

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ВАКЦИН И СЫВОРОТОК ИМ. И.И. МЕЧНИКОВА»

*На правах рукописи*



Глубокова Екатерина Андреевна

**Поиск новых активных противовирусных  
соединений среди аналогов противогриппозных  
химиопрепаратов прямого вирусспецифического  
действия**

1.5.10. Вирусология

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**  
доктор биологических наук,  
Ленева Ирина Анатольевна

Москва – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	16
1.1. Вирус гриппа: характеристика, строение, размножение, его патогенез и осложнения после заболеваний .....	16
1.2. Этиотропные (прямого противовирусного действия) препараты: механизм действия, эффективность, широта спектра действия, побочные эффекты, преимущества и недостатки .....	26
1.2.1. Блокаторы М-2 каналов .....	26
1.2.2. Ингибиторы нейраминидазы.....	29
1.2.3. Ингибитор фузии.....	36
1.2.4. Ингибиторы кэп-зависимой эндонуклеазы и РНК-зависимой РНК-полимеразы .....	39
1.3. Заключение по обзору литературы.....	44
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	45
2.1. Материалы.....	45
2.2. Препараты, субстанции и их разведения .....	46
2.3. Вирусы и клеточные линии .....	52
2.4. Этические принципы работы с животными .....	53
2.5. Определение цитотоксического действия препаратов и субстанций в культуре клеток.....	54
2.6. Изучение противовирусной активности в отношении вирусов гриппа методом иммуноферментного анализа (ИФА) .....	55
2.7. Инфицирование вирусом в животной модели .....	57
2.7.1.1. Дизайн исследования и экспериментальные группы для аналогов римантадина.....	57
2.7.1.2. Дизайн исследования и экспериментальные группы для аналогов умифеновира .....	58

2.7.1.3. Дизайн исследования и экспериментальные группы для аналогов балоксавира.....	58
2.7.2. Клиническое наблюдение и оценка массы животных.....	59
2.7.3. Получение образцов легких мышей для изучения и определение вирусного титра.....	60
2.8. Анализ данных.....	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	62
3.1. Противовирусная активности и эффективность для аналогов римантадина...	62
3.1.1. Изучение противовирусной активности аналогов римантадина в культуре клеток MDCK в отношении вирусов гриппа А методом иммуноферментного анализа (ИФА) .....	63
3.1.2. Эффективность исследуемых соединений аналогов римантадина на модели вирусной пневмонии мышей.....	64
3.1.2. Изучение возможности возникновения резистентности к аналогам римантадина соединениям 39 и 41 на фоне их приема .....	71
3.2. Противовирусная активность и эффективность для аналогов умифеновира ..	73
3.2.1. Изучение цитотоксического действия аналогов умифеновира в культурах клеток.....	74
3.2.2. Изучение противовирусной активности аналогов умифеновира в культуре клеток MDCK в отношении вирусов гриппа А методом иммуноферментного анализа (ИФА) .....	77
3.2.3. Изучение противовирусной активности аналогов умифеновира в культуре клеток MDCK в отношении вирусов гриппа В методом иммуноферментного анализа.....	79
3.2.3. Эффективность аналогов умифеновира на модели гриппозной пневмонии мышей, индуцированной вирусом гриппа штамма А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09.....	81
3.3. Противовирусная активность и эффективность для аналогов балоксавира против вируса гриппа А.....	91

3.3.1. Изучение противовирусной активности аналогов балоксавира в культуре клеток MDCK в отношении вирусов гриппа А и В методом иммуноферментного анализа (ИФА) .....	92
3.3.2. Изучение противовирусной активности аналогов балоксавира в культуре клеток MDCK в отношении балоксавир резистентных вирусов гриппа А.....	96
3.3.3. Эффективность аналогов балоксавира на модели гриппозной пневмонии мышей, индуцированной А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09.....	97
3.4. Обсуждение результатов .....	107
ВЫВОДЫ .....	124
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	126
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	128

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **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 противовирусные химиопрепараты. Поэтому ВОЗ вместе с вакцинацией рекомендует использование этиотропных противовирусных 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, ланинамивир), 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 выявляются в клинической практике или экспериментально. Наиболее часто резистентные вирусы 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. Ремантадин в настоящее время не используют для лечения и профилактики вируса гриппа из-за высокой резистентности циркулирующих штаммов. Однако, резистентность к ремантадину 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 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 поможет 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 применяемых 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. Разработка и синтез химических соединений выполнен в институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, фармацевтической компании АО «Отисифарм», российском Исследовательском Институте Химического Разнообразия.

### **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 целями и задачами 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 Пуцинской 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 работы, 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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Вирус гриппа: характеристика, строение, размножение, его патогенез и осложнения после заболеваний

Грипп – опасное высококонтагиозное респираторное заболевание, отличающееся широким распространением по всему миру. Данный вирус может инфицировать как людей, так и свиней, крупный рогатый скот, птиц, а также других животных. Грипп вызывает регулярные сезонные эпидемии, непредсказуемые пандемии, а также частые и смертельные зоонозные вспышки по всему миру. Характерная для него сезонная циркуляция вносит серьёзный вклад в общую статистику заболевания населения (до 1 млрд случаев заболевания ежегодно, из которых от 3 до 5 миллионов считаются тяжелыми). При этом есть группы риска, для которых заболевание может протекать особенно тяжело. В эти группы входят дети, пожилые люди, а также лица с ослабленным иммунитетом и какими-либо сопутствующими хроническими заболеваниями [1].

Вирус гриппа относится к семейству *Orthomyxoviridae* и включает четыре рода вируса гриппа: А, В, С и D. Опасность для человека представляют вирусы гриппа А и В.

Вирус гриппа образует вирионы диаметром ~ 100 нм, а также нитевидные вирионы диаметром ~ 100 нм, но достигающие более 20 мкм в длину. Хотя некоторые лабораторные штаммы продуцируют исключительно сферические вирионы, считается, что при заражении человека *in vivo* образуются преимущественно нитевидные вирионы [2, 3].

**Строение.** Грипп А и грипп В содержат восемь сегментов одноцепочечной минус-РНК. При этом вирусы гриппа С и D содержат семь сегментов минус-РНК.

Стоит подчеркнуть, что вирус гриппа С не вызывает сильного заболевания у людей и чаще всего проходит незаметно. Вирус гриппа D не способен заразить человека [4].

Фрагменты генома покрыты специальным белком, образуя капсид, при этом каждый фрагмент кодирует информацию об одном-двух белках. Все фрагменты дополнительно покрыты ещё одной оболочкой из белка, образуя нуклеокапсид. Этот нуклеокапсид обладает спиральной типом симметрии.

Геном кодирует как структурные, так и неструктурные белки. К структурным белкам относятся нейраминидаза, гемагглютинин, белки мембраны (M1 и M2), нуклеопротеин (NP), а также белки полимеразного комплекса (транскриптаза, репликаза, эндонуклеаза) и минорный белок NEP. К неструктурным белкам относится белок NS1.

У вируса гриппа А есть структурные белки, связанные с суперкапсидом: гемагглютинин (HA), нейраминидаза (NA) и белок M2. Под суперкапсидом располагается матриксный белок M1. Рибонуклеопротеидное ядро, находящееся в центре вирусной частицы, состоит из восьми сегментов вирусной РНК, связанных с нуклеопротеином (NP), а также включает белки полимеразного комплекса и минорный белок. Вирус гриппа С отличается тем, что его геном состоит из 7 сегментов, поскольку оболочечный гликопротеин HEF (hemagglutinin-esterase-fusion) выполняет одновременно функции и NA, и HA [4, 5].

Вирус гриппа на поверхности своего суперкапсида имеет выросты в виде шипов, которые образованы гемагглютинином и нейраминидазой. Длина такого шипа около 10 нм и образуются они благодаря закреплению гидрофобных NA и HA концов в липидном бислое. При этом нейраминидаза образует значительно меньше шипов, чем гемагглютинин: всего 50-100 шипов из 550-600 шипов [5]. Схематичное строение вируса гриппа А представлено на Рисунке 1.

