса. О вирусингибирующей активности судили по снижению инфекционного титра вируса по сравнению с контролем без исследуемого вещества (Antiviral Methods and Protocols, 2013).

Получение ультратонких срезов для электронномикроскопического исследования влияния производных цитизина на морфогенез гриппозной инфекции in vitro. Клеточную культуру MDCK высевали в 24-луночные планшеты и культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ до состояния конфлюэнтного монослоя. Готовили раствор исследуемого вещества в нетоксичной активной концентрации в культуральной среде альфа MEM («Биолот», Россия). В лунки вносили вещество и вирус. В контрольные лунки вносили вирус и культуральную среду. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при +4°C. По истечении необходимого времени планшеты отмывали от вирусосодержащей жидкости культуральной средой альфа MEM («Биолот», Россия). В лунки снова добавляли вещество, а в лунки с контролем вируса – чистую культуральную среду. Планшеты помещали в CO₂-инкубатор при 37°C на 6 часов. Затем из планшетов сливали супернатант, добавляли 0,8% раствор глутарового альдегида на среде альфа MEM и оставляли на 15 минут. Клетки соскабливали, фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида на среде альфа MEM и 1% раствором OsO₄ на 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,2), заливали в смесь эпон-аралдит и готовили ультратонкие срезы, которые затем контрастировали в цитрате свинца и просматривали при помощи просвечивающего электронного микроскопа JEM-1011 (Jeol, Япония) при инструментальном увеличении x5 000 – x50 000.

Определение ингибирования активности нейраминидазы флюоресцентным методом. В эксперименте использовали следующие реактивы: Ферментный буфер: 32,5 mM MES (морфолино – 2- этансульфоная кислота), pH 6.0 (Sigma, США), 4mM CaCl₂; Раствор субстрата: Ферментный буфер + 0,2 mM MUNANA (4-метилумбеллиферил- α -D-N-ацетилнейраминавая кислота) (Sigma, США); Стоп-раствор: 25% этанол, 0,1M глицин, pH10 (Sigma, США). Для проведения эксперимента использовали планшеты Costar (США) черного цвета. Готовили 20% вирусные разведения в ферментном буфере. Из исследуемого препарата готовили 10 трехкратных разведений в MES и добавляли по 25 мкл каждого разведения в соответствующую лунку планшета. В качестве положительного контроля вместо исследуемых соединений в лунки вносили ферментный буфер. Планшеты инкубировали при 37°C в течение 30 минут. После инкубации добавляли по 50 мкл раствора субстрата и инкубировали планшеты при комнатной

температуре 30 минут. Затем в лунки добавляли по 150 мкл стоп-раствора и проводили измерения с помощью ридера «Victor 2 1440» (Perkin Elmer, Финляндия). ЭД₅₀ рассчитывали, используя анализ линейной регрессии в программе Microsoft Excel.

Получение устойчивых к производным цитизина штаммов вирусов гриппа и парагриппа. Для получения устойчивых штаммов вирус гриппа А/PR/8/34 (H1N1) культивировали в клеточной культуре MDCK, а вирус парагриппа 3 типа на культуре клеток МА-104 в 24-луночных планшетах в присутствии нарастающих концентраций исследуемых веществ, начиная с концентрации равной 1ЭД₉₀ (см.далее). При каждом следующем пассаже концентрацию вещества увеличивали вдвое до тех пор, пока она не достигала значений ЦТД₅₀ (Antiviral Methods and Protocols, 2013). Всего для каждого вируса провели пять последовательных пассажей. О приобретении вирусами резистентности судили по снижению противовирусной активности исследуемых соединений в отношении пассированных вирусов по сравнению с исходными (контрольными). Оценку противовирусного эффекта соединений в отношении пассированных вирусов проводили после второго, четвертого и пятого пассажей.

Исследование организации и полимеризации актина и организации микротрубочек в клетках методом конфокальной микроскопии. Клетки MDCK высевали в 24-луночный планшет, в лунки которого были помещены покровные стекла (Menzel, Германия), и культивировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ до формирования конфлюэнтного монослоя. В лунки добавляли соединение в активной нетоксичной концентрации и вирус. В контрольные лунки вносили чистую культуральную среду. Планшеты инкубировали при +4°C в течение 1 часа. Далее из лунок удаляли супернатант и промывали планшеты дважды культуральной средой. В лунки с препаратом добавляли исследуемое вещество и культуральную среду, а во все остальные – только культуральную среду. Затем планшеты инкубировали в течение 6 часов (37°C, 5%CO₂). После инкубации из лунок удаляли супернатант, дважды промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS) и фиксировали клетки 4 % раствором параформальдегида на PBS (5 мин, комнатная температура). После удаления фиксатора планшеты промывали и пермеабелизировали клетки 0,1% раствором Triton X-100 на PBS (5 минут, при комнатной температуре) Далее клетки блокировали 5% раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) (Sigma-Aldrich, США) на PBS, инкубировали с первичными антителами (мышинные моноклональные антитела против α-тубулина (Sigma-Aldrich, Великобритания)) в концентрации 1мкг/мл на 5% БСА (1 час, комнатная температура). Клетки инкубировали с козьими анти-мышинными АТ, мечеными флуоресцентным красителем Alexa Fluor 647 (ThermoFisher, США) (2 мкг/мл на 5% БСА) (1 час, комнатная температура, в темноте). Актиновые филаменты и ядра в клетках окрашивали 0,3 μМ АТТО488-фаллоидином (30 мин, комнатная температура) и DAPI (5мин, комнатная температура), после чего стекла промывали PBS, заключали в среду Fluoroshield™ (ImmunoBioScience Corp., США) и хранили в темноте при +4°C до проведения микроскопического исследования.

Конфокальную лазерную сканирующую микроскопию выполняли на конфокальном микроскопе Leica TCS SP8 (Leica, Германия). DAPI возбуждали при длине волны 405 нм, АТТО488-фаллоидин – при 488 нм, а Alexa Fluor 647 – α-тубулин – при 576 нм. Анализ полученных изображений осуществляли с помощью программного обеспечения Leica Application Suite X (LasX, Германия).

Исследование противовирусной активности синтетических производных цитизина *in vivo* на модели гриппозной пневмонии у белых мышей. Опыты проводили на белых беспородных мышах, полученных из питомника «Рапполово» (Россия). В эксперименте использовали адаптированный к мышам вирус А/PR/8/34 (H1N1), который предварительно титровали на мышах для определения 50% летальной дозы вируса – LD₅₀. Для заражения мышей в дальнейшем эксперименте использовали дозу 10LD₅₀ в объеме 50 мкл/мышь.

Предварительно оценивали токсичность исследуемых соединений для животных. В опыте использовали максимально переносимые концентрации (МПК) веществ и дозы вдвое меньшие МПК. Препараты вводили внутрибрюшинно (0,2 мл) по лечебно-профилактической схеме: за 1 час до заражения и через 1, 2 и 3 суток после заражения (Руководство по проведению

доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая, 2012). Группе положительного контроля вводили осельтамивира фосфат (20 мг/кг) по лечебно-профилактической схеме в объеме 0,2 мл, а группе отрицательного контроля - внутрибрюшинно физиологический раствор в объеме 0,2 мл. Противовирусную активность исследуемых соединений учитывали по снижению смертности животных в опытных группах по сравнению с контрольной. В экспериментах по изучению снижения смертности в каждой группе было по 10 мышей.

Статистическая обработка полученных данных. Расчет ЦТД₅₀, ЭД₅₀ и ЭД₉₀ проводили с помощью параметрического теста на основе t-критерия Стьюдента для выборок с нормальным распределением, или непараметрических критериев Уилкоксона-Манна-Уитни с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010 и GraphPad Prism 7.0. Динамику гибели животных оценивали при помощи анализа кривых выживаемости Каплана-Мейера.

