

На правах рукописи



Глубокова Екатерина Андреевна

**ПОИСК НОВЫХ АКТИВНЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СРЕДИ
АНАЛОГОВ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ХИМИОПРЕПАРАТОВ ПРЯМОГО
ВИРУССПЕЦИФИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ**

1.5.10. Вирусология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова»

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Ленева Ирина Анатольевна

Официальные оппоненты:

Еропкин Михаил Юрьевич – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ведущий научный сотрудник

Носик Дмитрий Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»

Защита состоится « » _____ 2026 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.173.01 при ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» по адресу: 105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5А

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова и на сайте <https://instmech.ru/ru/>

Автореферат разослан « » _____ 2026 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук

Мурзина Алёна Андреевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Несмотря на достижения медицинской науки в 21 веке грипп все еще остается актуальной медико-социальной проблемой. Ежегодно грипп причиняет значительный вред людям и вызывает крупные экономические потери. В различных возрастных группах смертность от гриппа во время эпидемий может варьироваться от десятков до сотен случаев. В периоды пандемий этот показатель может достигать тысячи случаев на сто тысяч населения. При этом ежегодный уровень заболеваемости оценивается в 5-10% среди взрослых и в 20-30% среди детей.

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рассматривает вакцинацию как основную стратегию для борьбы и профилактики гриппозной инфекции. Однако из-за высокой и непредсказуемой изменчивости поверхностных белков вируса, состав вакцины постоянно корректируется в соответствии с антигенной структурой циркулирующих штаммов вирусов гриппа. При возникновении пандемии с новым штаммом вируса гриппа невозможно быстро создать новую вакцину и основным способом борьбы с инфекцией становятся противогриппозные химиопрепараты. Поэтому ВОЗ вместе с вакцинацией рекомендует использование этиотропных противогриппозных препаратов для лечения и профилактики гриппа, однако их ряд ограничен. В настоящее время зарегистрировано несколько групп препаратов с известными мишенями: блокаторы М2-белка вирусов гриппа А (амантадин и римантадин), ингибиторы вирусного фермента нейраминидазы (осельтамивир, занамивир, перамивир, лананамивир), ингибитор фузии, мишенью действия которого является гемагглютинин (умифеновир), ингибитор полимераз однократного применения (балоксавир).

Клинические испытания показывают, что лечение противогриппозными препаратами на ранних стадиях, имеет сходные эффекты: оно способствует сокращению продолжительности заболевания, уменьшает проявления симптомов инфекции и сокращает период выделения вируса и его репродукции в носоглотке. Однако у каждого препарата есть свои преимущества и недостатки. Наибольшей проблемой при применении препаратов является возникновение резистентных штаммов вируса гриппа, которые наиболее часто выявляют среди групп риска: дети и пациенты с хроническими заболеваниями или нарушениями иммунной системы, для которых применение этиотропных средств и профилактических мер при гриппозной инфекции особенно важно. Практически все штаммы вируса гриппа А, циркулирующие в мире после 2009 года, показывают резистентность к римантадину, поэтому данный препарат не рекомендуется для лечения гриппа несмотря на то, что он хорошо изучен и обладает высокой эффективностью против вирусов гриппа А.

Балоксавир – это препарат, который эффективно подавляет репродукцию вируса гриппа после одного или двух применений. Однако к данному препарату выявлена резистентность до 30%, кроме того, стоимость этого препарата достаточно велика, и он находится под патентом, поэтому разработка более дешевого и не менее эффективного российского аналога является актуальной задачей. Хотя штаммов, резистентных к препарату умифеновир не выявлено, и он

обладает широким спектром действия, однако к факторам, ограничивающим использование этого препарата, относятся его свойства, связанные с растворимостью и биодоступностью, что определяет неудобные для пациента схемы лечения, отсутствие или несовершенство ряда лекарственных форм. Кроме того, в культуре клеток умифеновир обладает узким терапевтическим окном, однако при лечении людей токсического эффекта при повышении концентрации препарата не наблюдалось.

Один из возможных путей борьбы с развитием резистентности, а также ограниченными фармакологическими свойствами препаратов – это создание новых препаратов, обладающих высокой эффективностью против вирусов гриппа, резистентных к существующим лекарственным средствам с определённым механизмом действия, а также обладающих улучшенными фармакологическими характеристиками. Наиболее перспективный подход при создании новых препаратов – это поиск аналогов уже существующих зарегистрированных препаратов. Всё вышесказанное подчёркивает важность поиска, изучения и оценки эффективности новых противогриппозных соединений.

Степень разработанности темы исследования

ВОЗ вместе с вакцинацией рекомендует использование этиотропных противовирусных средств. В настоящее время ведётся поиск новых активных соединений, которые были бы более биодоступны и эффективны против резистентных вирусов гриппа. Римантадин в настоящее время не используют для лечения и профилактики вируса гриппа из-за высокой резистентности циркулирующих штаммов. Однако, резистентность к римантадину у вирусов гриппа А остаётся распространённой, в различных исследованиях [R. Musharrafieh et al., 2019; C. Ma et al., 2016; V. Balannik et al., 2010; A. L. Stouffer et al., 2008] было показано, что большинство мутантных вирусов, которые несут мутацию S31N, ответственную за резистентность к амантадину и римантадину, возвращаются к своему чувствительному дикому типу. Кроме того, механизм действия аминоадамантанов против вирусов гриппа А хорошо изучен, что дополнительно стимулирует исследования по синтезу новых адамантансодержащих молекул.

Умифеновир эффективен против вирусов гриппа А и В у человека и входит в рекомендации для лечения. Однако умифеновир имеет низкую биодоступность и сложную схему применения. Поиск эффективных аналогов, обладающих большей биодоступностью и не меньшей эффективностью, ведётся в различных лабораториях [Z. V. F. Wright et al., 2017; V. Brancato et al., 2013; X. Zhao et al., 2021]. Хотя многие синтезированные аналоги умифеновира на основе индола попадают под какие-либо патенты или опубликованы в статьях, но соединений со значительной активностью среди них нет.

Балоксавир является эффективным противогриппозным препаратом однократного или двукратного применения, ингибитор кэп-зависимой эндонуклеазы вируса гриппа. Существенным вкладом в разработку низкомолекулярных ингибиторов кэп-зависимой эндонуклеазы стало создание Балоксавира марбоксила, который в 2018 году был одобрен для лечения в Японии и США. Несмотря на свою эффективность и простоту в применении, к данному препарату ещё во время клинических испытаний у пациентов начинали выявляться резистентные вирусы гриппа.

Таким образом, поиск новых противогриппозных химиопрепаратов остаётся актуальным, а самым перспективным подходом является поиск среди аналогов лицензированных противовирусных препаратов. Проведённое исследование позволило выявить наиболее перспективные соединения кандидаты для дальнейшего клинического изучения.

Цели и задачи исследования

Цель исследования: поиск и изучение активных соединений среди аналогов зарегистрированных противогриппозных препаратов с известной эффективностью и механизмом действия в культурах клеток и на модели гриппозной инфекции мышей.

Задачи исследования:

1. Для аналогов римантадина (адамантильные производные 1,3-оксазинан-2-она и пиперидин-2,4-диона):

1.1. Изучение противовирусной активности в отношении вируса гриппа А в культуре клеток;

1.2. Изучение эффективности на модели гриппозной инфекции мышей, индуцированной римантадин-резистентным вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09;

1.3. Изучение возможности риска возникновения резистентности.

2. Для аналогов умифеновира (производных 6-гидроксibenзотиофена):

2.1. Изучение цитотоксичности 10 аналогов на различных культурах клеток;

2.2. Изучение широты спектра их действия в отношении различных подтипов вирусов гриппа А и В в культуре клеток;

2.3. Изучение эффективности на модели гриппозной инфекции мышей, индуцированной вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09.

3. Для аналогов балоксавира (замещенные (12aR)-12-(дифенилметил)-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо-[2,1-f][1,2,4]триазин-6,8-дионы и их этерифицированные формы предшественников):

3.1. Изучение противовирусной активности в отношении различных подтипов вирусов гриппа А и В в культуре клеток;

3.2. Изучение противовирусной активности в отношении резистентных вирусов гриппа;

3.3. Изучение эффективности на модели гриппозной инфекции мышей, индуцированной вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09.

Научная новизна

Впервые была изучена противовирусная активность новых аналогов римантадина в отношении различных подтипов вируса гриппа А на культуре клеток MDCK и подтверждена эффективность на модели гриппозной инфекции мышей, индуцированной римантадин-резистентным вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09, адамантильных производных 1,3-оксазинан-2-она и пиперидин-2,4-диона. Также впервые показано, что лечение адамантильными производными 1,3-оксазинан-2-оном и пиперидин-2,4-дионом, в отличие от римантадина, не приводит к возникновению резистентности на фоне их приёма на животной модели.

Впервые была изучена цитотоксичность на широком диапазоне культур клеток и противовирусная активность в культуре клеток MDCK в отношении вирусов гриппа А и В 10 новых аналогов умифеновира, проведена оценка эффективности отобранных активных аналогов на модели гриппозной инфекции мышей, индуцированной вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09.