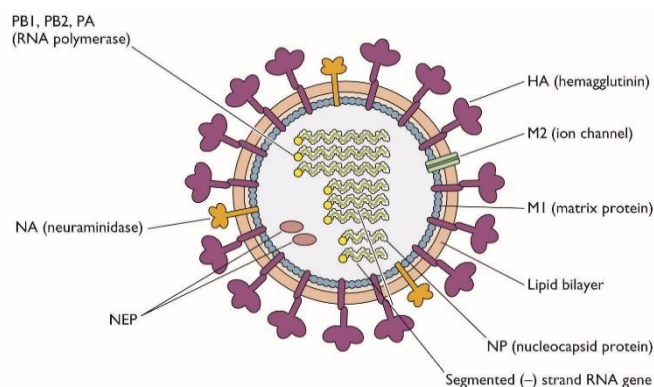


Рисунок 1 – Схема строения для вириона вируса гриппа [6]

Шип гемагглютинаина состоит из субъединиц и выглядит как тример. Каждая субъединица, в свою очередь, состоит из двух цепей: тяжёлой и лёгкой. Сам гемагглютинин взаимодействует с сиаловой кислотой, способствуя проникновения вируса в клетку при помощи слияния суперкапсида с клеточной мембраной и последующей депротеинизации вируса [4, 5].

Шип нейраминидазы состоит из 4 сферических субъединиц, которые прикреплены к заякоренной в суперкапсиде ножке. Нейраминидаза играет важную роль для достижения клеток-мишеней вируса гриппа, способствуя проникновению через секрет слизистых оболочек. Кроме того, она помогает высвобождению новых вирусных частиц из клетки, а также распознаёт рецепторы с сиаловой кислотой [4, 5].

Матриксный белок M1 располагается между суперкапсидом и рибонуклеопротеидом, заполняя пространство. Именно этот белок определяет форму самой вирусной частицы. Мембранный белок M2, который является тетрамером и встроен в липидную мембрану, формирует ионный канал, необходимый для транспортировки ионов  $H^+$  в вирусную частицу. Это необходимо для того, чтобы нуклеокапсид отделился от M1 [7]. Также на поздних стадиях инфекции ионный канал M2 поддерживает основной pH во время синтеза гемагглютинаина в аппарате Гольджи инфицированной клетки, предотвращая изменения конформации гемагглютинаина [8]. У белка M2 есть и другие важные функции, такие как упаковка вирионной РНК, в которой он принимает участие, и

отпочковывание вириона. Кроме того, этот белок играет важную роль для определения морфологии вируса [9].

Нуклеокапсид является геномом, который окружён капсидом – белковой оболочкой. Сам капсид включает в себя NP и белки полимеразного комплекса и содержит тридцать два капсомера.

Белки полимеразного комплекса взаимодействуют с фрагментами вирусной РНК и помогают в синтезе неклеиновой кислоты для дочерних вирионов. Например, белок PA расщепляет мРНК. Далее экспонированные фрагменты будут связываться с PB2 и использоваться для дальнейшего синтеза мРНК вируса.

Белок NEP участвует в транспорте вирусных рибонуклеопротеидов из клеточного ядра. Это делает его важным для дочерних вирионов.

**Жизненный цикл.** В жизненном цикле вируса гриппа выделяют несколько стадий: адсорбция вируса; проникновение вируса внутрь клетки и депротенинизация; синтез белков и репликация генома; формирование дочерних вирусных частиц; выход дочерних вирусных частиц из клетки.

Верхние дыхательные пути являются входными воротами для вирусов гриппа. Так, попав на слизистую оболочку, вирус проникает в реснитчатые и бокаловидные клетки, где происходит первичная репродукция вируса. Именно на мембране эпителиальных клеток происходит прикрепление вируса в результате взаимодействия гемагглютинаина вируса гриппа с рецептором для вируса гриппа - сиаловой кислотой, которая расположена на поверхности клетки. После этого образовавшийся комплекс «вирус-рецептор» поглощается путём эндоцитоза, и вирусные частицы перемещаются к ядру клетки внутри эндосомальных везикул. В процессе перемещения внутри везикулы снижается содержание ионов водорода, что приводит к понижению pH внутри неё. Это способствует слиянию суперкапсида вируса с мембраной эндосомы. В результате нуклеокапсид с М-белком выходит в цитоплазму клетки [4, 5, 10].

Далее нуклеокапсид с М-белком перемещаются к ядру клетки, где М-белок удаляется на ядерной оболочке. В результате активный нуклеокапсид проникает в ядро, и с помощью РНК-зависимой РНК-полимеразы начинается синтез на матрице

вирусной минус-РНК полных и неполных нитей плюс-РНК. РНК-зависимая РНК-полимераза - важнейший фермент, присутствующий в каждом вирионе; без него вирус становится неинфекционным и неспособным к размножению. Полные нити плюс-РНК служат матрицей для синтеза новых фрагментов минус-РНК, необходимых для образования дочерних вирионов, и выступают как шаблон для их синтеза внутри ядра. Неполные нити плюс-РНК необходимы для синтеза вирусных белков: они транспортируются к полирибосомам для трансляции [5, 10].

Белки капсида и минус-РНК формируют на границе ядерной мембраны нуклеокапсиды, а затем переходят в цитоплазму. Здесь они соединяются с белками полимеразного комплекса PA, PB1, PB2. Все вирусные белки, кроме НА, NA и М2, транслируются на свободных рибосомах для белка М1. Белок М1 прикрепляется к мембране, в которую встроены НА, NA и М2. Сюда же направляется и комплекс вирусных РНК и белков, после чего вирион формируется путем почкования, образуя свободную частицу [10].

Отпочковавшиеся новые вирионы должны были бы немедленно присоединиться к рецепторам, сиаловой кислоте, на поверхности уже инфицированной клетки. Однако этого не происходит вследствие их удаления с поверхности инфицированной клетки вирусным гликопротеином NA. Таким образом, вновь образовавшиеся вирионы свободно выходят из клетки [3].

**Изменчивость и эпидемиология.** Вирус гриппа А благодаря антигенному дрейфу и антигенному шифту очень изменчив и быстро мутирует. Для вируса гриппа В характерен только антигенный дрейф, что объясняет его более медленную изменчивость.

Антигенным дрейфом называют точечные мутации в тех частях генома, которые ответственны за синтез и за структуру антигенных детерминант гемагглютиниона и нейраминидазы. Таким образом, появляются новые варианты, которые слабо отличаются от исходного штамма вируса гриппа. Эти новые варианты штамма остаются внутри одного подтипа, однако способны вызывать периодические эпидемии гриппа из-за того, что ранее выработанный иммунитет

обеспечивает лишь частичную защиту от заболевания из-за изменений в структуре поверхностных антигенов [2].

Антигенным шифтом называют замену целого гена, который кодирует гемагглютинин или нейраминидазу подтипа вируса гриппа. Такой процесс возможен благодаря генетической реассортации между генами двух или более различных штаммов вируса гриппа, заражающих одну и ту же клетку хозяина. В результате такого заражения в ядро клетки копируется РНК двух (или более) типов вируса. Таким образом, при сборке новых вирионов используются сегменты РНК обоих типов вируса. Это приводит к появлению реассортантов - вирусов, наследующих сегменты РНК от разных исходных вирусов. Поскольку у таких вирусов полностью меняется антигенная структура и формируется новый подтип, они способны вызывать глобальные пандемии. Предполагается, что источниками новых подтипов могут быть вирусы гриппа птиц и животных [2].

Хорошо известно, что вирусы гриппа А и В являются наиболее вирулентными и были ответственны за многочисленные пандемии во всем мире. Однако именно вирус гриппа А благодаря антигенному шифту вызвал наибольшее количество эпидемий в течение XX века, включая испанский грипп 1918-1920 годов, который был вызван подтипом H1N1 и унёс около 50 миллионов жизней. В 1957-1958 годах произошла эпидемия азиатского гриппа, вызванная подтипом H2N2, и унесла от 1 до 4 миллионов жизней по всему миру [11]. В 1968-1970 годах произошла эпидемия гонконгского гриппа, вызванная вирусом гриппа А H3N2. В результате заболевания по всему миру заразилось около 500 миллионов человек, из которых умерло примерно 1-2 миллиона [11].

Пандемия «русского гриппа» в 1977-1978 годах была вызвана вирусом H1N1. Данный вирус тесно связан со штаммом, который вызвал пандемию в 1950 году и вызывал заболевание в основном у людей, родившихся после 1950 года, поскольку пожилое население имело защитный иммунитет, возникший в результате предыдущего опыта контакта со штаммами H1N1. Эта пандемия привела к смерти около 700 тысяч человек [12].

В период ещё одной крупной пандемии 2009-2010 годов, вызванной вирусом гриппа А H1N1 [13], заболели более 1,5 млн. человек в более чем 210 странах, количество летальных случаев от лабораторно подтвержденного пандемического гриппа в мире составило более 17.4 тысяч [14], всего умерло около 500 тысяч человек [12].