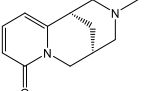
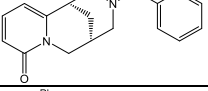
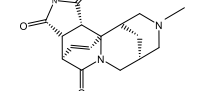
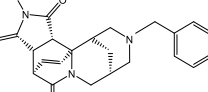
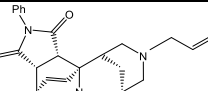
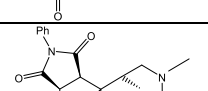
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Исследование противовирусной активности синтетических производных цитизина

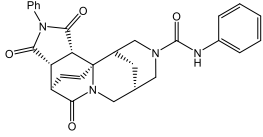
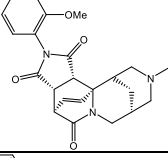
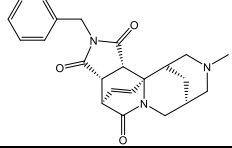
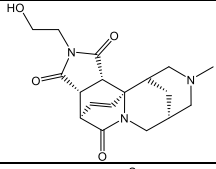
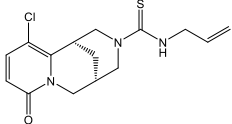
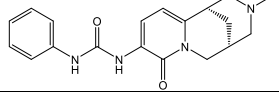
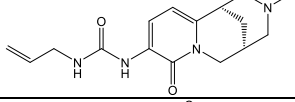
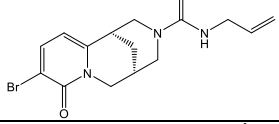
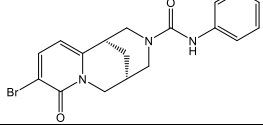
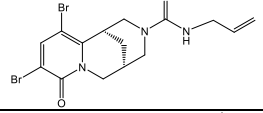
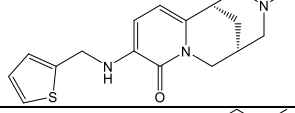
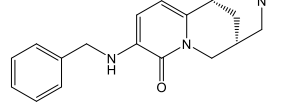
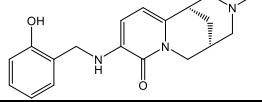
1.1 Исследование противовирусной активности синтетических производных цитизина в отношении вируса гриппа *in vitro*

На первом этапе наших исследований была изучена противовирусная активность 84 производных цитизина в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1). По данным МТТ – теста 79 соединений обладали низкой токсичностью в культуре клеток MDCK. Противогриппозная активность была выявлена у 24 соединений (ИС>10) (таблица 1). При этом сам (-)-цитизин (соединение 1), являющийся исходной матрицей для всей скрининговой библиотеки, противогриппозной активностью не обладал (ИС=2).

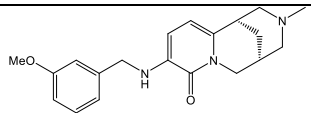
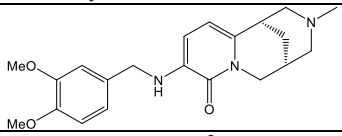
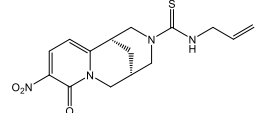
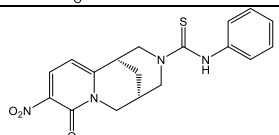
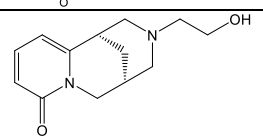
Таблица 1. Цитотоксичность и противовирусная активность синтетических производных цитизина в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1)

Группа производных	Номер соединения	Формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
12N-замещенные производные (-)-цитизина	2		>200	9,9±0,9	20
	3		244±21,9	24,2±2,2	10
Аддукты Дильса-Альдера различных 12-N-замещенных производных (-)-цитизина N-фенилмалеинимидом	11		>300	25±2,3	12
	12		>300	18,5±1,7	16
	14		235±21,2	5±0,4	47
	15		208±18,7	10,9±0,9	19

Продолжение таблицы 1

Группа производных	Номер соединения	Формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
	20		156,4±14,1	1,9±0,2	82
Аddituctы Дильса-Альдера метилцитизина с N-замещенными малеинимидами	22		>300	4,7±0,4	64
	23		300±26,5	25±2,3	12
	28		>330	26,5±2,4	12
Тиомочевины различной топологии	42		>330	27±2,4	12
Мочевины различной топологии	50		80±7,2	1,7±0,2	47
	51		>330	5,6±0,5	59
	53		>330	21±1,9	16
	54		330±29,4	23±2,1	14
	56		>330	28±2,5	12
Вторичные амины, полученные алкилированием 3-аминопроизводного метилцитизина	62		303±27,4	4,8±0,4	63
	63		115±10,4	8,4±0,8	14
	64		133±11,9	3,4±0,3	39

Продолжение таблицы 1

Группа производных	Номер соединения	Формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
	65		89±8	7,3±0,7	12
	66		235±21,2	11,9±1,1	20
Производные 12-N-замещенных производных (-)-цитизина, модифицированные по 2-пиридоновому ядру	75		>300	26,3±2,4	11
	77		>300	12,1±1,1	25
Производные 12-N-этилоксипроизводного (-)-цитизина, модифицированные по 2-пиридоновому ядру	79		>300	3,1±0,3	97

Согласно анализу «структура-активность», выраженный вирусингибирующий эффект 12-N – замещенных производных (-)-цитизина достигался за счет замещения водорода на метил (соединение 2, ИС=20) и бензил (соединение 3, ИС=10).

Для аддуктов Дильса-Альдера различных 12-N- замещенных производных (-)-цитизина с N-фенилмалеинимидом наибольшая противовирусная активность достигается за счет сочетания «α-эндо» конформации с такими заместителями во вторичном атоме азота, как пропенил (соединение 14, ИС=47) и фенилкарбамоил (соединение 20, ИС=82). Введение метила (соединение 11, ИС=12) и бензила (соединение 12, ИС=16) в это положение приводит к снижению противовирусного эффекта. Среди «β-эндо» аддуктов вирусингибирующий эффект достигался только в одном случае: при замене атома водорода во вторичном азоте на метильную группу (вещество 15, ИС=19)

Максимальный противовирусный эффект аддуктов Дильса – Альдера метилцитизина с N-замещенными малеинимидами обеспечивается за счет использования в качестве радикала 2-метоксибензила (соединение 22, ИС=64) в сочетании с метильной группой во вторичном азоте. Использование в качестве R бензила и EtOH приводит к снижению ИС соединений 23 (ИС=12) и 28 (ИС=12) в пять раз.

Среди тиомочевин различной топологии противовирусный эффект достигается только за счет сочетания ненасыщенного углеводорода пропенила с хлором в С5 в молекуле цитизина (соединение 42, ИС=12).

Высокая противовирусная активность мочевиин различной топологии с карбамидной функциональной группой в 2-пиридоновом ядре связана с использованием в качестве заместителей фенила (соединение 50, ИС=47) и пропенила (соединение 51, ИС=59). Вирусингибирующее действие мочевиин с карбамидной группой во вторичном атоме азота достигается за счет сочетания брома в С3 с фенилом (вещество 53, ИС=16) и пропенилом (соединение 54, ИС=14), а также за счет введения еще одного атома брома в С5 в сочетании с пропенилом (соединение 56, ИС=12)

Для вторичных аминов, полученных алкилированием 3-аминопроизводного метилцитизина, противогриппозная активность *in vitro* достигается за счет использования в

качестве радикалов тиофена (соединение 62, ИС=63), бензила (соединение 63, ИС=14), 3-метоксибензила (соединение 65, ИС=12), 3,4-диметоксибензила (соединение 66, ИС=20) и гидроксibenзила (соединение 64, ИС=39).