Впервые была изучена противовирусная активность теоретически предсказанных и синтезированных новых аналогов балоксавира, замещенных (12aR)-12-(дифенилметил)-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо-[2,1-f][1,2,4]триазин-6,8-дионов и их этерифицированных форм предшественников, в отношении различных подтипов вируса гриппа А и В на культуре клеток MDCK, в том числе против балоксавир- и римантадин-резистентных вирусов гриппа, а также изучена их эффективность на модели гриппозной инфекции мышей, индуцированной вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09.

Теоретическая и практическая значимость работы

Изучение аналогов противогриппозных препаратов в культуре клеток и в животной модели гриппозной пневмонии имеет важное практическое значение, поскольку ведёт к обнаружению новых соединений, обладающих противовирусной активностью и улучшенными свойствами, которые в дальнейшем могут стать кандидатами для разработки противогриппозных препаратов.

Полученные результаты о противогриппозной активности в культуре клеток и эффективности на животной модели могут стать основой для клинических испытаний при дальнейшем изучении этих соединений. Кроме того, полученные данные могут быть использованы для разработки дизайна клинических испытаний и помочь в оптимизации стратегии лечения гриппозной инфекции.

Кроме того, изучение аналогов противовирусных препаратов на культуре клеток и в животной модели позволит получить более детальные представления о патогенезе и об особенностях их воздействия на маркеры (клинические и вирусологические) гриппозной пневмонии. Полученные данные по изучению аналогов также помогут детализировать механизмы образования резистентности к противогриппозным препаратам для прогнозирования риска её развития.

Методология и методы диссертационного исследования

Работа выполнена с использованием вирусологических, иммунологических методов, рекомендуемых применять при изучении противовирусной активности препаратов в культурах клеток и на животных моделях, а также статистических методов обработки полученных результатов с использованием классических методов прикладной статистики; полученные данные визуализировались с помощью пакета программ Statistica 8.0, RStudio и Microsoft Excel.

Личный вклад автора

Основная часть экспериментальной работы и анализ результатов выполнены лично автором или при его участии.

Положения, выносимые на защиту

1. Аналоги римантадина 1,3-оксазинан-2-он (39) и пиперидин-2,4-дион (41) обладали противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа А с мутацией S31N, резистентных к римантадину. Они специфически подавляли размножение вирусов в культуре клеток MDCK и были эффективны на модели гриппозной пневмонии мышей, снижая гибель животных, потерю ими массы тела, титр вируса в лёгких и увеличивая продолжительность жизни по сравнению с контрольной группой нелеченных животных.

2. Вирусы, выделенные из легких мышей, зараженных римантадин-резистентным вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09, в культуре клеток MDCK показали отсутствие формирования резистентности к соединениям 39 и 41 на фоне 5-ти дневного курса лечения.

3. Среди 10 изученных аналогов умифеновира в культуре клеток MDCK выявлены соединения с наименьшей цитотоксичностью 11926007, 11926011, 12026078, 12026163, обладающие наиболее высокой активностью в отношении вирусов гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09 и В/Вашингтон/02/2019 (линия Виктория).

4. Соединения 12026078 и 11926007 были эффективны у мышей, инфицированных вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09, увеличивали выживаемость, среднюю продолжительность жизни и подавляли размножение вируса в легких по сравнению с контрольной группой нелеченных животных. Наиболее эффективным было лечение соединением 12026078 в дозах 60 и 90 мг/кг/день, которое было сравнимо с лечением умифеновиром в аналогичных дозах и превосходило лечение осельтамивиром в дозе 20 мг/кг/день.

5. В культуре клеток MDCK показана высокая противовирусная активность аналогов балоксавира 5106 и 5116 в отношении широкого спектра вирусов гриппа А различных подтипов (H1N1, H3N2), включая осельтамивир-резистентный вирус гриппа А, а также вирусов гриппа В линии Ямагата и Виктория.

6. Соединения 5106 и его пролекарство 5125, а также соединения 5124, которое является пролекарством соединения 5116, были эффективны на модели летальной гриппозной пневмонии мышей, зараженных низкой и высокой дозой вируса гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09. Двухкратное лечение ими в дозе 50 мг/кг практически полностью предотвращало гибель животных, потерю массы тела и размножение вируса в легких животных.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Направление диссертационного исследования соответствует п. 11 «Противовирусные препараты. Интерфероны и индукторы интерферона: изучение механизма действия, получение и применение. Вирусные вакцины, в том числе живые (аттенуированные), инактивированные, субъединичные, рекомбинантные (реплицирующиеся и нереплицирующиеся), векторные и вакцины на основе вирусоподобных частиц» паспорта научной специальности 1.5.10. Вирусология.

Степень достоверности и апробация результатов

Положения и выводы являются научно обоснованными. Полученные результаты являются достоверными, опираются на экспериментальные и литературные данные, и определяются использованными методами, адекватными целям и задачам исследования, методами статистической обработки полученных в ходе исследований результатов. Результаты диссертационной работы были представлены на двух международных конференциях, посвященных 300-летию РАН (2020-2021) и на 24-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (2020). Результаты работы отражены в 6 научных публикациях в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 3 статьи в ведущих научных журналах, рецензируемых Scopus, 3 тезисах и докладах на международных конференциях.

Публикации по теме диссертации

По результатам проведенного исследования автором опубликовано 6 работ, в том числе 3 оригинальные научные статьи в международных, индексируемых базах данных Scopus, Web of Science, PubMed и 3 публикации в сборниках материалов международных научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 156 страницах, включает 43 рисунка и 13 таблиц. Список литературы включает 249 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа была проведена на базе лаборатории экспериментальной вирусологии (заведующая лабораторией, д.б.н., Ленева И.А.) ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. Соединения для исследования были предоставлены Институтом элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, АО «Отисифарм», ООО Исследовательский Институт

Химического Разнообразия (ИИХР). Все рабочие растворы исследуемых препаратов и субстанции для изучения противовирусной активности, готовились из расчета содержания чистой субстанции в лекарственной форме непосредственно перед проведением эксперимента.

Римантадин и его аналоги. Для *in vitro* исследований римантадин и его аналоги готовили следующим образом: сток-растворы аналогов и римантадина (1 мг/мл) готовили в 99,8% ДМСО, далее их разводили до концентрации 0,5-10 мкг/мл культуральной средой MEM. Для исследования на животных были использованы концентрации 15-60 мг/кг/день в виде готовых растворов 0,5% водного ДМСО.

Умифеновир и его аналоги: метил 2-[ацетил(бензил)амино]-6-гидрокси-1-бензотиофен-3-карбоксилат (11826301), метил 2-[ацетил(бензил)амино]-7-[(диметиламино)метил]-6-гидрокси-1-бензотиофен-3-карбоксилат (11826411), метил 2-[бензил(метилсульфонил)амино]-7-хлор-6-гидрокси-1-бензотиофен-3-карбоксилат (11926001), 2-[ацетил(бензил)амино]-6-гидрокси-N-метил-1-бензотиофен-3-карбоксамид (11926007), 2-[ацетил(бензил)амино]-7-хлор-6-гидрокси-N-метил-1-бензотиофен-3-карбоксамид (11926011), метил 2-[ацетил(2-фторбензил)амино]-7-[(диметиламино)метил]-6-гидрокси-1-бензотиофен-3-карбоксилат (12026078), умифеновир для сравнения (12026163). Для исследований готовились сток-растворы (1 мг/мл) в дистиллированной воде с 10% содержанием спирта, которые далее разводились до концентрации 1-100 мкг/мл культуральной средой MEM. Для исследования на животных были использованы концентрации 20-120 мг/кг/день в 1% растворе крахмала.

Балоксавир и его аналоги: (12aR)-12-[(R)-(3,4-Дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксаино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]-триазин-6,8-дион и (12aR)-12-[(R)-(3,4-Дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-6,8-диоксо-3,4,6,8,12,12a-гексагидро-1H-[1,4]оксаино[3,4-с]пиридо-[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил}окси)метилметилкарбонат (5116 и 5124), а так же (12aR)-12-(Дифенилметил)-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро 1H-[1,4]оксаино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1, 2,4]триазин-6,8-дион и {[(12aR)-12-(Дифенилметил)-6,8-диоксо-3,4,6,8,12,12a-гексагидро-1H-[1,4]оксаино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил}окси}-метилметилкарбонат. Для исследований готовились сток-растворы (1 мг/мл) в 99,8 % ДМСО, которые далее разводились до концентрации 0,02 нМ - 100 мкМ культуральной средой MEM, для исследования на животных были использованы концентрации 5-50мг/кг в 0,5% НРМС (гидроксипромилметилцеллюлоза).