В настоящий момент в человеческой популяции наиболее распространены штаммы A(H1N1)pdm09 и A(H3N2), а также вирус гриппа В, в основном принадлежащих к линии В/Виктория [15] и реже к линии В/Ямагата. Встречаются данные, что циркуляция вируса гриппа В линии Ямагата не подтверждена с марта 2020 года [16]. Ежегодно вирус гриппа А приводит к смерти от 290 000 до 650 000 человек по всему миру [17].

На данный момент есть три основных подтипа птичьего гриппа, H5, H7 и H9, способные, как предполагается, вызывать будущие пандемии гриппа. Установлено, что подтипы H5 и H7 наиболее смертоносны, а подтип H9 наименее опасен [18].

С 2006 году вирус гриппа H5N1 считается наиболее серьёзной пандемической угрозой в мире из-за высокой летальности и вирулентности [19]. По состоянию на май 2020 года ВОЗ сообщила в общей сложности о 861 подтвержденном случае заболевания человека, в результате которого с 2003 года погибло 455 человек [19]. С января 2022 г. по 29 июня 2023 г. в восьми странах было зарегистрировано тринадцать спорадических случаев заражения человека вирусом А(H5N1), включая шесть случаев тяжелой формы заболевания и два случая смерти [20]. С 2013 года вирус А(H7N9) вызвал около 1568 случаев инфицирования людей и 615 смертей. Считается, что в последней волне вирус А(H7N9) приобрел высокую патогенность [21].

Таким образом вирусы птичьего гриппа А азиатского происхождения (H5N1) и (H7N9) с пандемическим потенциалом вызывают серьезные опасения.

**Клиническая картина.** Инкубационный период для птичьего гриппа, во время которого болезнь протекает без симптомов, составляет от 2 до 5 дней, в редких случаях — до 9 дней [22, 23]. При этом в большинстве случаев начало болезни схоже с сезонным гриппом и проявляется лихорадкой, сухим кашлем,

одышкой, болью в теле и тошнотой. Однако при птичьей гриппе возможно возникновение желудочно-кишечных расстройств, таких как боль в животе, диарея и рвота, причём на неделю раньше начала респираторных симптомов. Кроме того, возможно появление сыпи на коже. В отличие от сезонной инфекции, при птичьей гриппе, вызванным вирусом гриппа А (H5N1), чаще всего заболевание начинается с появления конъюнктивита, после чего следует лихорадка и респираторные симптомы [24]. Максимальная температура наблюдается к началу вторых суток. При этом развивается вирусная пневмония с вероятным осложнением в виде бактериальной инфекции. Это приводит к серьёзному расстройству дыхания, а также возможному развитию острого респираторного дистресс-синдрома, который проявляется в быстро распространяющемся тяжёлым поражением лёгких [22, 23]. Кроме того, дополнительно может развиваться сердечная, печёночная или полиорганная недостаточность [22, 23].

При заболевании сезонным вирусом гриппа А инкубационный период короткий и составляет 1-2 дня. Клинические симптомы заболевания сохраняются в течение 3-7 дней. При этом у больного чаще всего наблюдается неосложнённая респираторная инфекция с кашлем, лихорадкой с температурой от 38-39 °С и выше, миалгией, болью в горле, ознобом или потливостью, а также недомоганием, сохраняющимся в течение от 2 до 8 дней. Общая интоксикация выражается в суставных, мышечных болях, так же может наблюдаться головная боль и боль в глазах, конъюнктивит. Для тяжёлых случаев характерны проблемы с дыханием и развитие пневмонии. Появление подобных симптомов может привести к летальному исходу. У гриппа возможно появление атипичных симптомов, которые чаще всего возникают у детей. Такие симптомы включают в себя рвоту и диарею, тошноту, боли в животе. При гриппе часто может появиться геморрагический синдром, который выражается в кровоизлияниях в кожу, слизистые и серозные оболочки, внутренние органы. Могут развиваться серьёзные нарушения, приводящие к летальному исходу: отёк лёгких, респираторный дистресс-синдром и геморрагическая пневмония.

Гриппозная инфекция, вызванная вирусом гриппа В обычно протекает значительно легче. Она сопровождается следующими симптомами: конъюнктивит, боль в глазах, фотофобия.

Кроме того, гриппозная инфекция способна приводить к осложнениям дыхательной системы, однако также возможны патологии сердечно-сосудистой, нервной и мочеполовой систем.

Разделяют две группы осложнений:

1. Связанные непосредственно с действием вируса гриппа.

К ним относят вирусную пневмонию, так называемый респираторный дистресс-синдром, геморрагический отек легких, менингит, менингоэнцефалит, миокардит, инфекционно-токсический шок. Острый респираторный дистресс-синдром проявляется резким нарушением функции лёгких с дыхательной недостаточностью, нередко несовместимой с жизнью.

2. Возникшие в результате вторичной бактериальной инфекции.

Одно из самых опасных и частых осложнений в таком случае является бактериальная пневмония, которая развивается в результате присоединения бактерий к вирусному процессу. Обычно такие пневмонии развиваются к концу первой или началу второй недели заболевания и к этому времени сам вирус может уже не определяться.

Так же в результате таких пневмоний может развиваться отит, синусит, гломерулонефрит, гнойный менингит и сепсис.

Токсическое поражение сердечной мышцы, как осложнение гриппа может развиваться в любом возрасте, особенно опасно для пожилых людей. Поражение центральной нервной системы проявляется менингеальным синдромом со спутанным сознанием, сильной головной болью, зачастую не снимающейся анальгетиками, рвотой.

О поражении периферической нервной системы свидетельствуют невралгические боли, которые могут беспокоить в любых отделах за счёт поражения тех или иных участков нервных волокон.

**Меры борьбы.** В настоящее время основным способом борьбы с вирусом гриппа считается вакцинация. Однако, несмотря на активное использование вакцин, есть определённые ограничения при их применении. Каждый год состав вакцины необходимо обновлять, чтобы отражать изменения в циркулирующих вирусах, однако из-за антигенного дрейфа и мутаций вируса гриппа часто возникают новые штаммы, что приводит к тому, что в некоторые эпидемические сезоны штаммы, циркулирующие среди населения, не совпадают со штаммами, входящими в состав вакцины. Для производства новых вакцин, включающих самые последние антигенные варианты, требуется не менее 6 месяцев. К другим ограничениям относятся острые лихорадочные состояния, обострения хронического заболевания, а также нетяжёлые ОРВИ и острые кишечные заболевания, аллергическая реакция или осложнения на ранее введённую дозу. Для детей вакцинация возможна начиная от 6 месяцев. Нужно учитывать, что иммунный ответ после вакцинации формируется не сразу, а через 7-15 дней. Поскольку прививки использую как способ профилактики, то они бесполезны для лечения гриппа, если человек уже заболел.

Поэтому в дополнении к вакцинации ВОЗ рекомендует использование противогриппозных этиотропных препаратов. Их применение позволяет не только сократить период заболевания, сгладить последствия, но и даёт возможность избежать заражения при использовании в качестве мер профилактики или же снизить тяжесть симптомов для человека.

Лечение гриппа остаётся сложной задачей, а выбор подходящих препаратов и их возможного комбинирования при лечении требует тщательного подбора, который включает, в том числе оценку и учёт сопутствующих факторов.

## **1.2. Этиотропные (прямого противовирусного действия) препараты: механизм действия, эффективность, широта спектра действия, побочные эффекты, преимущества и недостатки**

### **1.2.1. Блокаторы M2- каналов**

Амантадин и римантадин относятся к первому поколению этиотропных химиопрепаратов прямо вирусспецифического действия и являются производными адамантана.

**Амантадин и римантадин** препарат для перорального применения, используемый для лечения и, в редких случаях, для профилактики заболеваний, вызванных вирусом гриппа А. Однако данный препарат не используется против вирусов гриппа В. Причина в том, что амантадин и римантадин являются блокаторами M2 белка, который образует ионный канал. Однако вирус гриппа В образует альтернативный ионный канал с помощью VM2[1].

При приеме в течение одного-двух дней после появления симптомов римантадин и амантадин могут сократить продолжительность и смягчить тяжесть гриппа и симптомы, в том числе лихорадку.

Амантадин и римантадин – это ингибиторы M2 белка вируса гриппа. M2 белок ответственен за создание ионного канала и при его блокировке вирус не может размножаться [25]. При применении данных ингибиторов покрытие с вируса гриппа не снимается полностью за счёт того, что M1 не высвобождается из рибонуклеопротеина. Это приводит к невозможности проникновения вируса в ядро клетки-хозяина [26].

Таким образом, вирус гриппа А не может инфицировать клетку из-за невозможности закончить снятие оболочки вируса с последующим высвобождением РНК. Химические формулы амантадина римантадина представлены на Рисунке 2 и Рисунке 3.