Противовирусная активность производных 12-N-замещенных производных (-)-цитизина, модифицированных по 2-пиридиновому ядру, обеспечивается за счет нитрогруппы у С3 в сочетании с тиокарбамидной группой во вторичном атоме азота. Кроме того, значительный вклад в активность этих соединений вносят ненасыщенный углеводородный радикал пропенил (соединение 75, ИС=11) и фенил (соединение 77, ИС=25).

Для производных 12-N- этилоксипроизводного (-)-цитизина максимальный вирусингибирующее действие достигается при отсутствии различных модификаций молекулы (-) цитизина по 2-пиридиновому ядру (вещество 79).

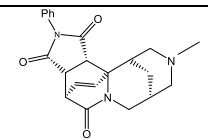
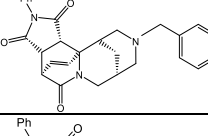
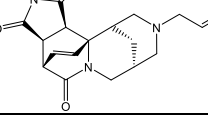
Наибольшей противогриппозной активностью *in vitro* обладали семь производных цитизина (соединения 14 (ИС=47), 20 (ИС=82), 22 (ИС=64), 50 (ИС=47), 51(ИС=59), 62(ИС=63), 64(ИС=39) и 79 (ИС=97). Однако если сравнивать значения ИС этих соединений с ИС осельтамивира (ИС=750), то они значительно уступают ему в противогриппозной активности. Тем не менее, полученные в ходе эксперимента результаты говорят о том, что синтетические производные цитизина являются весьма перспективными соединениями для дальнейшего изучения и разработки. Возможно, что введение разнообразных заместителей в молекулу (-)-цитизина и ее дальнейшие модификации при синтезе новых производных позволят получить вещества с такой же или сопоставимой активностью в отношении вируса гриппа, как осельтамивир. Кроме того, учитывая различие в химической структуре аналогов сиаловых кислот – ингибиторов нейраминидазы и производных цитизина, можно полагать, что они имеют разные мишени и механизмы действия, и ожидать, что последние будут иметь преимущество с точки зрения развития вирусной резистентности.

Учитывая данные первичного скрининга *in vitro*, для дальнейших исследований мы отобрали четыре соединения – лидера 11, 12, 14 и 22, для которых показатель ΔT составил 4,0, 3,5, 3,0 и 4,5 соответственно. Все эти вещества по своей химической структуре являются аддуктами Дильса-Альдера, находящимися в « α -эндо» - конформации.

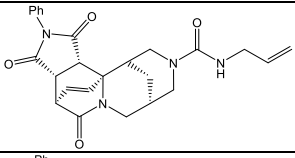
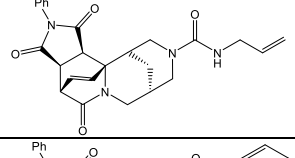
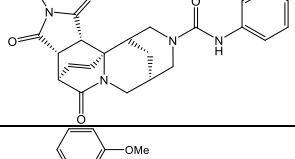
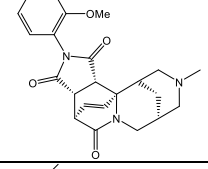
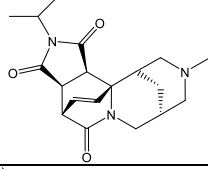
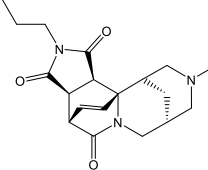
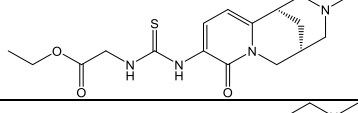
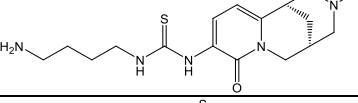
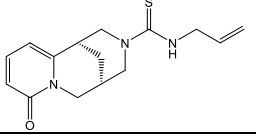
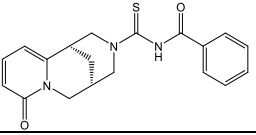
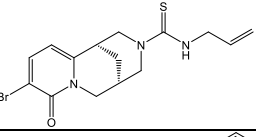
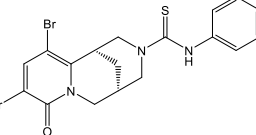
1.2. Исследование противовирусной активности синтетических производных цитизина в отношении вируса парагриппа третьего типа *in vitro*

В следующей серии экспериментов была изучена активность 84 синтетических производных цитизина *in vitro* в отношении другого респираторного вируса - вируса парагриппа человека 3 типа. Согласно данным МТТ-теста, из 84 соединений только 11 веществ (3, 13, 14, 17, 26, 31, 34, 55, 65, 67 и 68) обладали высокой цитотоксичностью в культуре клеток МА-104. При этом, значения ЦТД₅₀ исследуемых веществ в культуре клеток МА-104 были сходными с таковыми в культуре клеток MDCK или имели максимум трехкратную разницу. Противовирусная активность была выявлена у 29 соединений (ИС>10) (таблица 2).

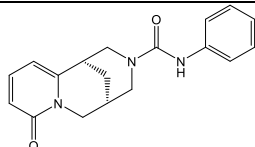
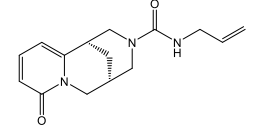
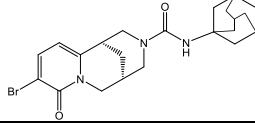
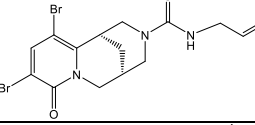
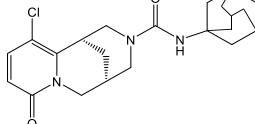
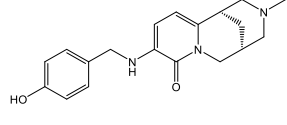
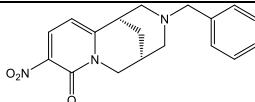
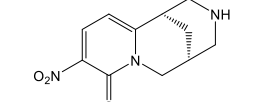
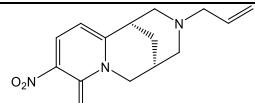
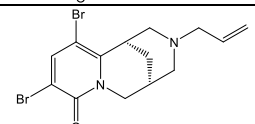
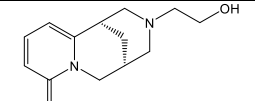
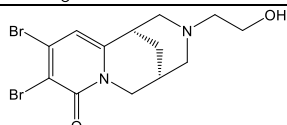
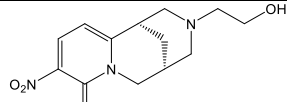
Таблица 2. Цитотоксичность и противовирусная активность синтетических производных цитизина в отношении вируса парагриппа человека 3 типа

Группа производных	Номер соединения	Формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
Аддукты Дильса-Альдера различных 12-N-замещенных производных (-)-цитизина с N-фенилмалеинимидом	11		198±17,8	10±0,9	20
	12		100±8,9	1,9±0,2	53
	17		32,5±2,9	1±0,09	32

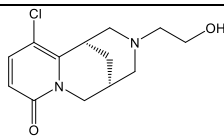
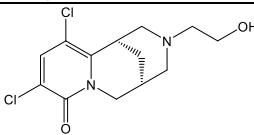
Продолжение таблицы 2

Группа производных	Номер соединения	Формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
	18		>300	5,1±0,5	59
	19		191±17,2	5±0,45	38
	20		>300	3,6±0,3	83
Аddituctы Дильса-Альдера метилцитизина с N-замещенными малеинимидами	22		201±18,1	1,5±0,1	134
	25		>100	1,3±0,1	77
	27		190±17,1	9,1±0,8	21
Тиомочевины, полученные из 3-аминопроизводного метилцитизина	32		>170	4,7±0,4	36
	35		>300	4,7±0,4	64
Тиомочевины различной топологии	37		300±27	22,8±2,1	13
	39		>300	7,4±0,7	41
	40		112±10,1	2±0,2	56
	41		>300	3,2±0,3	94