Для определения цитотоксичности соединений на культуре клеток использовали колориметрический метод оценки метаболической активности клеток МТТ-тест. Концентрация субстанций, уменьшающая значение ОП (оптическая плотность) на 50% по сравнению с контролем клеток, принималась за 50% цитотоксическую дозу (ЦТД₅₀). Изучение противовирусной активности в отношении вирусов гриппа А и В проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА). Концентрация субстанций, уменьшающая значение ОП на 50% по сравнению с вирусным контролем, принималась за 50% ингибирующую концентрацию (ИК₅₀). Дополнительно ИК₅₀ определялся с помощью онлайн-калькулятора (<https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>).

Культуры клеток: MDCK (CRL-2936), Vero (CCL81), HEp-2 (CCL-23) и Vero E6 (CRL-1586), полученные из ATCC (хранение культур в жидком азоте).

Вирусы: эталонные штаммы вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09, А/Аичи/2/69 (H3N2), А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), В/Висконсин /1/2010 (Ямагатская линия), полученные из Национального центра по гриппу ВОЗ, работающего на базе ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Осельтамивир-резистентный вирус гриппа А А/Perth/265/2009 (H1N1) предоставлен Antiviral Group, International Society for Influenza and Other Respiratory Virus Diseases (United Kingdom). Клинические изоляты вирусов гриппа В В/Москва/3/19 и В/Грозный/6/19 (линия Виктория), выделенные от пациентов на территории России, получены из ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, подразделение института вирусологии им. Д.И. Ивановского (предоставлены Е.И.Бурцевой).

Для проведения исследований на культуре клеток для изучения титра вируса в лёгких животных использовались пробы гомогената лёгких мышей (по 3 пробы из каждой группы), инфекционный титр вируса определяли по 3 повторам в лунках для каждой пробы по методу Рида и Менча и выражали в \lg ТЦИД₅₀/0,1 мл (50%-ной тканевой цитопатической инфекционной дозы). Далее рассчитывали среднее значение титра для одинаковых проб. В работе было исследовано 153 пробы гомогената лёгких мышей линии BALB/C, самок весом 12-14 г., заражённых вирусом гриппа А/Калифорния/04/09(H1N1)pdm09 и леченных исследуемыми соединениями или препаратами сравнения, всего в опытах использовалось 534 животных. Животным контрольной группы, инфицированным вирусом гриппа, вводили плацебо в соответствующем для исследуемых соединений растворе и по такой же схеме.

Активность соединений на модели гриппозной пневмонии мышей оценивали по следующим критериям: выживаемость животных, увеличение средней продолжительности жизни, динамика снижения веса, титр вируса в легких. За животными вели ежедневное наблюдение в течение 16 полных дней (с момента инфицирования животных вирусом гриппа). Смертность фиксировали ежедневно. Мышей взвешивали перед введением исследуемых веществ, с 1 по 5 сутки, далее через день до окончания эксперимента. Все эксперименты проведены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755) и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных». Исследования одобрено на заседании Локального совета по этике ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (Протокол № 10/2024 от 9.10.2024г.).

Мышей инфицировали интраназально под легким наркозом вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09. Для перорального введения использовали одноразовый инсулиновый шприц с зондом для кормления животных.

Дизайн исследования и экспериментальные группы аналогов римантадина: в первой серии опытов мышей заражали высокой дозой заражения $10^{4,5}$ ТЦИД₅₀/0,1мл. Во второй серии экспериментов использовали низкую дозу $10^{4,0}$ ТЦИД₅₀/0,1мл. При изучении эффективности аналогов и метаболитов римантадина была использована следующая схема лечения:

соединения и контрольный препарат вводили перорально за 4 часа до и через 4 часа после инфицирования и далее в течение 5 дней 2 раза в день в объеме 200 мкл.

Дизайн исследования и экспериментальные группы аналогов умифеновира: мышей заражали в дозе $10^{4,5}$ ТЦИД₅₀/0,1мл. Тестируемые образцы вводились за 24 часа до заражения вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09, а затем ежедневно на протяжении 5 дней, 1 раз в день перорально в объеме 200 мкл в 1% крахмале. Введение препарата сравнения (осельтамивира карбоксилат) осуществлялось за 4 часа до и после заражения вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09 (2 раза), а затем ежедневно на протяжении 5 дней, 2 раза в день с интервалом в 8 часов, перорально в дозе 20 мг/кг/день в объеме 200 мкл.

Дизайн исследования и экспериментальные группы аналогов балоксавира: мышей заражали в двух дозах: в дозе $10^{4,5}$ ТЦИД₅₀/0,1мл в первом опыте и $10^{4,0}$ ТЦИД₅₀/0,1мл во втором. Тестируемые образцы вводились непосредственно перед заражением вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09 и через 12 часов внутривенно в объеме 200 мкл.

Полученные цифровые данные *in vitro* и *in vivo* были подвергнуты статистической обработке в программе “Statistica 8.0” и MS Office Excel 2016. Сравнение выживаемости в группах мышей проводили при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и метода нелинейной регрессии. Различия считали статистически значимыми для значений $p < 0,05$. Параметры описательной статистики включали среднее значение показателя в группе и стандартное отклонение (SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение цитотоксичности и противовирусной активности аналогов римантадина в культуре клеток MDCK в отношении вирусов гриппа А при различной множественности заражения методом ИФА

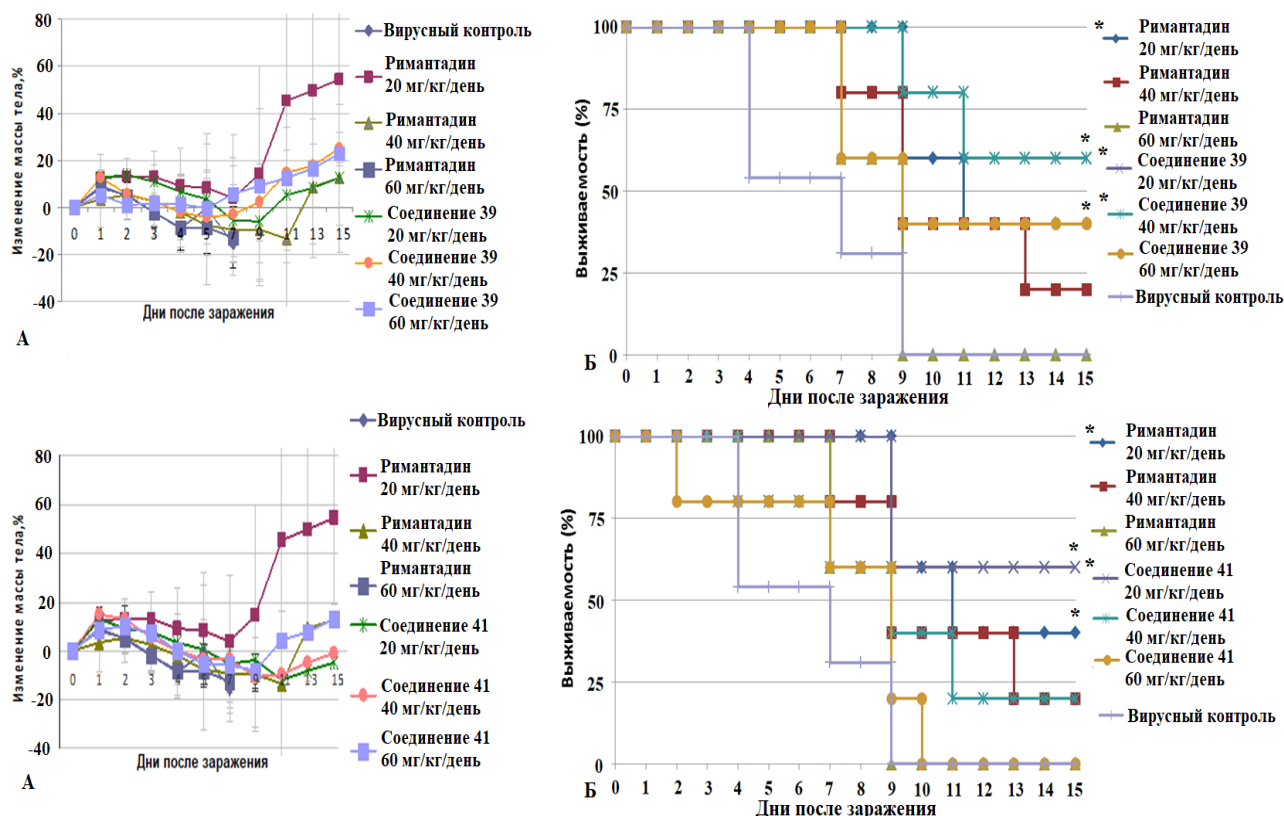
В первой серии экспериментов была изучена противовирусная активность соединений 1,3-оксазина-2-он и пиперидин-2,4-дион (далее соединения 39 и 41 соответственно) на культуре клеток MDCK в отношении римантадин-резистентных штаммов вирусов гриппа А, которые содержат мутацию S31N, ответственную за резистентность к римантадину/амантадину. Оба соединения эффективно подавляли размножение вируса, показав высокую ингибирующую активность (Таблица 1).