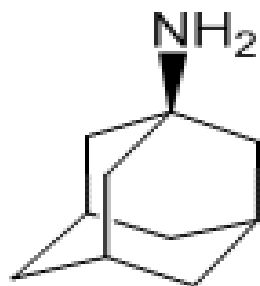


Рисунок 2 – Химическая формула амантадина [27]

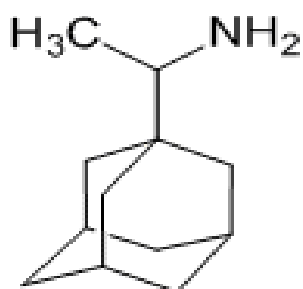


Рисунок 3 – Химическая формула римантадина [28]

Противогриппозная активность ингибитором М2 белка, как и их эффективность, была не раз подтверждена в различных экспериментах *in vitro*, на животных, и в клинических испытаниях [29, 30, 31, 32, 33, 34, 35].

Так, эффективность терапевтического эффекта среди заключенных в Форт Мэдисон во время эпидемии гриппа, была продемонстрирована в 1969 году [36]. Также было показано, что римантадин и амантадин эффективны как для лечения, так и для профилактики против вируса гриппа А у взрослых, снижая выделение вируса в назальном секрете, максимальную температуру и время до снижения температуры и системных симптомов [29, 37, 38]. Кроме того, амантадин показал хороший профилактический эффект у детей [39].

Установлено, что римантадин более эффективен, чем амантадин, поскольку отношение максимальной концентрации препарата в носовой слизи к концентрации в плазме было более чем в два раза выше после приема римантадина, чем после амантадина и при его использовании у пациента проявляется меньше симптомов [16, 40].

Однако, не смотря на все свои преимущества, амантадин и римантадин сейчас редко применяется против вируса гриппа А. Это обусловлено возросшим количеством штаммов с резистентностью к данному препарату.

Так, впервые устойчивость вируса гриппа к амантадину была зарегистрирована во время эпидемии гриппа А в 1980 г. Частота резистентности к амантадину среди вирусов гриппа А (H3N2) с 1991 по 1995 год составляла всего 0,8%. Но в 2004 г. частота резистентности резко увеличилась до 12,3%. Через год развитие резистентности сделало ещё один резкий скачок и значительно возросла до 96%, 72% и 14,5% в Китае, Южной Корее и США, соответственно. Уже к 2006 г. 90,6% штаммов H3N2 и 15,6% штаммов H1N1 были устойчивы к амантадину. Благодаря изучению резистентных штаммов была обнаружена мутация в гене S31N. Именно этот ген кодирует M2 белок вируса гриппа А, а его мутация не допускает ингибирование ионного канала при помощи амантадина и римантадина. Подобная мутация была обнаружена у большинства устойчивых к амантадину вирусов гриппа А H3N2 [41, 42]. В США было выявлено, что все сезонные вирусы гриппа А H3N2, циркулировавшие в 2009 году, обладали устойчивостью к противовирусному препарату амантадину. Согласно отчёту ВОЗ за 2011 год, аналогичной мутацией, придающей устойчивость к амантадину, обладают и вирусы гриппа А H1N1. Таким образом, текущие руководства ВОЗ рекомендуют не использовать ингибиторы M2 для гриппа А. Так же обновленное руководство CDC не рекомендует римантадин и амантадин для лечения и профилактики гриппозной инфекции [41].

В настоящее время количество циркулирующих среди населения штаммов вируса гриппа с высокой резистентностью к препаратам адамантанового ряда (амантадин и римантадин) очень высоко. Помимо этого, резистентность возникает в течение 2–4 дней после начала терапии у 30% пациентов, инфицированных исходно чувствительными штаммами [43].

Римантадин и амантадин, как и любые химиопрепараты, могут вызывать побочные эффекты. В частности, римантадин способен вызывать тошноту и расстройство желудка со стороны желудочно-кишечного тракта, со стороны центральной нервной системы он вызывает нервозность, усталость, головокружение, проблемы со сном и концентрацией внимания, беспокойство и спутанность сознания. Так же стоит заметить, что римантадин вызывает меньше симптомов со стороны центральной нервной системы, нежели его родственный препарат – амантадин [27]. Для амантадина со стороны центральной нервной системы и периферической нервной системы отмечаются различные побочные эффекты [28]. Кроме того, возможны осложнения со стороны сердечно-сосудистой системы в виде развития или усугубления сердечной недостаточности, ортостатическая гипотензия. Также могут появиться дерматоз, тошнота, рвота, сухость во рту, снижение аппетита, диспепсия. У пациентов с гиперплазией предстательной железы наблюдается затруднение мочеиспускания; полиурия, никтурия. Редко появляются такие побочные эффекты, как аритмия, тахикардия, анорексия, запоры.

### 1.2.2. Ингибиторы нейраминидазы

**Занамивир, осельтамивир, ланамивир и перамивир** — это лекарственные препараты, которые активно используются как для профилактики, так и для лечения вирусов гриппа А и В. Данные препараты проявляют противовирусную активность во внеклеточном пространстве. Таким образом уменьшается воспроизведение вирусов гриппа и предотвращается выброс новых вирионов вируса из эпителиальных клеток дыхательных путей: ингибиторы нейраминидазы предотвращают этап отщепления новой вирусной частицы от клетки-хозяина.

Механизм действия заключается в том, что молекулы ингибитора связываются с активным центром нейраминидазы гриппа и ингибирует активность этого фермента, предотвращая расщепление сиаловой кислоты клетки-хозяина.

**Занамивир** – это ингибитор нейраминидазы. Он является первым разработанным препаратом, действующим на нейраминидазу вируса гриппа.

Химическая формула представлена на Рисунке 4.

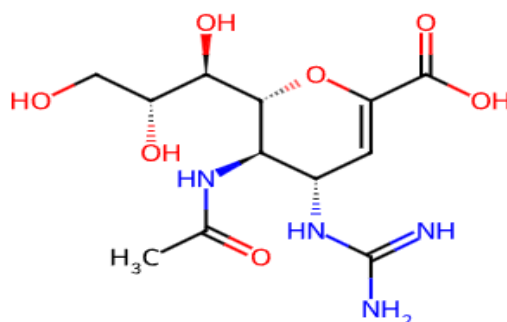


Рисунок 4 – Химическая формула занамивира [44]

При начале приёма в течение 48 часов после появления симптомов время сокращения симптомов инфекции составило полтора дня. Занамивир имеет существенный недостаток – это возможность его применения только в виде ингалятора или интраназального аэрозоля. Такое введение лекарства обусловлено тем, что при приёме перорально занамивир имеет очень низкую биодоступность, составляющую примерно 1-5%. После перорального вдыхания биодоступность возрастает до 4% - 17% [45, 46].

Противовирусная активность занамивира была доказана *in vitro* и на животных [47, 48, 49]. Клинические испытания показали эффективность занамивира против гриппозной инфекции. Лечение ими приводило к сокращению продолжительности симптоматического заболевания, способствовало более быстрому возвращению к нормальной деятельности и уменьшало риск осложнений, требующих применения антибактериальных препаратов у взрослых, лиц из групп высокого риска и детей, больных гриппом [50, 51, 52, 53, 54, 55, 56].

В 2013 году гены, экспрессирующие устойчивость к осельтамивиру и занамивиру, были обнаружены у птичьего гриппа А Н7N9 [50]. Однако резистентность к занамивиру на сегодняшний день встречается редко (<1%).

Побочные явления наблюдаются очень редко и к ним относятся: аллергическая реакция, вазовагальные реакции, аритмия, обморок, бронхоспазм, одышка, сыпь, крапивница, тяжёлые кожные реакции [57].

**Осельтамивир.** Осельтамивир вводят перорально в виде пролекарства осельтамивира фосфатной соли. Он быстро всасывается и метаболизируется с помощью эстераз в желудочно-кишечном тракте, печени и крови в активную форму карбоксилата осельтамивира. Не менее 80% пероральной дозы достигает системного кровообращения в виде активного метаболита [45]. За счёт высокой эффективности осельтамивир применяют у детей, подростков и взрослых в качестве первой линии для лечения и профилактики гриппа. Химическая формула осельтамивира представлена на Рисунке 5.