Продолжение таблицы 2

Группа производных	Номер соединения	Формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
Мочевины различной топологии	47		136±12,2	6,5±0,6	21
	48		>300	5,2±0,5	58
	55		56±5	2,9±0,3	19
	56		143±12,9	8,4±0,8	17
	61		243±21,9	10,2±0,9	24
Вторичные амины, полученные алкилированием 3-аминопроизводного метилцитизина	67		53±4,8	5±0,5	11
Производные 12-N-замещенных производных (-) -цитизина, модифицированные по 2-пиридоновому ядру	70		160±14,4	14,5±1,3	11
	71		116±10,4	3,7±0,3	31
	72		152±13,7	0,4±0,03	380
	73		162±14,6	8,1±0,7	20
Производные 12-N-этилоксипроизводного (-) -цитизина, модифицированные по 2-пиридоновому ядру	79		>300	3,2±0,3	93
	80		177±15,9	3±0,24	59
	81		>170	0,8±0,07	213

Продолжение таблицы 2

Группа производных	Номер соединения	Формула	ЦТД ₅₀ , мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл	ИС
	82		225±20,3	1,1±0,1	205
	83		160±14,4	0,4±0,04	401

Согласно анализу «структура-активность», вирусингибирующее действие « α -эндо» аддуктов Дильса – Альдера различных 12-N-замещенных производных (-)-цитизина с N-фенилмалеинимидом связано с заменой водорода во вторичном атоме азота на метил (соединение 11 ИС=20), бензил (соединение 12, ИС=53), пропенил (соединение 18, ИС=59) и фенилкарбамоил (соединение 20, ИС= 83). Противовирусный эффект « β -эндо» аддуктов достигается за счет введения в качестве заместителей пропенила (Соединение 17, ИС=32) и пропенилкарбамоила (соединение 19, ИС=38).

Противовирусная активность аддуктов Дильса-Альдера метилцитизина с N-замещенными малеинимидами в « α -эндо» конформации связана с использованием в качестве радикала 2- метоксибензила (соединение 22, ИС=134). Вирусингибирующее действие « β -эндо» аддуктов обеспечивается за счет простых алифатических углеводородных радикалов – пропила (соединение 27, ИС=21) и изопропила (соединение 25, ИС=77).

Для тиомочевин, полученных из 3-аминопроизводного метилцитизина противовирусный эффект обеспечивается за счет присоединения к тиокарбамидной группе более протяженных углеводородных радикалов – метилформиата (соединение 32, ИС=36) и аминопропана (соединение 35, ИС=64)

Вирусингибирующее действие тиомочевин различной топологии обеспечивается за счет присоединения к тиокарбамидной группе ненасыщенного углерода – пропенила (соединение 37, ИС=13). Дополнительная модификация – присоединение атома брома к С3 в сочетании с таким же радикалом приводила к увеличению активности в 4 раза (соединение 40, ИС=56). Кроме того, противовирусный эффект достигался также за счет присоединения к тиокарбамидной группе фенилкарбамоила (вещество 39, ИС=41). Максимальная активность также обеспечивается внесколькими модификациями в молекуле тиомочевины: присоединение фенила к тиокарбамидной группе и двух атомов брома к С3 и С5 (производное 41, ИС=94).

Для мочевины различной топологии максимальный вирусингибирующий эффект достигается за счет использования в качестве радикалов фенила (вещество 47, ИС=21) и пропенила (вещество 48, ИС= 58). Комбинация пропенила с атомами брома в положениях С3 и С5 приводит к снижению противовирусного эффекта (соединение 56, ИС=17). Умеренная активность достигается также за счет сочетания адамантила и брома в С3 (соединение 55, ИС=19).

Противовирусная активность вторичных аминов, полученных алкилированием 3-аминопроизводного метилцитизина связана только с использованием в качестве радикала 4-метоксибензила (вещество 67, ИС=11).

Вирусингибирующее действие производных 12-N-замещенных производных (-) - цитизина, модифицированных по 2-пиридиновою ядру обеспечивается за счет комбинации нитрогруппы у С3 с такими радикалами, как бензил (вещество 70, ИС=11), водород (вещество 71, ИС=31) и пропенил (вещество 72, ИС=380). Кроме того, противовирусный эффект может достигаться за счет другого сочетания заместителей: пропенил во вторичном азоте и двух атомов брома у С3 и С5 (соединение 73, ИС=20).

Вирусингибирующая активность 12-N-этилоксипроизводных (-)-цитизина, связана с присоединением к третьему, четвертому и пятому атомам углерода брома, хлора и нитрогруппы.

Таким образом, в ходе экспериментов *in vitro* из 84 синтетических производных цитизина было выявлено 29 соединений, активных в отношении ВПГЧЗ. Наибольшим противовирусным эффектом обладали 16 соединений из 29 (вещества 12, 18, 20, 22, 25, 35, 39, 40, 41, 48, 72, 79, 80, 81, 82, 83). Из всех активных соединений только 5 (22 (ИС=134), 72(ИС=380), 81 (ИС=213), 82 (ИС=205) и 83(ИС=401)) имели значения ИС больше, чем для «Рибавирина» (ИС=120), и, следовательно, являются перспективными для дальнейшей разработки. Кроме того, 6 соединений (вещества 11, 12, 20, 22, 56 и 79) демонстрировали не только активность в отношении вируса парагриппа 3 типа, но и в отношении вируса гриппа А/PuertoRico/8/34 (H1N1), и, таким образом, являются веществами с широким спектром действия.

2. Изучение спектра активности производных цитизина

На следующем этапе нашего исследования мы оценивали вирусингибирующее действие 24 активных производных цитизина в отношении разных подтипов вируса гриппа А (A/California/07/09 (H1N1)pdm09, A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Mallard/Pennsylvania/10249 (H5N2)) и вирусов гриппа В (B/Malaysia/2506/04, B/Florida/04/06). Для каждого из тестируемых соединений по результатам РГА рассчитывали ЭД50 и ИС (отношение ЦТД50 к ЭД50). Полученные результаты представлены в таблице 3.

На основании полученных данных, только четыре вещества из 24 (11, 12, 14 и 54) были активны в отношении всех подтипов вируса гриппа А. Следует отметить также, что производное 12 обладало вирусингибирующим действием не только в отношении разных подтипов вируса гриппа А, но также и в отношении вирусов гриппа В и вируса парагриппа человека 3 типа. Следовательно, это вещество является наиболее перспективным для дальнейшей разработки против респираторных вирусов человека

Таблица 3. Противовирусная активность синтетических производных цитизина в отношении вирусов гриппа А, В и ВПГЧЗ

Номер соединения	ИС						
	A/PR/8/34 (H1N1)	A/California/07/09(H1N1)pdm09	A/Aichi/2/68(H3N2)	A/Mallard/Pennsylvania/10249(H5N2)	B/Malaysia/2506/04	B/Florida/04/06	ВПГЧЗ
11	12	18	64	50	1	1	20
12	16	29	35	26	26	10	53
14	47	28	53	88	8	2	2
54	14	214	49	16	3	1	3

3. Изучение стадии репродукции вируса – мишени действия производных цитизина

В следующей серии экспериментов была изучена противовирусная активность производных цитизина в зависимости от их времени добавления в культуральную среду. В этом эксперименте использовали соединение 14, обладающее активностью *in vitro* в отношении вирусов гриппа А подтипов H1N1, H3N2 и H5N2. Исследуемое вещество в концентрации 80 мкг/мл добавляли в культуру клеток MDCK в различные сроки по отношению к заражению вирусом гриппа А/PuertoRico/8/34 (H1N1). Далее оценивали титр вируса в культуре при разных сроках добавления соединения 14 (рисунок 1). Цифрами (в часах) обозначен срок присутствия вещества в культуре клеток относительно «точки 0» - момента входа вируса в клетку.