Таблица 1 – Значения ИК₅₀ для аналогов римантадина в отношении вируса гриппа А в культуре клеток MDCK

Штамм вируса	ИК ₅₀ (ингибирующая концентрация), мкМ		ЦТД ₅₀ , мкМ
	А/Калифорния/04/2009(H1N1) pdm09 (S31N)	А/IV–Оренбург/29–L/2016(H1N1) pdm16(S31N)	
Соединение 39	8,1±0,6	7,7±0,4	80
Соединение 41	20,6±0,9	27,1±1,5	80
Римантадин	*Н/А	Н/А	>100
Примечание: *Н/А - нет активности			

Эффективность исследуемых соединений аналогов римантадина на модели вирусной пневмонии мышей

Животные получали соединение 39, 41, а также римантадин в дозах 20, 40 и 60 мг/кг/день. В контрольной группе животных, зараженных вирусом в дозе $10^{4,5}$ ТЦИД₅₀/0,1мл гриппа и не получавшей никакого лечения, наблюдалась гибель, которая к 9 дню достигла 100%, а к 5 дню потеря массы тела достигла 18%. Лечение соединениями 39 в дозе 20 и 40 мг/кг/день было наиболее эффективно, снижая потерю массы тела (Рисунок 1) и защищая животных от гибели.

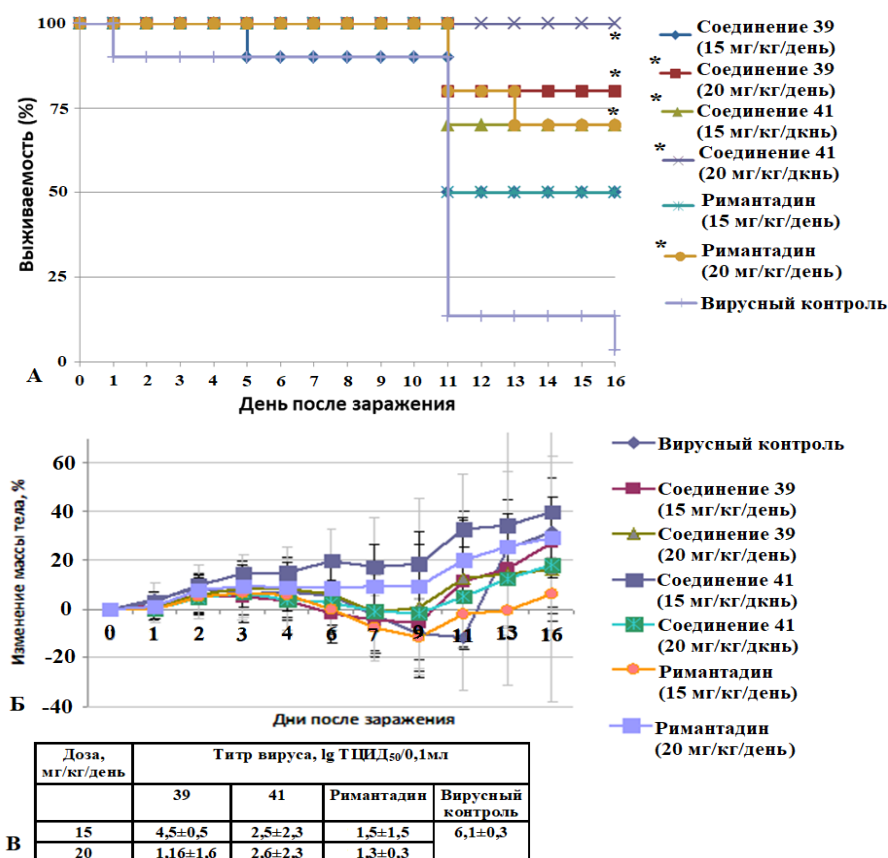


Примечание: Для групп лечёных римантадином и соединениями 39, 41; $n=5$, для вирусного контроля $n=10$, где n – количество мышей в каждой группе; $*p \leq 0,05$

Рисунок 1 – Изменение массы тела (А) и выживаемость (Б) мышей при лечении аналогами римантадина соединениями 39 и 41 на модели гриппозной пневмонии мышей

Во второй серии экспериментов была снижена доза вируса ($4,0 \lg$ ТЦИД₅₀) и выбраны следующие дозы препаратов: 15 и 20 мг/кг/день. В контрольной группе, заражённой вирусом гриппа без лечения, к 16 дню погибло 90% животных. Наиболее эффективно было лечение соединением 41 в дозе 20 мг/кг/день, соединением 39 и римантадином в дозе по 20 мг/кг/день. В группах с этим лечением масса тела мышей не снижалась. При этом наблюдалось достоверное снижение титра вируса в лёгких при лечении соединением 39 в дозе 20 мг/кг/день ($1,16 \pm 1,6 \lg$ ТЦИД₅₀ против $6,1 \pm 0,3 \lg$ ТЦИД₅₀ в контрольной группе), соединением 41 ($2,5 \pm 2,3 \lg$ и $2,6 \pm 2,3 \lg$ ТЦИД₅₀ против $6,1 \pm 0,3 \lg$ ТЦИД₅₀ в контрольной группе) и римантадина в обеих исследуемых дозах ($1,5 \pm 1,5 \lg$ и $1,3 \pm 0,3 \lg$ ТЦИД₅₀ против $6,1 \pm 0,3 \lg$

ТЦИД₅₀ в контрольной группе), что совпадало с улучшением выживаемости и сохранением массы тела (Рисунок 2).

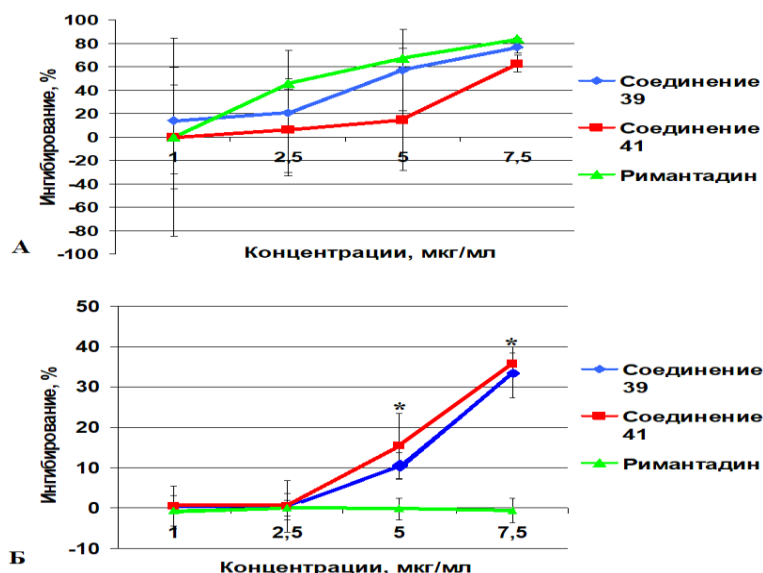


Примечание: Для групп лечёных римантадином и соединениями 39, 41 $n=5$, для вирусного контроля $n=10$, где n – количество мышей в каждой группе; снижение титра в среднем > 2 lg ТЦИД₅₀ рассматривается как достоверное отличие от контроля; $*p \leq 0,05$

Рисунок 2 – Изменение массы тела (А), выживаемость (Б) и титр вируса в лёгких (В) мышей при лечении аналогами римантадина соединениями 39 и 41 на модели гриппозной пневмонии мышей

Изучение возможности возникновения резистентности к аналогам римантадина на фоне их приема

В следующей серии экспериментов изучена возможность возникновения резистентности к соединениям 39 и 41 на фоне их приема. Вирусы выделяли из легких мышей на 4 день приема как обоих соединений, так и римантадина, и изучили их чувствительность к этим соединениям в культуре клеток. В качестве сравнения использовался вирус гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2), чувствительный к римантадину. Не обнаружено возникновения резистентности к соединениям 39 и 41 на фоне их приема, в отличие от римантадина (Рисунок 3).



Примечание: Линия показывает среднее значение \pm стандартное отклонение; $*p \leq 0,05$

Рисунок 3 – Противовирусная активность соединений 39, 41 и римантадина в культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) (А) и в отношении вирусов гриппа А/Калифорния/04/09(H1N1) pdm09, полученных из легких леченных животных и резистентных к римантадину (Б)

Таким образом, соединения 39 и 41 ((R)-изомеры (асимметрический центр при адамантильной группе) 1,3-оксазинан-2-он и пиперидин-2,4-дион соответственно), показали эффективность на культуре клеток и в животной модели. Это позволяет предположить, что наличие у новых энантимерно чистых молекул совместных адамантановых и пиперидиновых скелетов приводит к усилению противовирусной активности, что позволяет преодолеть резистентность к римантадину. Лечение ими в животной модели снижало гибель животных, потерю ими массу тела, а также подавляло размножение вируса гриппа А в лёгких животных.