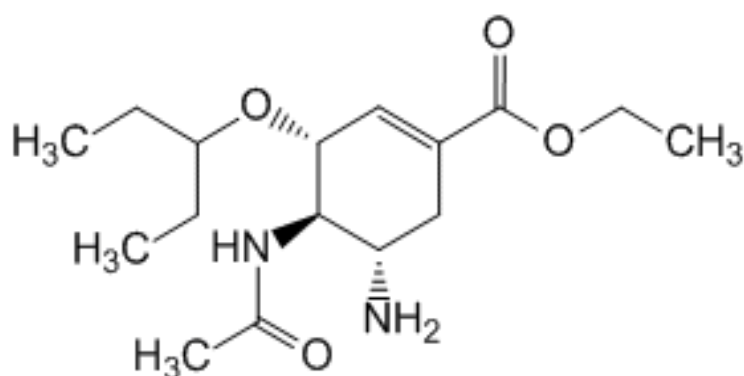


Рисунок 5 – Химическая формула осельтамивира [58]

Для достижения максимального эффекта лучше всего начинать приём препарата в первые 48 часов после появления симптомов. Но у тяжелобольных и у лиц с высоким риском осложнений рекомендуется начать лечение осельтамивиром независимо от времени начала заболевания. Такие рекомендации основаны на исследованиях, показавших положительный терапевтический эффект осельтамивира у госпитализированных больных гриппом, начавших лечение через

4 и 5 дней после появления симптомов. Также осельтамивир назначают для профилактики гриппозной инфекции у пациентов старше 1 года.

Противовирусная активность осельтамивира подтверждалась в исследованиях *in vitro*, где была показана активность препарата против вирусов гриппа А и В [59]. Эффективность осельтамивира была подтверждена на мышах и хорьках, инфицированных вирусом А/Калифорния/04/2009(Н1N1)pdm09, А/Гонконг/156/97 (Н5N1) и А/ Гонконг /1074/99 (Н9N2), а также против вирусов гриппа А Н5N1 [59, 60, 61, 62]. Клинические испытания показали снижение вирусного титра, уменьшение симптомов и сокращение времени до облегчения заболевания на 1-1,5 дня как у взрослых, так и у детей [63, 64, 65, 66, 67, 68, 69].

До 2007 года резистентность к ингибиторам нейраминидазы наблюдалась редко. К окончанию сезона гриппа 2007–2008 годов в Норвегии около двух третей протестированных вирусов А(Н1N1) проявляли устойчивость к осельтамивиру, при этом развитие резистентности не было обусловлено широким применением данного препарата [70]. В дальнейшем этот вирус стал патогенным и во время пандемии 2009 года, а устойчивые к осельтамивиру штаммы распространились по всему миру. Во многих странах этот показатель составлял 0,5–1,1% среди населения в целом [71, 72]. В связи с этим, в 2008–2009 годах, учитывая высокую распространенность вируса, устойчивого к осельтамивиру, Центры по контролю и профилактике заболеваний (CDC) выпустили временные рекомендации по применению противовирусных средств для лечения гриппа. В них рекомендовалось в случае подозрения или доказанного гриппа А использовать для лечения занамивир или адамантан в комплексе с осельтамивиром [73]. При этом не было выявлено существенных различий в уровне вирусоносительства, первичных симптомах или общей частоте осложнений и госпитализаций, вызванных вирусами, устойчивыми к осельтамивиру и чувствительными к нему [70]. Стоит так же отметить, что в Японии, где применение осельтамивира широко распространено, регистрировали низкое количество устойчивых к осельтамивиру штаммов в сезон 2007-2008 годов [74].

Резистентность к осельтамивиру у вируса гриппа А возникает при появлении мутации H275Y [75]. Степень устойчивости к осельтамивиру, обусловленная этой мутацией, специфична для подтипа гриппа, то есть устойчивость возникает у подтипов нейраминидазы N1, таких как вирусы H1N1 или H5N1, но не у других подтипов, таких как H3N2 или вирусы гриппа В. Кроме того, мутация H275Y обеспечивает устойчивость к конкретному лекарственному средству. Хотя нейраминидазы подтипа N1 с данной мутацией обладают высокой устойчивостью к ингибированию осельтамивиром и снижает чувствительность к осельтамивиру примерно в 400 раз, эта мутация не влияет на ингибирование нейраминидазы занамивиром.

Из-за определенных различий в структуре фермента нейраминидазы устойчивость к нейраминидазе с меньшей вероятностью возникает при гриппе А/H3N2 и гриппе В. При этом у гриппа А/H3N2 могут возникать мутации R292K, E119V, а у гриппа В I222T.

Однако, несмотря на то, что при пандемии были выявлены устойчивые к осельтамивиру штаммы вируса, на данный момент уровень резистентности к нему очень низок (0,6%), поэтому осельтамивир рекомендован для лечения и профилактики вирусов гриппа А и В [1, 42, 76].

Осельтамивир, как правило, хорошо переносится пациентами всех возрастов, включая беременных женщин и плод [77]. Осельтамивир может вызывать побочные действия, такие как тяжёлые кожные реакции, реакции гиперчувствительности и нервно-психические расстройства. Кроме того, возможно головная боль, тошнота и рвота [78].

**Ланинамивир.** Лечение ланинамивиром основано на однократной ингаляции, что является преимуществом против осельтамивира и занамивира. В настоящее время он одобрен для применения только в Японии и проходит клинические исследования за её пределами. Пролекарство ланинамивира вводится ингаляционно в виде порошка и быстро превращается в активную форму в легких. Однако по сравнению с осельтамивиром и занамивиром, которые вводят два раза в день в течение 5 дней, ланинамивир обладает пролонгированным действием,

требующим только однократного введения [79]. Химическая формула ланинамивира представлена на Рисунке 6.

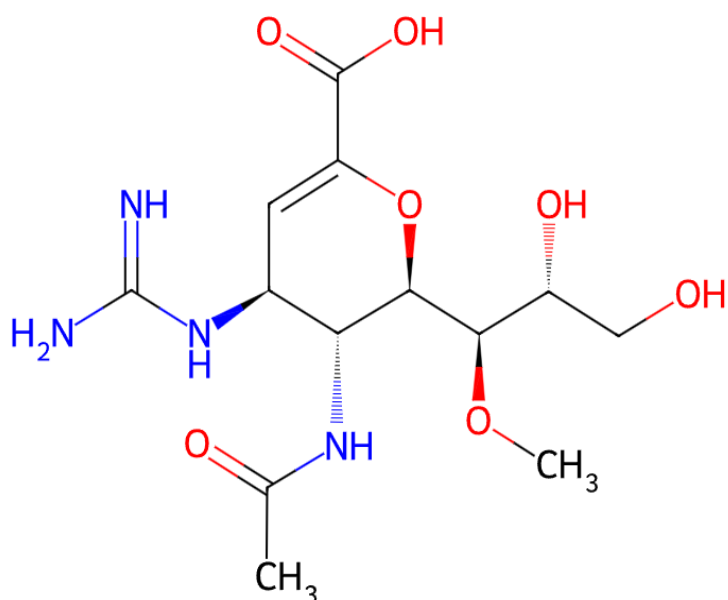


Рисунок 6 – Химическая формула ланинамивира [80]

Исследования *in vitro* и *in vivo* показали эффективность ланинамивира против сезонных вирусов H1N1, H3N2 и гриппа В, а также пандемического вируса A/H1N1/2009 [81, 82, 83, 84, 85]. Так, в доклинических исследованиях было показано, что октаноат ланинамивира снижал лихорадку у хорьков, смертность у мышей и концентрацию вируса в легких у хорьков и мышцах и мозге у мышей после индуцированного гриппа различными вирусами гриппа А, в том числе устойчивыми к осельтамивиру клиническими изолятами, обладающие мутацией H274Y [85, 86].

Клинические исследования показали, что ланинамивир сопоставим с осельтамивиром по своей эффективности [87]. Однако пациенты с низкой пиковой скоростью вдоха не могут вдохнуть рекомендуемую дозу препарата. Таким образом, данной группе пациентов требуется больше ингаляций, чтобы доставить стандартную дозу в легкие [88].

Резистентность к лантанамивиру широко не изучалась, однако в одном исследовании на мышах, инфицированных вирусом А Н1N1, не было обнаружено возникновения вирусов со сниженной чувствительностью к лантанамивиру при лечении [84].

К возможным побочным действиям относятся: обмороки, расстройства нервной системы и кишечно-желудочные расстройства. Кроме того, в Японии подросткам, принимающим лантанамивир, рекомендуется находиться под постоянным присмотром не менее 2 дней [89].