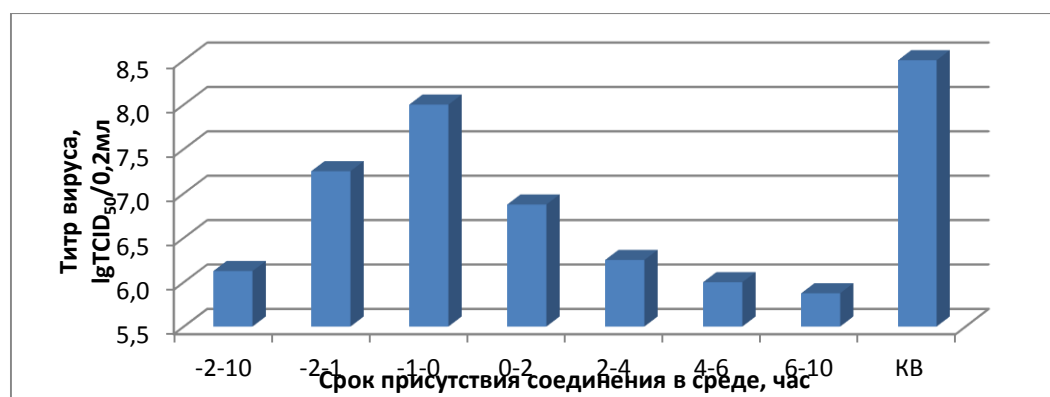


Рисунок 1 - Вирусингибирующая активность соединения 14 (80 мкг/мл) в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) в зависимости от времени добавления в культуру.

Согласно полученным результатам, титр вируса в контроле составил $8,5 \pm 0,7 \log_{10} \text{TCID}_{50}/0.2 \text{ мл}$.

Статистически значимое снижение титра вируса, согласно U-критерию Манна-Уитни ($p < 0,05$) отмечали в точках (-2)-10, (-2)-(-1), 0-2, 2-4, 4-6 и 6-10. В положительном контроле (точка (-2)-10), где препарат присутствовал в среде все время эксперимента, титр вируса снижался до значения $6,1 \pm 0,2 \log_{10} \text{TCID}_{50}/0.2 \text{ мл}$.

Внесение препарата в точке (-2)-1 является профилактическим, и в этот момент препарат может воздействовать на мембрану клетки, препятствуя взаимодействию вирусных белков с рецепторами на ее поверхности и активировать систему врожденного иммунитета. Снижение вирусных титров в точке (-1)-0 менее выражено и говорит о том, что вещество практически не влияет на адсорбцию вируса. Более существенное снижение вирусного титра в точках 0-2 и 2-4 может быть связано с такими стадиями вирусной репродукции, как проникновение и «раздевание» вируса. Однако максимальное снижение титров вируса, сопоставимое с положительным контролем (точка (-2)-10), было достигнуто только в пробе 6-10 и составило $5,9 \pm 0,2 \log_{10} \text{TCID}_{50}/0.2 \text{ мл}$. Полученные данные свидетельствуют, что противовирусный эффект производного 14 может быть связан с нарушением поздних стадий вирусной репродукции таких, как сборка вирионов потомства, «почкование» и выход дочерних вирусных частиц.

4. Исследование влияния производных цитизина на морфогенез гриппозной инфекции *in vitro*.

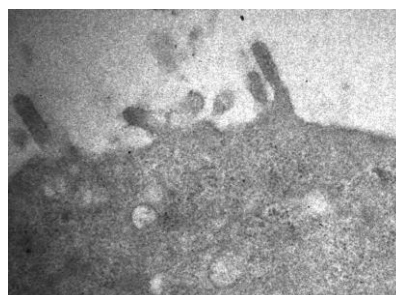
На следующем этапе исследования мы изучили влияние синтетических производных цитизина на морфогенез гриппозной инфекции *in vitro* на поздних стадиях вирусного цикла. Для этого вещество 14 в концентрации 50 мкг/мл и вирус гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) вносили в культуру клеток MDCK. Через 6 часов после проникновения вируса клетки фиксировали и изучали их ультраструктуру.

На рисунке 2А представлена клетка MDCK, инфицированная вирусом гриппа. Как видно, на поздней стадии репродукции вируса (6 часов после инфицирования) отмечается большое количество почкующихся вирионов. Добавление производного 14 на тех же сроках вирусной инфекции приводило к значительному снижению почкующихся вирусных частиц (рисунок 2В).

Исходя из представленных результатов, мы предположили, что возможными «мишенями» для действия синтетических производных цитизина могут быть нейраминидаза или матриксный белок вируса гриппа или различные транспортные белки клетки.



А



В

Рисунок 2 - Клетки MDCK, инфицированные вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (6ч) без добавления исследуемого соединения (А) и в присутствии соединения 14 (В). Просвечивающая электронная микроскопия, ув. 20 000

5. Исследование ингибирующей активности производных цитизина в отношении нейраминидазы вируса гриппа.

По результатам экспериментов, в которых было показано ингибирование репродукции вируса гриппа на поздних стадиях жизненного цикла, мы предположили, что возможной мишенью для действия производных цитизина является вирусная нейраминидаза (NA). Для проверки данной гипотезы мы оценили активность NA в присутствии и отсутствии препарата с помощью флюоресцентного MUNANA-теста. В качестве положительного контроля использовали известный ингибитор NA осельтамивир, а в качестве отрицательного контроля – вещество 1 (цитизин), не проявляющее противовирусной активности. Для каждого из исследуемых соединений вычисляли значение 50% эффективной дозы ($ЭД_{50}$). Полученные данные представлены в таблице 4.

Таблица 4. Исследование ингибирующей активности синтетических производных цитизина в отношении нейраминидазы вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) и A/Владивосток/2/09 (H1N1)

Препарат	Вирус	$ЭД_{50}$, pM
Осельтамивир	A/PuertoRico/8/34(H1N1)	$1,8 \times 10^4$
1	A/PuertoRico/8/34(H1N1)	$5,3 \times 10^9$
14	A/PuertoRico/8/34(H1N1)	$1,6 \times 10^9$
Осельтамивир	A/Владивосток/2/09 (H1N1)	3×10^{13}
1	A/Владивосток/2/09 (H1N1)	$3,3 \times 10^9$
14	A/Владивосток/2/09 (H1N1)	$1,1 \times 10^9$

Из полученных данных видно, что осельтамивир эффективно ингибирует NA вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1) и не оказывает влияния на активность NA устойчивого к нему вируса A/Владивосток/2/09 (H1N1).

Оба препарата ингибируют NA вируса A/PuertoRico/8/34 по сравнению с осельтамивиром крайне слабо. То же самое можно сказать и про активность этих двух соединений в отношении NA вируса A/Владивосток/2/09, устойчивость которого к осельтамивиру обуславливается мутацией H274Y. Следовательно, NA не является мишенью синтетических производных цитизина.

6. Селекция вирусов гриппа и парагриппа, устойчивых к синтетическим производным цитизина.

Дальнейшие эксперименты были направлены на селекцию вирусных штаммов, устойчивых к производным цитизина на примере соединения 22, которое демонстрировало наибольший противовирусный эффект в опытах *in vitro* как в отношении вирусов гриппа А, так

и в отношении ВПГЧЗ. Для проведения этого эксперимента мы использовали штамм вируса гриппа A/PuertoRico/8/34(H1N1).