Изучение цитотоксического действия аналогов умифеновира в культурах клеток

Цитотоксичность субстанции умифеновира и зашифрованного умифеновира (12026163) совпадала и была примерно сходной для всех изученных линий клеток. Цитотоксичность соединений 12026078 и 12026081 в клетках MDCK и HEp-2 была сходна с таковой для умифеновира, однако в клетках Vero CCL81 и Vero E6 они были менее токсичны, чем умифеновир. Наименее токсичны были соединения 12026079 и 12026084, которые в клетках MDCK и Vero E6 показали низкую токсичность (Таблица 3).

Таблица 3 – Цитотоксичность аналогов умифеновира в различных культурах клеток

Вещества	Культуры клеток, ЦТД ₅₀ , мкг/мл			
	MDCK	Vero CCL81	HEp-2	Vero E6
умифеновир	32,7 \pm 4,7	40,06 \pm 0,15	39,28 \pm 0,43	31,6 \pm 0,3
11926011	*14,7 \pm 2,9	**н/и	н/и	н/и
11926007	*14,4 \pm 2,0	н/и	н/и	н/и
11826301	*15,01 \pm 1,3	н/и	н/и	н/и
11826411	*40,5 \pm 3,6	н/и	н/и	н/и

Продолжение Таблицы 3

Вещества	Культуры клеток, ЦТД ₅₀ , мкг/мл			
	MDCK	Vero CCL81	HEp-2	Vero E6
умифеновир	32,7±4,7	40,06±0,15	39,28±0,43	31,6±0,3
11927001	*5,4±0,7	н/и	н/и	н/и
12026163	30,02±0,11	41,29±0,29	38,47±0,43	32,92±0,09
12026078	40,71±0,03	*59,67±0,22	*32,11±0,65	*70,14±0,14
12026079	*>100	*36,89±0,22	*30,20±0,34	*>100
12026081	31,12±0,09	*45,74±0,11	*37,12±0,54	*>100
12026084	*>100	*28,47±0,45	*77,65±0,93	*99,10±0,33
Примечание: *p≤0,05; **н/и – не исследовали				

Изучение противовирусной активности аналогов умифеновира в культуре клеток MDCK в отношении вирусов гриппа А и В методом ИФА

Практически все соединения специфически ингибировали репродукцию вируса гриппа А, ингибирование увеличивалось пропорционально с увеличением их концентрации и были сравнимы по активности с умифеновиром. При изучении противовирусной активности в отношении вируса гриппа В соединения 12026078 и 12026079 практически полностью подавляли размножение вируса в культуре клеток (Таблица 4).

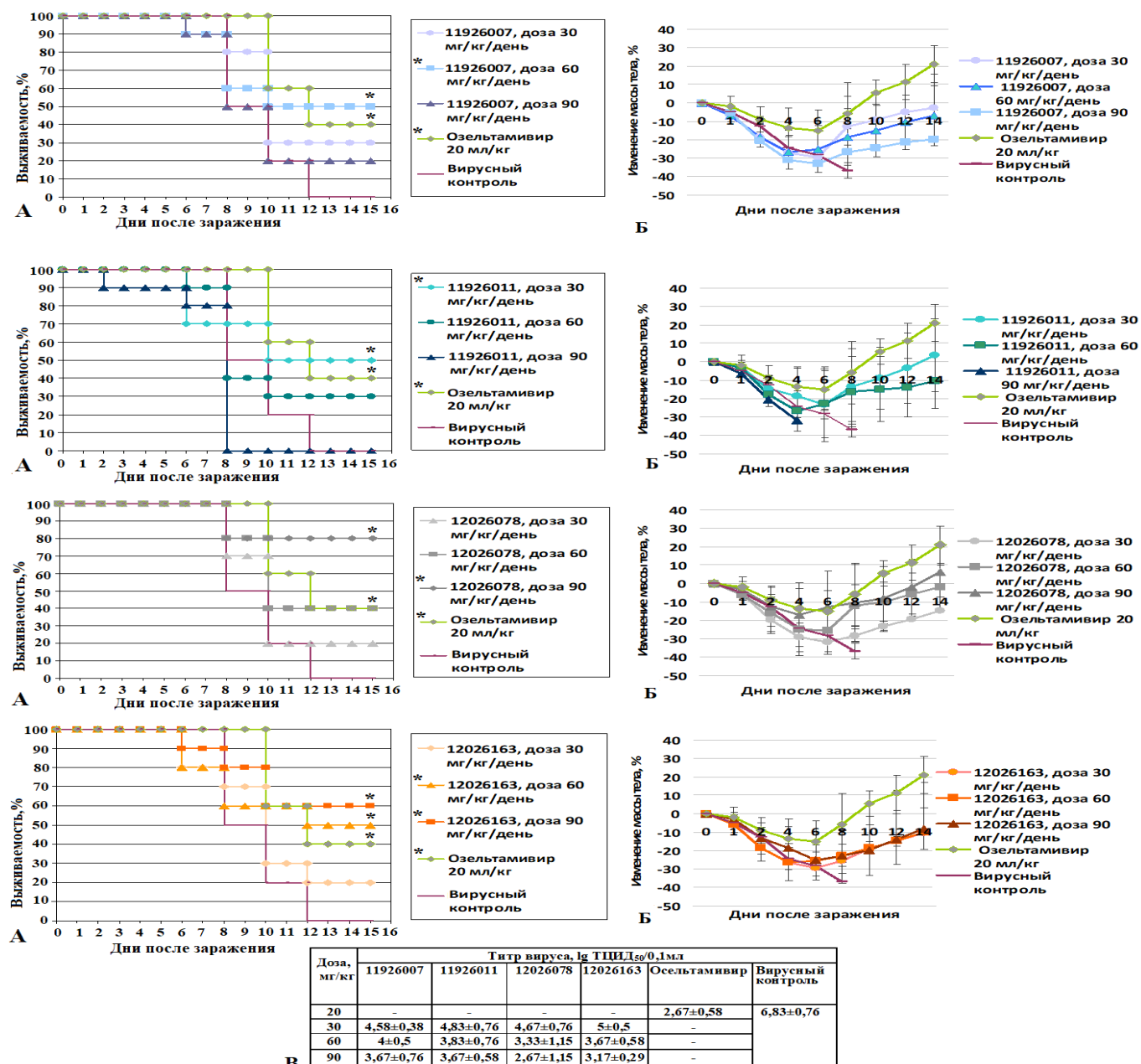
Таблица 4 – Значения ИК₅₀ и ЦТД₅₀ для умифеновира и его аналогов в отношении вируса гриппа А и В в культуре клеток MDCK

Соединения	А/Калифорния/04/09 (пндм H1N1)					
	Умифеновир	11826301	11826411	11926007	11926011	11927001
ИК ₅₀ **, мкг/мл	7,1±0,31	*10±0,24	*18±0,20	4±0,27	4,6±0,33	7,8±0,29
ЦТД ₅₀ ***, мкг/мл	32,7±4,7	*15,01±1,3	*40,5±3,6	*14,4±0,7	*14,7±2,9	*5,4±2,0
ИС****	4,3	1,5	2,25	3,6	3,1	0,69
Соединения	В/Вашингтон/02/2019 (линия Виктория)					
	Умифеновир	12026163	12026078	12026079	12026081	12026084
ИК ₅₀ **, мкг/мл	16,3±0,4	16,1±0,66	*8,89±0,46	*14,62±0,43	*25,55±0,82	*6,83±0,6
ЦТД ₅₀ ***, мкг/мл	32,7±4,7	30,02±0,11	40,71±0,03	*>100	31,12±0,09	*>100
ИС****	1,8	1,86	4,57	>6,8	1,21	>100
Примечания: *p≤0,05; **ИК ₅₀ – ингибирующая концентрация 50; ***ЦТД ₅₀ – цитотоксическая доза 50; ****ИС – индекс селективности, определялся как отношение ЦТД ₅₀ к ИК ₅₀						

Эффективность аналогов умифеновира на модели гриппозной пневмонии мышей, индуцированной вирусом гриппа штамма А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09

В первой серии экспериментов были изучены соединения 11926007, 11926011, 12026078, 12026163 в дозах 30, 60 и 90 мг/кг/день, препараты вводились перорально. В группе

вирусного контроля к 12 дню погибли все мыши, наблюдалась высокая потеря массы тела. Титр вируса в легких на 4 день составлял $6,83 \pm 0,76 \lg \text{ТЦИД}_{50}/0,1 \text{ мл}$, что обуславливало гибель животных от вирусной пневмонии. Наиболее эффективно было соединение 12026078 в дозе 90 мг/кг/день, защищая от гибели 80% животных, снижая потерю массы тела, а также уменьшая титр вируса ($3,17 \pm 0,29 \lg \text{ТЦИД}_{50}/0,1 \text{ мл}$ против $6,83 \pm 0,76 \lg \text{ТЦИД}_{50}/0,1$ в контрольной группе) (Рисунок 4).