**Перамивир.** Перамивир рекомендован для лечения острого неосложнённого гриппа и применяется внутривенно, поскольку имеет низкую биодоступность при пероральном приеме. Рекомендован для лечения ВОЗ с 2009 года и в 2014 году одобрен FDA (Food and Drug Administration, «Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств»). Уникальность этого препарата заключается в применении одной парентеральной дозы, кроме того, благодаря такому способу введения данный препарат имеет преимущество для лиц, страдающих тошнотой, рвотой или имеющих проблемы с глотанием. Перамивир рекомендован для лечения как взрослых, так и детей в возрасте от двух лет. Химическая перамивира формула представлена на Рисунке 7.

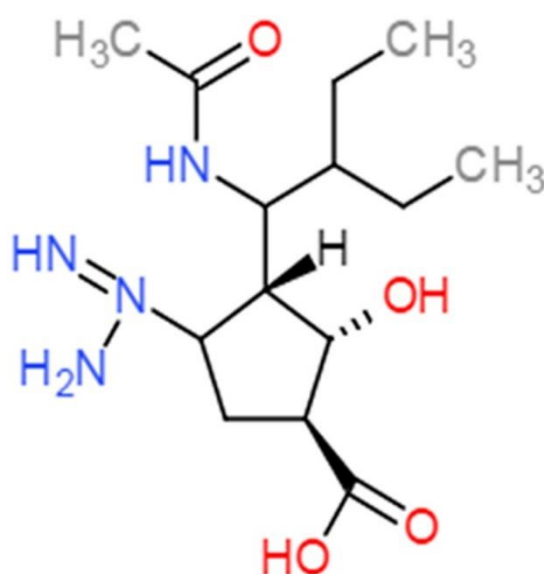


Рисунок 7 – Химическая формула перамивира [90]

При исследовании на животных перамивир демонстрировал эффективность при внутримышечных инъекциях у мышей [91]. Клинические исследования показали, что лечение перамивиром внутривенно значительно сокращало время облегчения симптомов и снижало вирусную нагрузку, а также снижало выделение вируса [92].

Резистентность встречается редко и обусловлена возникновением мутации H275Y [93]. Поэтому в 2009 году Всемирная организация здравоохранения рекомендовала отказаться от использования внутривенного введения перамивира для лечения инфекции, вызванной штаммами гриппа А (H1N1)pdm09, несущих мутацию H275Y [93].

К возможным побочным действиям препарата относятся: тошнота, рвота, диарея, запор, бессонница и гипертония. Редко встречаются потенциально тяжёлые нежелательные явления включают реакции гиперчувствительности, анафилаксию, синдром Стивенса-Джонсона, острый делирий и галлюцинации [94].

### 1.2.3. Ингибитор фузии

**Умифеновир** – это лекарственный противовирусный препарат широко спектра действия. Является ингибитором слияния гемагглютининов вирусов гриппа А и В. Умифеновир активно используют для лечения гриппозной инфекции в России и Китае. Умифеновир был утверждён в СССР для применения на основе клинических данных [95]. Он влияет на гемагглютинин вируса гриппа, однако длительное время оставался неизвестным точный механизм его действия. Для выяснения того, как именно умифеновир взаимодействует с вирусом гриппа, были проведены дополнительные исследования. Для этого были получены реассортантные вирусы гриппа А, которые культивировали в присутствии возрастающих концентраций препарата. Было показано, что чувствительность к умифеновиру обусловлена геном гемагглютининов, а реассортанты, устойчивые к

умифеновиру, имели мутации в гене гемагглютинаина, вызывающие одиночные аминокислотные замены в четырех разных положениях субъединицы HA2: K51N, Q42H, Q27N, K117R, R91L, R91Q, F3L. Последующие исследования подтвердили устойчивость реассортантов к умифеновиру при гемолизе по сравнению с чувствительным к нему вирусом гриппа А [95]. Также было установлено, что у устойчивых к умифеновиру вирусов pH для конформационных изменений гемагглютинаина был на ~0,2 единицы выше, чем у чувствительного вируса гриппа. При дальнейшем исследовании было выяснено, что умифеновир влияет на гемагглютинин, повышая его устойчивость к конформационным изменениям, вызванными низким pH, что мешает последующему слиянию [95].

Кристаллографические исследования комплексов умифеновир-гемагглютинин показали, что умифеновир связывается в гидрофобной полости на границе раздела протомеров гемагглютинаина в верхней части стебля белка, стабилизируя гемагглютинин. Такое взаимодействие создаёт обширную сеть нековалентных взаимодействий, которые предотвращают индуцированный низким pH переход гемагглютинаина в фузогенное состояние, тем самым блокируя инфекцию при слиянии вируса с плазматической мембраной клетки [96]. Таким образом, было выяснено, что сайт связывания умифеновира расположен на границе раздела соседних протомеров тримера гемагглютинаина [95]. Химическая формула умифеновира представлена на Рисунке 8.

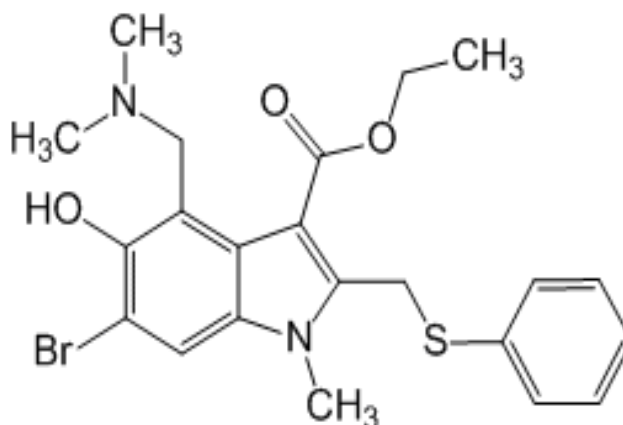


Рисунок 8 – Химическая формула умифеновира [96]

Эффективность умифеновира против гриппозной инфекции была подтверждена против вирусов гриппа А и В на культуре клеток, и на животной модели гриппозной пневмонии, индуцированной вирусом гриппа А [59, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104]. Эффективность умифеновира была доказана в многочисленных клинических исследованиях [105, 106, 107, 108, 109, 110, 111].

Результаты рандомизированного двойного слепого многоцентрового исследования АРБИТР IV фазы, которые проводились с ноября 2011 года по апрель 2019 года на базе пятнадцати исследовательских центров, подтвердили безопасность умифеновира и его эффективность против вируса гриппа и других ОРВИ у взрослых. Было установлено, что противовирусный эффект умифеновира наиболее сильный при остром периоде заболевания, проявляясь в снижении тяжести заболеваний и сокращении сроков проявления симптомов инфекции [112].

Кроме того, было проведено широкое клиническое исследование АРБИТР, в рамках которого определяли чувствительность антигенно-доминантных вирусов гриппа А и В 2012-2014 гг., которые выделили от пациентов, к умифеновиру. В рамках этого же исследования проверяли чувствительность эталонных штаммов вируса гриппа, имеющих резистентность к осельтамивиру. Результаты показали, что репликация этих вирусов гриппа у человека успешно подавляется умифеновиром. Вирусы дикого типа A/Perth/265/2009 (H1N1)pdm09, A/Fukui/45/2004 (H3N2) и B/Perth/211/2001 и их устойчивые к осельтамивиру аналоги были чувствительны к умифеновиру в лабораторных анализах *in vitro*. Ни один из вирусов, выделенных до и во время терапии умифеновиром, не показал сниженной чувствительности к ингибиторам нейраминидазы. В выделенных от больных через 3, 5 и 7 дней после начала терапии вирусах гриппа не было обнаружено возникновения резистентности к умифеновиру. Таким образом, умифеновир эффективен против вирусов гриппа, циркулирующих в сезонах 2012-2014 гг., а терапия не привела к возникновению лекарственно-устойчивых вариантов [113].

Однако умифеновир имеет определённые недостатки. Одним из основных недостатков является высокие дозировки препарата для достижения максимальной

концентрации в плазме и терапевтической эффективности. Это так же определяет неудобные для пациента схемы лечения, отсутствие или несовершенство ряда лекарственных форм, в частности для лечения тяжелых случаев гриппозной инфекции.

Умифеновир относится к малотоксичным препаратам и обычно очень хорошо переносится. К редким побочным действиям относятся аллергические реакции.

#### **1.2.4. Ингибиторы кэп-зависимой эндонуклеазы и РНК-зависимой РНК-полимеразы**

**Балоксавира марбоксил** — это лекарственное противовирусное средство, которое используют для лечения и профилактики гриппа А и В. Главным преимуществом данного препарата является его эффективность при однократном или двукратном применении. Так, по инструкции, при лечении гриппозной инфекции у взрослых вирус прекращает выделяться в течении суток, а через двое суток облегчаются симптомы заболевания.