Было проведено пять последовательных пассажей вируса с нарастающими концентрациями производного 22. В качестве положительного контроля осуществлялось пассирование исходного вируса в культуре клеток без добавления соединения. После второго, четвертого и пятого пассажей оценивали вирусингибирующее действие соединения 22 в отношении контрольного и селекционных штаммов вируса на культуре клеток MDCK. Результаты эксперимента представлены в таблице 5.

Таблица 5. Сравнение активности соединения 22 в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) после проведения серии последовательных пассажей с нарастающими концентрациями исследуемого вещества и без него.

Номер пассажа	Концентрация вещества, мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл (контроль)	ИС (контроль)	ЭД ₅₀ , мкг/мл (вирус+соединение 22)	ИС (вирус+соединение 22)
0	0	4,7±0,4	64	4,7±0,4	64
2	30	6,9±0,6	43	6,5±0,5	46
4	120	7,4±0,7	41	7,7±0,6	39
5	240	6,5±0,5	46	6,3±0,2	48

Из данных, представленных в таблице видно, противовирусный эффект соединения 22 был одинаков от пассажа к пассажи как в отношении контрольного штамма, так и в отношении вируса, пассированного с этим веществом. Таким образом, после пяти последовательных пассажей с веществом 22 вирус не выработал устойчивости к данному соединению.

В следующей серии экспериментов мы осуществляли селекцию штаммов ВПГЧЗ, устойчивых к действию соединения 12, которое демонстрировало активность в отношении этого вируса *in vitro*. Так же, как и для вируса гриппа, мы осуществили серию последовательных пассажей вируса с нарастающими концентрациями производного 12. Оценку вирусингибирующего действия соединения 12 в отношении контрольного и устойчивого штаммов ВПГЧЗ осуществляли так же, как и в предыдущем эксперименте. Результаты эксперимента представлены в таблице 6.

Таблица 6. Сравнение активности соединения 12 в отношении ВПГЧЗ после проведения серии последовательных пассажей с нарастающими концентрациями исследуемого вещества и без него.

Номер пассажа	Концентрация вещества, мкг/мл	ЭД ₅₀ , мкг/мл (контроль)	ИС (контроль)	ЭД ₅₀ , мкг/мл (вирус+соединение 12)	ИС (вирус+соединение 12)
0	0	1,9±0,2	47	1,9±0,2	47
2	8	2,2±0,1	45	2,5±0,3	40
4	32	3,2±0,3	31	3,1±0,5	32
5	64	2,8±0,3	36	2,9±0,3	34

Из данных, представленных в таблице, видно, что соединение 12 демонстрирует одинаковое вирусингибирующее действие как в отношении контрольного вируса, так и в отношении вируса, пассированного с этим веществом. Следовательно, после пяти последовательных пассажей с этим производным цитизина вирус парагриппа третьего типа не выработал к нему резистентности.

Отсутствие резистентности к этим двум препаратам может говорить о том, что мишенью для действия синтетических производных цитизина являются не вирусные, а клеточные белки.

7. Исследование влияния синтетических производных цитизина на организацию и полимеризацию актина и организацию микротрубочек в клетках

Результаты предыдущих экспериментов позволили нам сделать вывод о том, что возможной мишенью для действия синтетических производных цитизина могут быть белки клетки, участвующие в транспорте вРНП к месту сборки вирусных частиц. На основании литературных данных (Bedi, Ono, 2019, Avalos et al., 1997, Mayer et al., 2007, Simpson-Holley et al., 2002), мы предположили, что такими мишенями могут быть F-актин и тубулин.

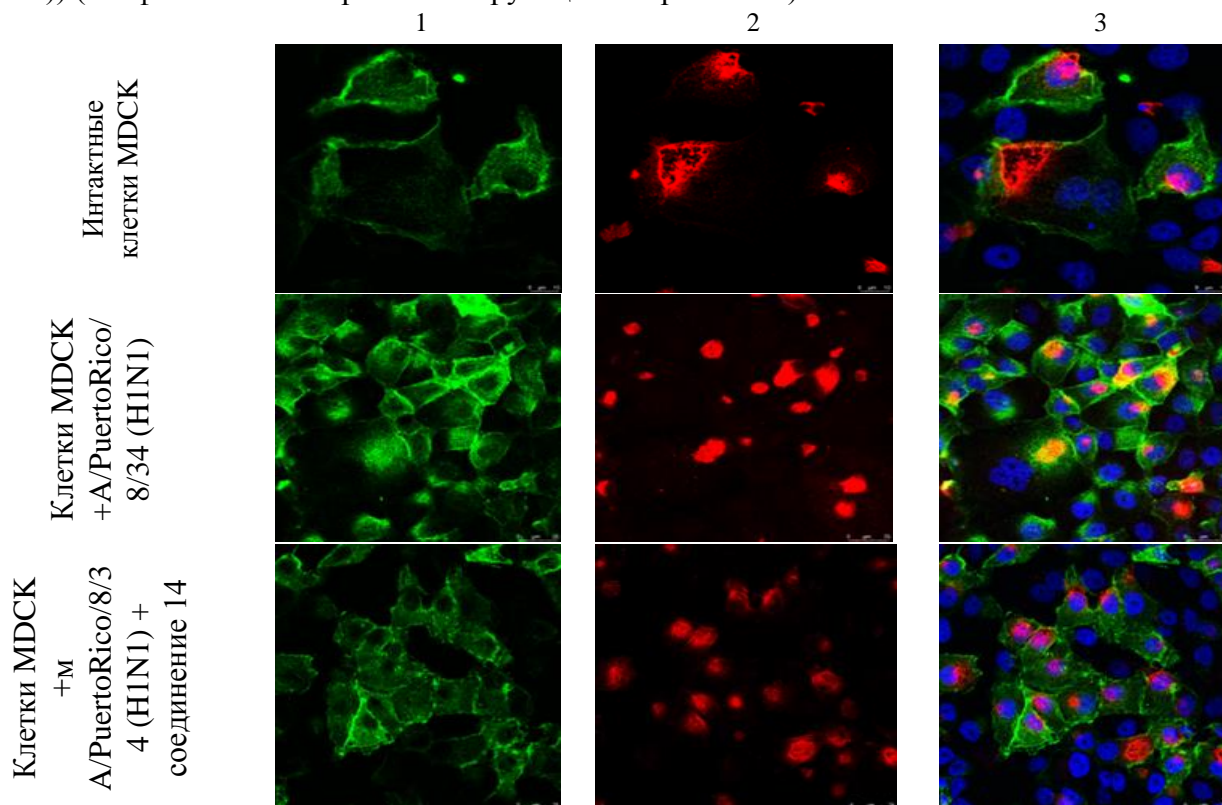
Для изучения влияния синтетических производных цитизина на компоненты цитоскелета клетки на поздних стадиях вирусной репродукции в культуру клеток MDCK вносили соединение 14 в концентрации 50 мкг/мл и вирус гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1). Через 6 часов после проникновения вируса клетки фиксировали, F-актин окрашивали АТТО 488-фаллоидином (зеленый цвет), α -тубулин - Alexa Fluor 647 (красный цвет), а ядра клеток - DAPI (синий цвет).

На рисунке 3 представлены интактные клетки MDCK, в которых F-актин организован в отчетливые многочисленные волокна, проходящие через цитозоль к мембране клетки. Тубулин расположен в перинуклеарной области.

В зараженных клетках через 6 часов после проникновения вируса отмечалось резкое увеличение числа актиновых волокон и формирование стресс-фибрилл (рисунок 3). Тубулин так же, как и в интактных клетках, был расположен в перинуклеарной зоне.

Добавление соединения 14 в инфицированные клетки на тех же сроках вирусной репродукции приводило к характерным изменениям в структуре цитоскелета. Во-первых, не отмечалось увеличение числа актиновых волокон и формирование стресс-фибрилл, как в положительном контроле, во-вторых, на поверхности клеток формировались редкие микроворсинки и наблюдалась агрегация F-актина по краям клеток. Тубулин в перинуклеарной зоне имел вид параллельных тяжей, как в интактных клетках (рисунок 3).