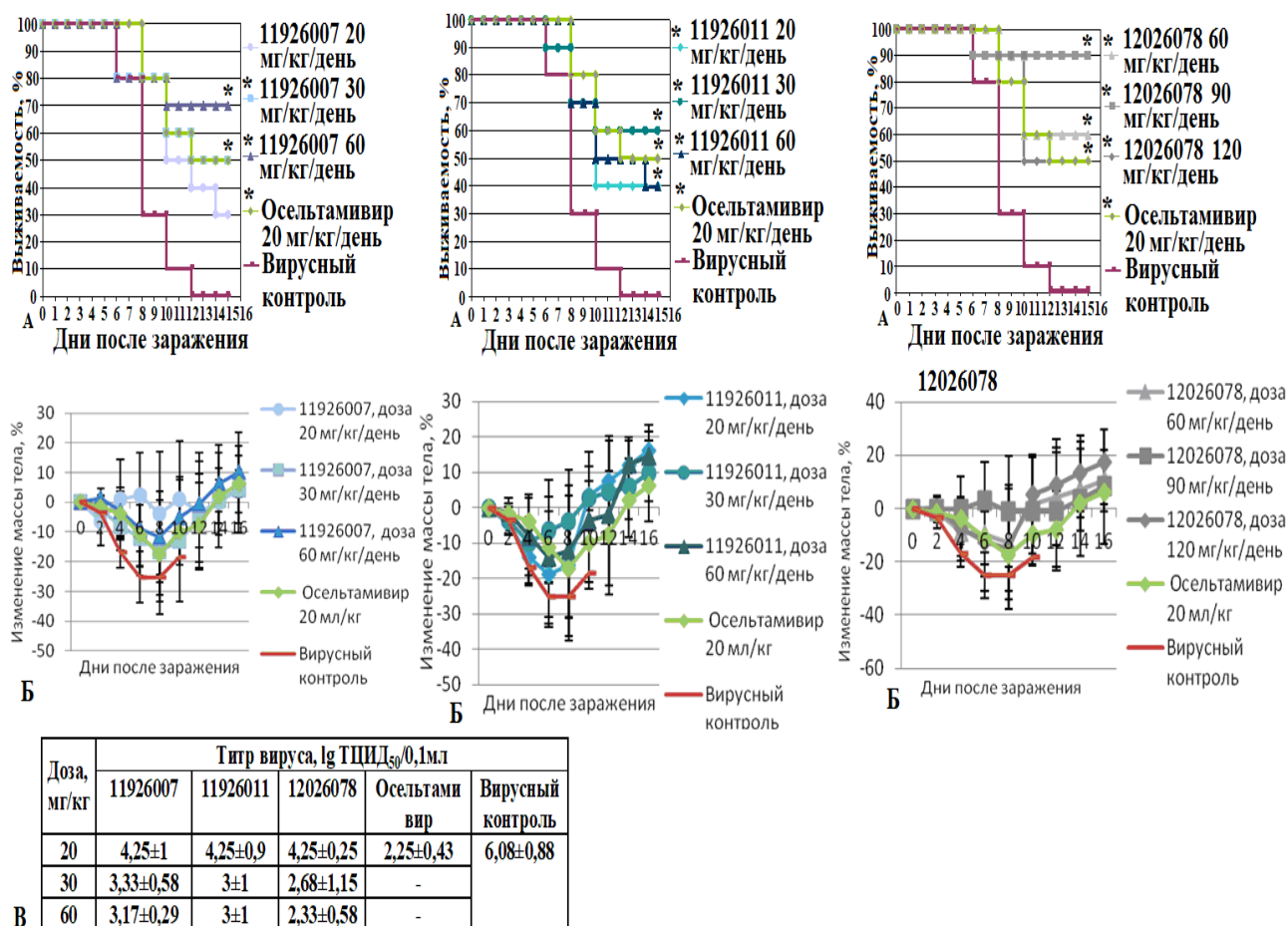


Примечание: Линия показывает среднее значение веса \pm стандартное отклонение; снижение титра в среднем $> 2 \lg \text{ТЦИД}_{50}$ рассматривается как достоверное отличие от контроля; $n=10$, где n – количество животных в каждой группе; $*p \leq 0,05$

Рисунок 4 –Выживаемость мышей (А), изменение массы тела мышей (Б) и титр вируса в лёгких (В) при лечении аналогами умифеновира (11926007, 11926011, 12026078, 12026163) при заражении вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09

Во второй серии экспериментов для уточнения активности соединений использовали меньшие дозы: для 11926007 и 11926011 — по 20, 30 и 60 мг/кг; для 12026078 — по 60, 90 и 120

мг/кг; сравнивали с осельтамивиром (20 мг/кг). В контрольной группе к дню 12 все животные погибли. Титр вируса в легких был около $6,08 \pm 0,88 \lg \text{ТЦИД}_{50}/0,1 \text{ мл}$. Как и в первом опыте, наиболее эффективным была соединение 12026078 в дозе 90 мг/кг/день, полностью предотвращая потерю массы тела животных, увеличивая продолжительность их жизни почти в 2 раза и значительно снижая размножение вируса в легких (примерно на 4 $\lg \text{ТЦИД}_{50}/0,1 \text{ мл}$) (Рисунок 5).



Примечание: Линия показывает среднее значение веса \pm стандартное отклонение; снижение титра в среднем $> 2 \lg \text{ТЦИД}_{50}$ рассматривается как достоверное отличие от контроля; $n=10$, где n – количество животных в каждой группе; $*p \leq 0,05$

Рисунок 5 – Выживаемость мышей (А), изменение массы тела мышей (Б) и титр вируса в лёгких (В) при лечении аналогами умифеновира (11926007, 12026078, 11926011) при заражении вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09

Таким образом, полученные данные по изучению производных бензотиофена с различными по свойствам заместителями, позволяют предположить, что наличие бензиламинного фрагмента во втором положении усиливает противовирусную активность соединений. При этом наличие в молекуле 12026078 диметиламинометилового заместителя предположительно улучшает биодоступность соединения по сравнению с умифеновиром.

Изучение противовирусной активности аналогов балоксавира в культуре клеток MDCK в отношении вирусов гриппа А методом ИФА

Были изучены аналоги балокавира, в качестве препарата сравнения во всех опытах был использован балокавир. Все изученные соединения ингибировали вирусную репродукцию, причем ингибирующий эффект соединений увеличивался с увеличением их концентраций. Наиболее активным в отношении всех изученных вирусов гриппа, включая осельтамивир резистентный вирус гриппа А/Перт/265/2009(H1N1), было соединение 5116, которое по своей активности было сравнимо с балокавиром. Кроме того, значения ИК₅₀ 5116 для вируса гриппа подтипа H3N2 А/Аичи/2/69 (H3N2) были во всех опытах ниже, чем в отношении изученных вирусов H1N1 (Таблица 5).

Таблица 5 – Значения ИК₅₀ для аналогов балокавира в отношении вирусов гриппа А различных подтипов в культуре клеток MDCK

Соединения	ИК ₅₀ (ингибирующая концентрация, нМ)				Цитотоксичность (ЦТД ₅₀ , мкмоль)
	А/Калифорния/04/09 (H1N1) pdm09	А/Пуэрто-Рико/8/34(H1N1)	А/Перт/265/2009 (H1N1) (H275Y)	А/Аичи/2/69 (H3N2)	
5106	*>100	*>100	*>100	*19,25±3,3	*12,1±1,3
5115	*>100	**н/с	н/с	*>100	*12,1±2,4
5116	16,4±2,1	*13,8±1,4	4,06±0,37	0,83±0,38	*15,9±2,8
5117	*> 100	*45±26	*>100	*13,59±7,4	*16,4±4,4
Балокавир	12,45±1,4	2,6±1,3	5,045±0,36	0,775±0,03	30±11,2
Примечание: *p≤0,05; **Не исследовано					

Изучение противовирусной активности аналогов балокавира в культуре клеток MDCK в отношении вирусов гриппа В методом ИФА

Все соединения, включая соединение 5115, обладающее противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа А, были эффективны в отношении вирусов гриппа В/Висконсин/1/2010 (Ямагатская линия), клинических изолятов вирусов гриппа В В/Москва/3/19 и В/Грозный/6/19 (линия Виктория). При этом, противовирусная активность изученных соединений, была сходна с противовирусной активностью синтезированного балокавира (соединение 5106) (Таблица 6).

Таблица 6 – Значения ИК₅₀ для аналогов балокавира в отношении вирусов гриппа В различных линий в культуре клеток MDCK

Соединения/ вирусы	ИК ₅₀ (ингибирующая концентрация, нМ)		
	В/Висконсин/1/2010	В/Москва /3/19	В/Грозный/6/19
5106	9,5±0,36	>100	9,25±0,4
5115	7±0,39	1±0,4	0,75±0,39
5116	5,5±0,35	7,5±0,3	7±0,4
Балокавир	5±1,5	>100	11±1,4

Таким образом, проведённое изучение противовирусной активности соединений, показало, что изученные аналоги балокавира обладают противовирусной активностью в культуре клеток MDCK в отношении вирусов гриппа А подтипа H1N1, H1N1 pdm09 и H3N2, в отношении осельтамивир-резистентного вируса гриппа А, а также в отношении вирусов гриппа В. При этом можно выделить соединение 5116, как обладающее выраженной дозозависимой противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа А и вирусов гриппа В, в целом не

меньшей, чем препарат сравнения балоксавир. Важно отметить, что цитотоксичность соединений значительно выше, чем ингибирующая концентрация, и находится в диапазоне микромолярных концентраций.