Данный препарат является ингибитором кэп-зависимой эндонуклеазы вируса гриппа. Преимущество балоксавира обусловлено, в том числе и его фармакокинетической особенностью, а именно длительным периодом полувыведения [114].

Балоксавир марбоксил является пролекарством. После перорального приёма происходит гидролиз под действием эстераз и образуется активный метаболит. Именно он оказывает противовирусное действие за счёт селективного угнетения кэп-зависимой эндонуклеазы вируса гриппа. Именно так балоксавир блокирует полимеразы вируса гриппа, а также репликаю вирусной мРНК [112]. После высвобождения балоксавиновая кислота ингибирует образование вирусной мРНК путем специфического связывания белка РА, который отвечает за захват мРНК

клетки-хозяина, что является ключевым этапом в инициации процесса транскрипции вирусной РНК. По сути, идёт ингибирование инициации синтеза матричной РНК, делая невозможным дальнейшую пролиферацию вируса после попадания в клетку-мишень, а, следовательно, и дальнейшее размножение вируса [115]. Химическая формула балоксавира представлена на Рисунке 9.

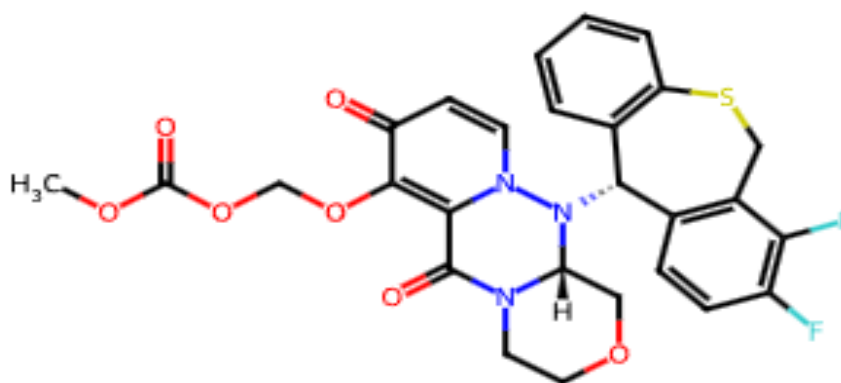


Рисунок 9 – Химическая формула балоксавира [116]

Балоксавир марбоксил является первым препаратом в этом классе препаратов. Изначально его разрабатывали как пролекарство, при метаболизме которого высвобождается активное вещество балоксавириновая кислота.

Балоксавир показал высокую противовирусную активность в отношении вирусов гриппа А и В *in vitro* [117, 118]. Также была доказана эффективность балоксавира на животной модели [118, 119, 120, 121, 122]. К примеру, на мышах при летальной гриппозной модели инфекции при отсроченном на 96 часов введении лекарства, применение балоксавира снижало титр вируса и предотвращало смертность мышей [123]. Клинические испытания показали, что однократный приём балоксавира приводит к облегчению симптомов и значительному снижению титра вируса [124, 125, 126, 127, 128, 129].

Устойчивость штаммов вируса гриппа А к балоксавиру обусловлена наличием мутации в изолейцине-38, а именно I38T, I38M или I38F. Процент резистентности пока невелик и составляет всего 2,2% у реципиентов, которые участвовали в испытании II фазы, но увеличивался у реципиентов при III фазе испытаний до 10% [130, 125].

Наиболее распространенные побочные эффекты балоксавира марбоксила включают диарею, бронхит, тошноту, синусит и головную боль [131, 132].

**Риамилловир.** Ещё один представитель ингибиторов вирусной полимеразы, риамилловир, был разработан и зарегистрирован на территории Российской Федерации в 2014 году. Это противовирусный препарат семейства азолоазинов с широким спектром действия, синтетический аналог гуанина [133].

Механизм действия до конца неизвестен. Считается, что риамилловир может взаимодействовать с консервативными белками и с РНК-зависимой РНК-полимеразой путём прямого взаимодействия, либо после метаболических превращений [134]. Химическая формула риамилловира представлена на Рисунке 10.

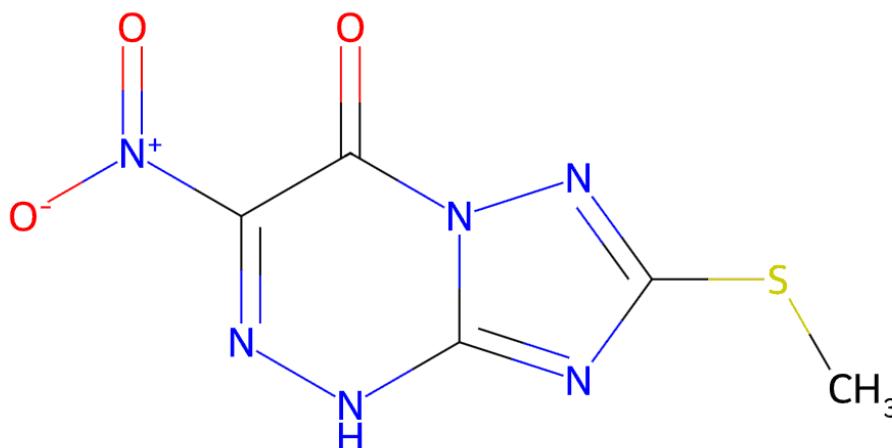


Рисунок 10 – Химическая формула риамилловира [135]

Эффективность риамилловира была доказана *in vitro* и на животных моделях [134, 136, 137, 138].

Кроме того, высокая эффективность и хорошая переносимость при терапии гриппа и респираторных инфекций была показана во множестве клинических исследования [124, 139, 140, 141, 142, 143].

Одним из главных преимуществ данного препарата является его эффективность на любой стадии заболевания и практически полное отсутствие побочных явлений. Риамиловир относится к почти нетоксичным препаратам.

К побочным явлениям относятся аллергическая реакция, а также метеоризм, диарея, тошнота, рвота.

**Фавипиравир** является ингибитором РВ1 и был одобрен в Японии в 2014 г. для лечения новых вирусов гриппа, невосприимчивых к другим химиопрепаратам. Химическая формула фавипиравира представлена на Рисунке 11.

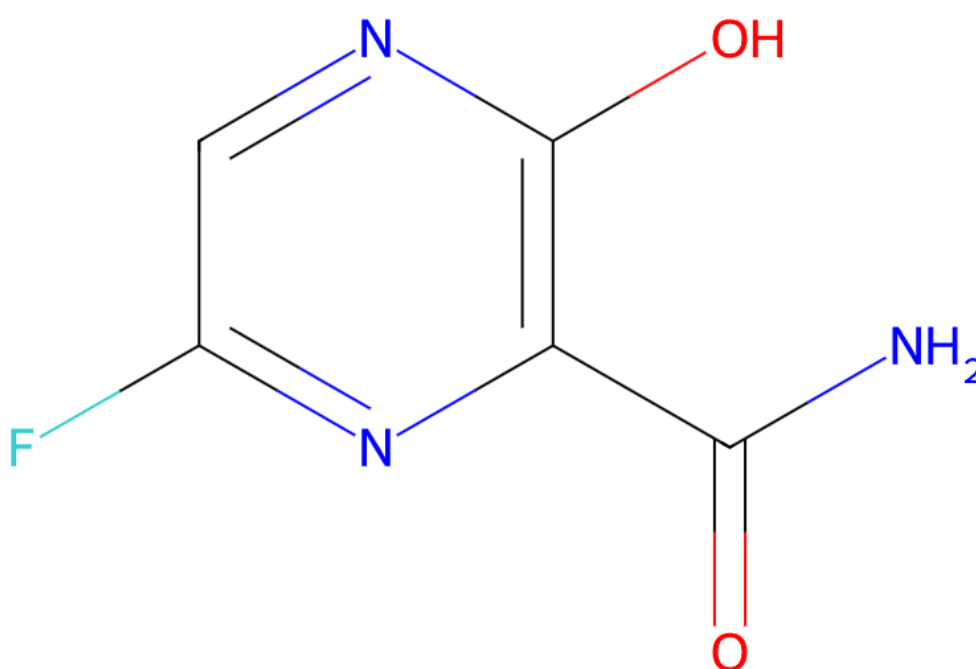


Рисунок 11 – Химическая формула фавипиравира [144]

Однако механизм действия фавипиравира до конца не изучен. Вероятный механизм препарата может заключаться в ингибировании вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы [145]. Другие исследования показывают, что фавипиравир индуцирует летальные мутации РНК-транскрипции, в результате чего появляются нежизнеспособные фенотипы вируса [146]. Существует версия, что фавипиравир является пролекарством и, попадая в организм, метаболизируется в активную форму. Так, молекула препарата подвергается фосфорилированию и рибозилированию. В результате этих реакций образуется активный метаболит, а

именно: ибoфуранозил-5'-трифосфат фавипиравира. Данный активный метаболит, в свою очередь, конкурирует с аденином и гуанозимом, которые являются пуриновыми нуклеозидами, и в результате встраивается в вирусную РНК. Таким образом угнетается вирусный фермент РНК-зависимой РНК полимеразы [147, 148]. При этом фавипиравир специфичен в ингибировании, поэтому клеточные полимеразы остаются им не тронуты [149].