Рисунок 3 - Локализация F-актина и α -тубулина в интактных клетках MDCK и клетках MDCK, инфицированных вирусом гриппа A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) (6ч) без добавления исследуемого соединения и в присутствии соединения 14. 1-F-актин (Phalloidin-АТТО488, зеленый); 2- α -тубулин (Alexa Fluor 647, красный); 3-совмещение (ядра покрашены DAPI (синий)) (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия)



Полученные в ходе этого эксперимента результаты позволяют сделать вывод о том, что синтетические производные цитизина могут влиять на организацию и полимеризацию актина и организацию микротрубочек в клетках, инфицированных вирусом гриппа, что может приводить к нарушению транспорта ВРНП к месту сборки вирусных частиц.

8. Исследование противовирусной активности синтетических производных цитизина на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей

На следующем этапе исследования была изучена противовирусная активность синтетических производных цитизина *in vivo* на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей. Для опыта были использованы соединения 11 и 14, имеющие максимальную противогриппозную активность в опытах *in vitro*. Оба вещества по своей химической структуре относятся к аддуктам Дильса-Альдера 12-N-замещенных производных (-)-цитизина с N-фенилмалеинимидом.

В предварительных экспериментах определяли значение 50% токсической дозы (LD₅₀). Для производных 11 и 14 эти значения составили 250 и 500 мг/кг соответственно. На основании полученных значений высчитывали рабочие концентрации исследуемых соединений (1/5 и 1/10 от LD₅₀). Для вещества 11 были использованы рабочие концентрации 25 и 50 мг/кг, а для вещества 14 – 50 и 100 мг/кг.

Оценку активности исследуемых соединений осуществляли по следующим критериям: снижение смертности в опытной группе по сравнению с контрольной, увеличение средней продолжительности жизни. В эксперименте использовали высокую заражающую дозу вируса 10LD₅₀ (2,5×10³ TCID₅₀/мышь). Полученные результаты представлены в таблице 7 и на рисунке 4.

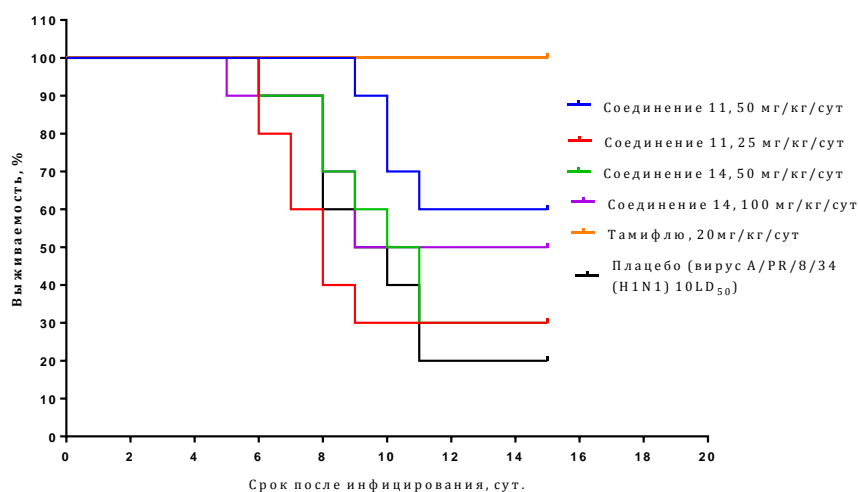


Рисунок 4 - Динамика гибели животных в ходе экспериментальной гриппозной инфекции в условиях применения химических соединений

Из полученных результатов следует, что соединения 11 и 14 снижали смертность животных по сравнению с контрольной группой. Оба вещества демонстрировали активность в отношении вируса гриппа при наибольших использованных концентрациях (50 мг/кг для соединения 11 и 100 мг/кг для соединения 14) и имели индексы защиты 50 и 37,5. При этом, достоверные отличия от группы плацебо ($p=0,0448$) были продемонстрированы лишь для группы животных, получавших соединение 11 в максимальной из используемых доз (50 мг/кг/сут.). Таким образом, исследуемые производные цитизина демонстрируют противовирусную активность при высокой заражающей дозе 10 LD₅₀ вируса A/PR/8/34(H1N1). Однако, их активность существенно уступала эффективному противогриппозному препарату Тамифлю, индекс защиты которого составил 100%.

Таблица 7. Протективная активность синтетических производных цитизина на модели летальной гриппозной пневмонии у белых мышей. Вирус A/PuertoRico/8/34 (H1N1). Доза вируса 10LD₅₀

Препарат	Доза, мг/кг	Смертность, %	Средняя продолжительность жизни, сут.	Индекс защиты, %	P
Контроль вируса	0	80	9,3	0	1,0000
11	25	70	7,3	12,5	0,7635
11	50	40	8,8	37,5	0,0448
14	50	70	9,4	12,5	0,6042
14	100	50	7,6	37,5	0,3060
Тамифлю	20	0	>14	100	0,0003

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе изучена противовирусная активность синтетических производных цитизина в отношении респираторных вирусов человека - вирусов гриппа и вируса парагриппа человека 3 типа. Из 84 соединений 24 вещества демонстрировали активность *in vitro* в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1). Наибольшую противогриппозную активность проявляют аддукты Дильса-Альдера с N-фенилмалеинимидом, находящиеся в « α -эндо» -конформации, имеющие в качестве заместителя во вторичном атоме азота метил, бензил, пропенил и фенилкарбамоил; вторичные амины, содержащие циклические заместители – тиофен, фенил, 2-гидроксibenзил, 3,4- диметокси – и 3-метоксибензил.

Из 84 проанализированных соединений выявлено 29 производных цитизина, обладающих активностью *in vitro* в отношении ВПГЧЗ. Наибольшую активность проявляют аддукты Дильса-Альдера с N-фенилмалеинимидом, находящиеся в « α -эндо» - конформации с метилом, фенилом, пропенилом и фенилкарбамоилом во вторичном азоте; тиомочевины различной топологии, содержащие фенилкарбамоил, пропенил, фенил во вторичном азоте и бром в C3, C3 и C5; 12-N – этилоксипроизводные с нитрогруппой, хлором и бромом в C2, C3 и C4.

Показано, что соединение 14 обладает наибольшей активностью на поздних стадиях репродукции вируса гриппа. Действие этого вещества связано с нарушением процессов почкования и выхода зрелых вирусных частиц. Однако соединение 14 крайне слабо ингибирует нейраминидазу вируса гриппа.

Пассирование вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) в присутствии нарастающих концентраций соединения 22 и ВПГЧЗ - соединения 12 в течение 5 пассажей не приводило к появлению устойчивых штаммов.

С помощью конфокальной сканирующей лазерной микроскопии показано, что вещество 14 в клетках, инфицированных вирусом гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) влияет на организацию и полимеризацию актина на поздних стадиях вирусной репродукции.

Для наиболее активных соединений изучена противовирусная активность на модели летальной гриппозной пневмонии у мышей. Показано, что введение препаратов 11 и 14 по лечебно-профилактической схеме приводило к снижению смертности и увеличению продолжительности жизни животных Их индекс защиты составляет 13-50%.

В заключение следует отметить, что синтетические производные цитизина являются весьма перспективными веществами для дальнейшего изучения и разработки с целью получения новых лекарственных препаратов, которые были бы более безопасны и эффективны, чем имеющиеся в настоящее время, а также обладали бы более широким спектром действия.