Изучение противовирусной активности аналогов балоксавира в культуре клеток MDCK в отношении балоксавир-резистентных вирусов гриппа А

Кроме того, совместно с ИИХР, было изучено ингибирование активного метаболита 5116 и балоксавира в отношении балоксавир-резистентных вирусов гриппа. Ингибирующая активность 5116 была сопоставима с ингибирующей активностью балоксавира для восприимчивых к балоксавиру вирусов гриппа А (H1N1)pdm09 и А(H3N2) I38-WT. Метаболит 5116 был также активен в отношении балоксавир-резистентных вирусов гриппа А и проявлял большую активность в отношении вирусов, несущих мутацию I38T, чем балоксавир. (Таблица 7).

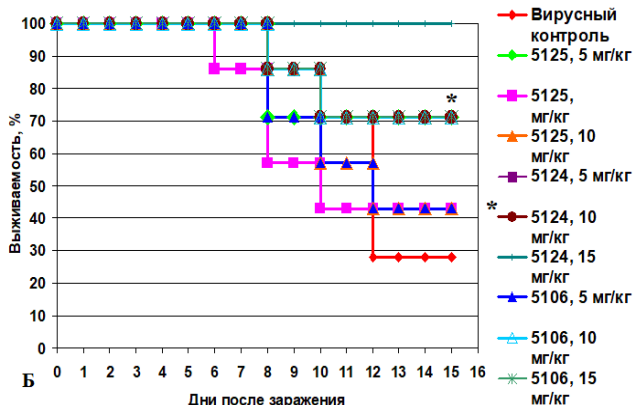
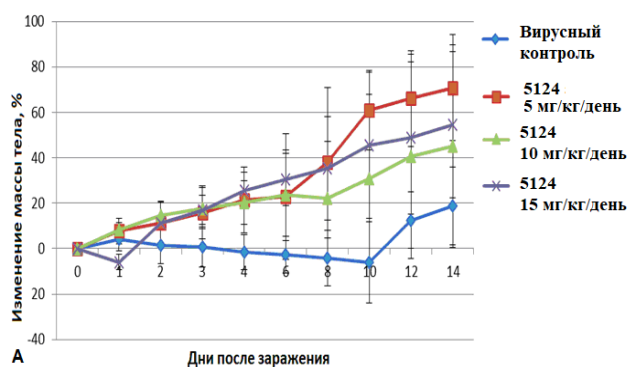
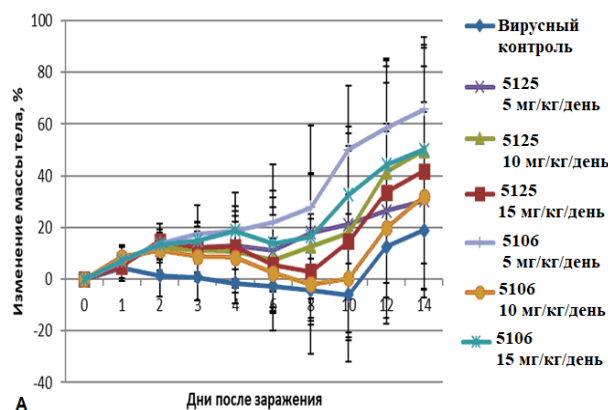
Таблица 7 – Значения ИК₅₀ для аналогов балоксавира в отношении вирусов гриппа А резистентных к балоксавиру

Вирусы	Мутация	ИК ₅₀ (ингибирующая концентрация, нМ)	
		5116	балоксавир
А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09	I38-WT (*ч)	1,8±0,1	1,4±0,3
	I38T (**р)	74,8±31,0	212,2±34,3
	I38M (р)	33,8±1,5	32,5±0,2
А/Техас/71/2017 (H3N2)	I38-WT (ч)	2,2±0,2	1,8±0,5
	I38T (р)	51,8±10,2	96,3±31,3
	I38M (р)	19,9±2,5	20,5±4,5
Примечания: *чувствителен к балоксавиру; **резистентен к балоксавиру			

Эффективность аналогов балоксавира на модели гриппозной пневмонии мышей, индуцированной А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09

В первом опыте животных заражали в дозе 104,5 ТЦИД₅₀/0,1мл. Животные получали соединение 5106, 5124 и 5125 в дозах 5, 15 и 50 мг/кг. В группе вирусного контроля погибло 72% животных. Заражение вирусом также вызывало значительную потерю массы тела мышей до 23% у отдельных животных, 6% в среднем по группе к 10 дню исследования. Титр вируса из легких животных контрольной группы через 24 часа после заражения вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09 превышал 6,0 lg ТЦИД₅₀/0,1мл, что обуславливало гибель животных от вирусной пневмонии.

Лечение всеми предоставленными образцами в используемой модели зависело от дозы препарата. Соединения 5106, 5124 и 5125 в дозе 50 мг/кг 2 раза в день снижали смертность, потерю массы тела и размножение вируса в легких животных, а также увеличивали продолжительность их жизни. При этом, наиболее эффективным было лечение соединением 5124, которое в дозах 5 и 15 мг/кг снижало смертность животных и титр вируса в их легких, увеличивая среднюю продолжительность жизни, а в дозе 50 мг/кг полностью предотвращало гибель животных, потерю ими массы тела и размножение вируса в легких (Рисунок 6).



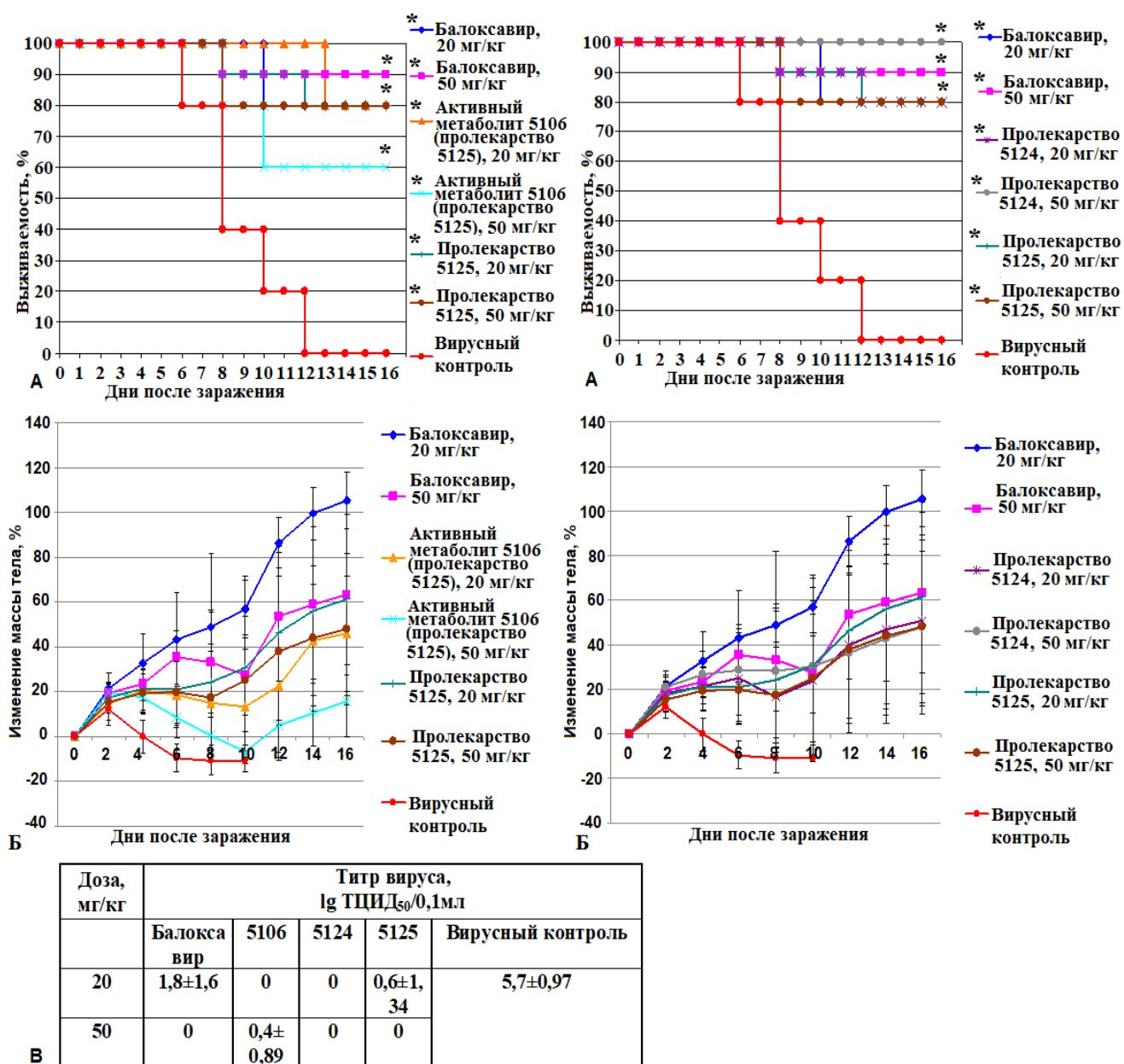
Доза, мг/кг	Титр вируса, lg ТЦИД ₅₀ /0,1мл	
	Соединение 5125	
5	5±1,22	
10	3,8±1,3	
15	3,8±0,8	
Соединение 5124		
5	4±0,71	
10	1,8±1,48	
15	0,8±1,09	
Соединение 5106		
5	5±0,71	
10	3,9±2,01	
15	3,8±0,45	
Вирусный контроль		
	>6	