ВЫВОДЫ:

1. Большинство синтетических производных цитизина обладает низкой цитотоксичностью в культурах клеток MDCK и MA-104. Показано, что низкой токсичностью в культуре клеток MDCK (ЦТД₅₀>300) обладают 12N-замещенные производные (-)-цитизина, аддукты Дильса-Альдера в « α -эндо» конформации, тиомочевины и мочевины различной топологии и

этилоксипроизводные (-) -цитизина. Низкая цитотоксичность в культуре клеток MA-104 (ЦТД₅₀>300) показана для 12N-замещенных производных (-)-цитизина, тиомочевин различной топологии.

2. Высокой вирусингибирующей активностью (SI>10) *in vitro* в отношении вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) обладают 24 из 84 изученных синтетических производных цитизина.

3. Высоким противовирусным эффектом *in vitro* в отношении вируса парагриппа человека обладают 29 из 84 синтетических производных цитизина.

4. Противовирусное действие синтетических производных цитизина зависит от характера заместителей в молекуле. Максимальной противовирусной активностью обладают аддукты Дильса-Альдера с N-фенилмалеинимидом в «α-эндо» конформации. Наибольшее вирусингибирующее действие достигается за счет замещения водорода во вторичном атоме азота на фенилкарбамоил.

5. Синтетические производные цитизина 11, 12, 14 и 54 активны в отношении подтипов вирусов гриппа А (подтипы H1N1, H1N1pdm09, H3N2, H5N2). Соединение 12, кроме того, обладает вирусингибирующим действием и в отношении вирусов гриппа В, относящихся к двум различным линиям (В/Ямагата и В/Виктория), и в отношении ВПГЧЗ.

6. Активные синтетические производные цитизина проявляют максимальную вирусингибирующую активность на поздних стадиях жизненного цикла вируса гриппа (6-10 часов после заражения). Действие соединений связано с нарушением процессов «почкования» и выхода зрелых вирусных частиц.

7. Последовательное серийное пассирование вируса гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1) в присутствии соединения 22 (30-240 мкг/мл) и ВПГЧЗ в присутствии соединения 12 (8-64 мкг/мл) не приводит к формированию вирусной резистентности.

8. Синтетические производные цитизина влияют на организацию и полимеризацию актина в клетках, инфицированных вирусом гриппа A/PuertoRico/8/34 (H1N1).

9. Синтетические производные цитизина 11 и 14 при введении по лечебно-профилактической схеме проявляют умеренную противовирусную активность (ИЗ=25-50%) *in vivo* на модели летальной гриппозной пневмонии.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Результаты проведенных исследований могут служить основой для дальнейших работ в этом направлении. Так, в качестве дальнейших перспектив разработки данной темы необходимо провести изучение противовирусной активности синтетических производных цитизина *in vitro* в отношении других вирусов – возбудителей респираторных заболеваний человека, которые используют для репродукции компоненты клеточного цитоскелета: респираторно-синцитиальный вирус, коронавирусы, риновирусы и аденовирусы.

Кроме того, необходимо изучить токсичность активных производных цитизина *in vivo* и определить основные токсикометрические показатели исследуемых соединений, а также оптимизировать способ и режим их применения для оценки их фармакологического потенциала.

Кроме того, необходимо исследовать соединения – лидеры *in vivo* на модели парагриппозной пневмонии. В этих экспериментах эффективность соединений будет оцениваться по снижению титров вируса в легочной ткани, а также по нормализации морфологической структуры легочной ткани.

Необходимо также определить конкретную мишень действия соединений-лидеров и провести компьютерное моделирование их взаимодействия с помощью специального программного обеспечения. Это позволит определить структурные основы связывания низкомолекулярных лигандов с рецепторами, что, в свою очередь, позволит провести направленную оптимизацию химических структур лигандов для повышения их аффинности.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи в научных журналах

1. Цыпышева И.П., Галкин Е.Г., Федоров Н.И., Оршанская Я.Р., **Федорова В.А.**, Зарубаев В.В. Активность *Chamaecytisus ruthenicus (Fabaceae)* в отношении вируса гриппа А (H1N1).// **Химия растительного сырья** - 2016. - №2. - С. 153–156.
2. Цыпышева И.П., Галкин Е.Г., Ковальская А.В., Петрова П.Р., Байкова И.П., Оршанская Я.Р., **Федорова В.А.**, Федоров Н.И., Галин Ф.З., Зарубаев В.В. Противовирусная активность суммы алкалоидов *Genista tinctoria* и ее отдельных фракций в отношении вируса гриппа А(H1N1)pdm09.// **Химия растительного сырья** - 2017. - №3. - С. 71–76.
3. Tsypysheva I.P., Galkin E.G, Baikova I.P., Fedorov N.I, Petrova P.R., Orshanskaya Ya.R., **Fedorova V.A.**, Zarubaev V.V. Activity of *Thermopsis schischkinii* Alkaloids Against Influenza A(H1N1)pdm09 Virus.// **Chemistry of Natural Compounds** – 2015. –Vol.51. -№4. – P.1003-1005.
4. Tsypysheva I.P., Koval'skaya A., Petrova P., Lobov A., Borisevich S.S., Tsypyshev D., **Fedorova V.A.**, Gorbunova E.A., Galochkina A.V., Zarubaev V.V. Diels-Alder Adducts of N-substituted Derivatives of (-)-Cytisine as Influenza A/H1N1 Virus Inhibitors; Stereodifferentiation of antiviral Properties and Preliminary Assessment of Action Mechanism.// **Tetrahedron** – 2019. –Vol.75. -№ 21. –P. 2933-2943.
5. **Fedorova V.A.**, Kadyrova R.A., Slita A.V., Muryleva A.A., Petrova P.R., Kovalskaya A.V., Lobov A.N., Zileeva Z.R., Tsypyshev D.O., Borisevich S.S., Tsypysheva I.P., Vakhitova J.V., Zarubaev V.V.. Antiviral activity of amides and carboxamides of quinolizidine alkaloid (-)-cytisine against human influenza virus A(H1N1) and parainfluenza virus type 3// **Natural Product Research** - 2019. –P. 1-9.

Тезисы на конференциях

1. **Fedorova V.A.**, Tsipisheva I.P., Kovalskaya A.V., Lobov A.N., Nikolaeva E.A., Yunusov M.S. Zarubaev V.V. Activity of cytosine derivatives against human parainfluenza virus type 3 *in vitro* experiments.// Book of abstracts of 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry MedChem 2015. – Novosibirsk, Russia, July 5-10, 2015. – P.178.
2. **Fedorova V.**, Tsypysheva I., Koval'skaya A., Petrova P., Borisevich S., Zarubaev V. Cytisine derivatives inhibit replication human influenza viruses *in vitro*//Abstract book of International conference “Trends in Influenza Research”. – Saint-Petersburg, September 18-20, 2017. –P.116.
3. **Fedorova V.A.**, Tsypysheva I.P., Koval'skaya A.V., Petrova P.R., Borisevich S.S., Zarubaev V.V. Cytisine derivatives as potent antivirals that inhibit replication human influenza viruses *in vitro*// Abstract book of 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry. – Kazan, September 28-October 03, 2017. – P. 104.

Список сокращений

- АТ – антитело
БСА – бычий сывороточный альбумин
ВПГЧ – вирус парагриппа человека
ДМСО - диметилсульфоксид
ИЗ – индекс защиты
ИС – индекс селективности
МПК – максимально переносимая концентрация
РГА – реакция гемагглютинации
ЦТД₅₀ – 50% цитотоксическая доза
ЭД₅₀ – 50% эффективная доза
ЭИД₅₀ – 50% эмбриональная инфекционная доза
ДАРИ – 2-(4-амидинофенил)-6-индолкарбамадин дигидрохлорид
LD₅₀ – 50% летальная доза

MES – морфолино – 2- этансульфовая кислота
MUNANA – 4-метилумбеллиферил- α -D-N-ацетилнейраминовая кислота
PBS – фосфатно-солевой буфер
TCID50 – 50% тканевая цитопатогенная доза