Примечание: Линия показывает среднее значение веса \pm стандартное отклонение; снижение титра в среднем > 2 lg ТЦИД₅₀ рассматривается как достоверное отличие от контроля; $n=7$, где n – количество животных в каждой группе; $*p \leq 0,05$

Рисунок 6 – Изменение массы тела мышей (А) изменение массы тела мышей (Б) и титр вируса в лёгких (В) при лечении аналогами балоксавира, 5125, 5124 и 5106, при заражении высокой дозой вируса гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09 и при лечении аналогом балоксавира при заражении высокой дозой вируса гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09

Во втором опыте животных заражали в дозе 10^4 ТЦИД₅₀/0,1мл. Животные получали соединение 5106, 5124 и 5125 в дозах 20 и 50 мг/кг. В группе вирусного контроля к 12 дню наблюдения погибли все мыши, также наблюдалась значительная потеря массы тела (около 25%). Титр вируса в легких контрольной группы составлял $5,7 \pm 0,97$ lg ТЦИД₅₀/0,1 мл.

Все соединения в дозах 20 и 50 мг/кг 2 раза в день были высокоэффективны, достоверно увеличивая выживаемость животных, среднюю продолжительность жизни, практически полностью предотвращая потерю ими массы тела и значительно подавляя размножение вируса в легких. Наиболее эффективным было лечение соединением 5124 в дозе 50 мг/кг, которое полностью предотвращало гибель животных, потерю ими массы тела, и размножение вируса в легких (Рисунок 7).



Примечание: Линия показывает среднее значение веса \pm стандартное отклонение; снижение титра в среднем > 2 lg ТЦИД₅₀ рассматривается как достоверное отличие от контроля; $n=10$, где n – количество животных в каждой группе; $*p \leq 0,05$

Рисунок 7 – Выживаемость мышей (А), изменение массы тела мышей (Б) и титр вируса (В) при лечении соединениями 5106, 5124, 5125 (аналоги балоксавира) при заражении высокой дозой вируса гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09.

Полученные данные позволяют предположить, что изученные аналоги балоксавира будут эффективны против балоксавир-резистентных вирусов гриппа при дальнейшем изучении. Аналоги балоксавира также были эффективны на модели летальной гриппозной инфекции мышей, при этом соединение 5124 было самым высокоэффективным, полностью подавляя размножение вируса в лёгких и обеспечивая практически полную защиту от смертности у животных. Данное соединение является возможным кандидатом для дальнейшего доклинического и клинического изучения.

ВЫВОДЫ

1. Аналоги римантадина 39 и 41 подавляли размножение в культуре клеток MDCK вирусов гриппа А с мутацией S31N, резистентных к римантадину. Они были эффективны на животной модели гриппозной инфекции, обеспечивая выживаемость 60-100% животных, снижая потерю ими массы тела, титр вируса в лёгких ($4,5 \pm 0,5$, $1,16 \pm 1,6$ VS $6,1 \pm 0,3$ lg ТЦИД₅₀/0.1 мл) и увеличивая продолжительность жизни по сравнению с контрольной группой нелеченных животных.

2. Изучение вирусов, выделенных из легких мышей, зараженных римантадин-резистентным вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09, показало отсутствие формирования резистентности к аналогам римантадина, соединениям 39 и 41 на фоне 5-дневного курса лечения ими.

3. Среди 10 аналогов умифеновира выявлены соединения 11926007, 11926011, 12026078, 12026163, обладающие в культурах клеток наименьшей цитотоксичностью и наиболее высокой активностью в отношении вирусов гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09 и В/Вашингтон/02/2019.

4. Аналоги умифеновира 12026078 и 11926007 были эффективны у мышей, инфицированных вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09, увеличивая выживаемость животных и снижая потерю массы тела. Наиболее эффективным было лечение соединением 12026078 в дозах 60 и 90 мг/кг/день, защищая от гибели 60-90% животных, которое было сравнимо с лечением умифеновиром в таких же дозах и превосходило лечение осельтамивиром в дозе 20 мг/кг/день.

5. В культуре клеток MDCK показана противовирусная активность аналогов балоксавира 5106 и 5116 в отношении широко спектра вирусов гриппа А различных подтипов (H1N1, H3N2), включая осельтамивир-резистентный вирус гриппа А, а также вирусов гриппа В линии Ямагата и Виктория.

6. Аналоги балоксавира 5106 и его пролекарство 5125, а также 5124, являющееся пролекарством 5116, были эффективны у мышей при заражении вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09. Двухкратное лечение ими в дозе 50 мг/кг полностью защищало животных от гибели, предотвращало потерю их массы тела и размножение вируса в лёгких животных ($0,4 \pm 0,89$ -0 VS $5,7 \pm 0,97$ lg ТЦИД₅₀/0.1 мл).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Synthesis, inhibitory activity and oral dosing formulation of AV5124, the structural analogue of influenza virus endonuclease inhibitor baloxavir / Ivashchenko A.A., Mitkin O.D., Jones J.C., Glubokova E.A. [et al] // **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. – 2021. – Т.76, № 4. – P.1010-1018. [Scopus, PubMed]

2. Efficacy of (R)-6-Adamantane-Derivatives of 1,3-Oxazinan-2-One and Piperidine-2,4-Dione in The Treatment of Mice Infected by the A/California/04/2009 influenza / **Glubokova E.A.**, Leneva

I.A., Kartashova N.P., [et al] // **Acta Naturae**. – 2021. – Т.13, № 2. – P.116-125. [Scopus, PubMed, WoS]

3. Non-rigid Diarylmethyl Analogs of Baloxavir as Cap-Dependent Endonuclease Inhibitors of Influenza / Ivashchenko A.A., Mitkin O.D., Jones J.C., **Глубокова Е.А.** [et al] // **Journal of Medicinal Chemistry**. – 2020. – Т.63, №17. – P.9403-9420. [Scopus, PubMed]

4. Изучение эффективности аналогов Балоксавира на модели летальной гриппозной инфекции мышей / **Глубокова Е.А.**, Ленева И.А., Фалынскова И.Н. [и др.] // **New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology**. Сборник тезисов молодых ученых в рамках международной конференции, посвященной 300-летию РАН / Под редакцией В.В. Зверева. – Москва: Издательство "Перо", 2021. – С.10

5. Оценка эффективности стереоизомеров адамантилпроизводных пиперидина на модели экспериментальной гриппозной пневмонии мышей / **Глубокова Е.А.**, Карташова Н.П., Махмудова Н.Р. [и др.] // **New Approaches in the Field of Microbiology, Virology and Immunology**. Сборник тезисов молодых ученых в рамках международных студенческих школ Сеченовского Университета / Под редакцией В.В. Зверева. – Москва: Издательство "Перо", 2020. – С. 11

6. Новые производные римантадина ингибируют инфекцию, вызванную вирусом гриппа H1N1 на модели гриппозной пневмонии мышей / **Глубокова Е.А.**, Махмудова Н.Р., Фалынскова И.Н. [и др.] // **Биология – наука XXI века**. Сборник тезисов 24-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых – Пущино: Синхробук, 2020. – С.179

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

HEp-2 – линия клеток, полученных из эпителиальной ткани человека

HPMC – Гидроксипропилметилцеллюлоза (hydroxypropil methylcellulose)

MDCK – Клетки почек собаки Мадина-Дарби

pdm09 – пандемический 2009 года

pdm16 – пандемический 2016 года

SD – стандартное отклонение

Vero CCL81, Vero E6 – клетки эпителия почки африканской зелёной мартышки

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМЕМ – модифицированная по методу Дульбекко минимальная среда Игла

ИИХР – Исследовательский Институт Химического Разнообразия

ИФА – иммуноферментный анализ

ИК₅₀ – ингибирующая концентрация 50

МТТ – колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток

МЕМ – минимальная среда Игла

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция

ОП – оптическая плотность

ТЦИД₅₀ – тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя

ЦТД – цитотоксическая доза

ЦПД – цитопатическое действие