Фавипировир обладает широкой противовирусной активностью в отношении РНК-содержащих вирусов, в том числе против вирусов гриппа А и В *in vitro* [147, 150, 151, 152]. При исследовании на животных фавипиравир показал высокую эффективность [150, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159]. Однако фавипиравир в рандомизированных контролируемых исследованиях неосложненного гриппа показал непостоянную терапевтическую эффективность [137, 160, 161].

Одобрение для лечения гриппа данный препарат получил только в 2014 году. Следует отметить, что данный препарат разрешён исключительно для лечения гриппозной инфекции в том случае, если инфекция устойчива к другим лекарственными препаратами. Важно подчеркнуть, что резистентные штаммы были получены только в лабораторных условиях в культурах клеток. На 2020 год не было зарегистрировано случаев появления резистентных к фавипиравирu штаммов вируса гриппа.

У фавипиравира, несмотря на его преимущества, имеются побочные эффекты. Так, в 2020 году было обнаружено, что данный препарат способствует накоплению мочевой кислоты в крови. А также важно отметить, что фавипиравир обладает тератогенным эффектом и его применение не рекомендуется при планировании беременности, поскольку способен нарушить эмбриональное развитие плода. Это было экспериментально доказано на четырёх видах животных, у которых приём фавипиравира замедлял развитие эмбриона, а после и вовсе приводил к его смерти в первом триместре [162, 163, 164].

### 1.3. Заключение по обзору литературы

В данном обзоре представлены данные о непосредственно противовирусных препаратах прямого этиотропного действия, в то время как иммуномодуляторы, иммуностимуляторы, иммуноглобулины и индукторы интерферона, которые также широко применяются в клинической практике и широко представлены на рынке, в данном контексте не рассматриваются. Также в обзоре не рассматривалось другое направление для борьбы с возникновением резистентности – применение комбинированных препаратов с разным механизмом действия для лечения гриппозной инфекции.

Кроме того, в настоящее время существует значительное число препаратов, находящихся на стадии разработки, эффективность которых еще не полностью подтверждена.

Данные препараты находятся на стадии подтверждения их эффективности в клинических испытаниях.

Все представленные в обзоре препараты имеют свои достоинства и недостатки. Ни один из них не является идеальным решением для эффективного лечения и профилактики противогриппозной инфекции. Дополнительным фактором, влияющим на изменение эффективности противогриппозного препарат, является высокая изменчивость вируса. Поэтому разработка новых лекарственных препаратов или же поиск среди аналогов и новых форм уже известных препаратов остаётся актуальной задачей.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Материалы

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).

Для проведения исследований на культуре клеток для изучения титра вируса в лёгких животных использовались пробы гомогената лёгких мышей (по 3 пробы из каждой группы). 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 леченых исследуемыми соединениями или препаратами сравнения. Для группы вирусного контроля лечение не проводилось. 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.).

## 2.2. Препараты, субстанции и их разведения

В опытах препаратов и субстанции готовили непосредственно перед проведением эксперимента. Все рабочие растворы препаратов и субстанции для изучения противовирусной активности, готовились из расчета содержания чистой субстанции в лекарственной форме непосредственно перед применением. Дозы препаратов и субстанций для животных рассчитывали в относительных весовых единицах - мг/кг массы тела животных в сутки. Препараты и субстанции взвешивали с точностью до 0,1 мг на аналитических весах.

**Римантадин и его аналоги.** В экспериментах использовали соединения Римантадина, 1,3-оксазинан-2-он и пиперидин-2,4-дион, предоставленные Институтом элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН. Химические формулы римантадина и его аналогов представлены на Рисунках 12-14.

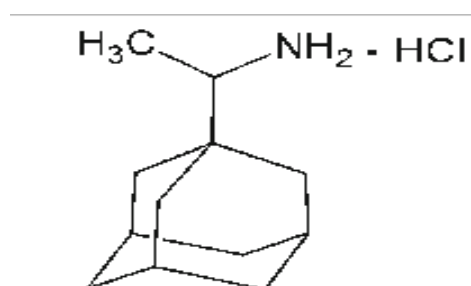


Рисунок 12 – Химическая формула римантадина [165].

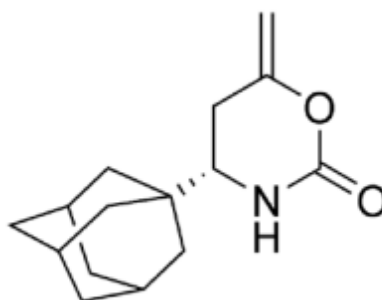


Рисунок 13 – Химическая формула соединения 1,3-оксазинан-2-она [165].

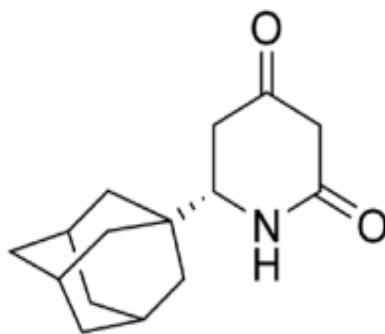


Рисунок 14 – Химическая формула соединения пиперидин-2,4-диона [165].

Для *in vitro* исследований римантадин и его аналоги готовили следующим образом: сток-растворы аналогов и римантадина (1 мг/мл) готовили в ДМСО. Полученные растворы разводили до концентрации 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 и 10 мкг/мл культуральной средой MEM.

Для исследования на животных были использованы субстанции исследуемых соединений и римантадина в виде готовых растворов 50% водного ДМСО.

**Умифеновир и его аналоги.** Аналоги умифеновира, производные 6-гидроксibenзотиофена, и препарат сравнения (субстанция умифеновир) были предоставлены АО «Отисифарм». Химическая формула умифеновира представлена на Рисунке 15.

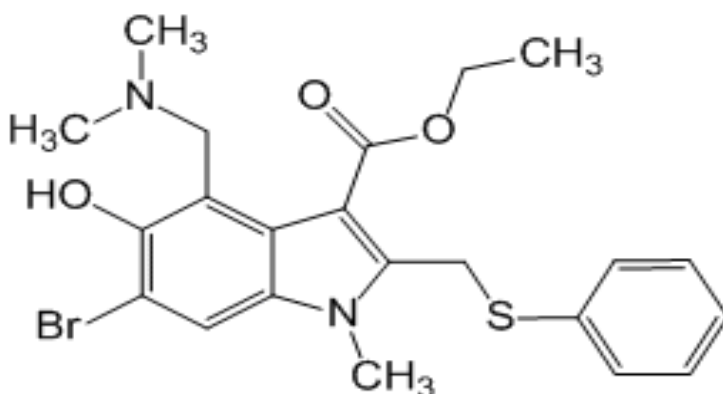


Рисунок 15 – Химическая формула умифеновира [96]

Умифеновир и его аналоги готовили следующим образом: к 5 мг субстанций умифеновира добавляли 0,5 мл спирта и оставляли при 37<sup>0</sup>С на 30 минут до полного растворения. Далее к образцу добавляли 4,5 мл дистиллированной воды, и из

полученных растворов концентрацией 1 мг/мл готовили для исследований необходимые концентрации препаратов на используемой культуральной среде MEM с двойным набором аминокислот.

**Балоксавир и его аналоги.** Препарат сравнения и аналоги Балоксавира (12aR)-12-[(S)-(3,4-дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазин[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-6,8-дион и (12aR)-12-[(S)-(3,4-дифторфенил)[2-(метилсульфанил)фенил]-метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]-пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-6,8-дион, (12aR)-12-[(R)-(3,4-Дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[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]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил}окси)метилметилкарбонат, а так же (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-дион и {[(12aR)-12-(дифенилметил)-6,8-диоксо-3,4,6,8,12,12a-гексагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил}окси} метилметилкарбонат, и гидроксипропилметилцеллюлоза были предоставлены ООО «ИИХР». Химические формулы аналогов балоксавира и балоксавира представлены на Рисунках 16-20.

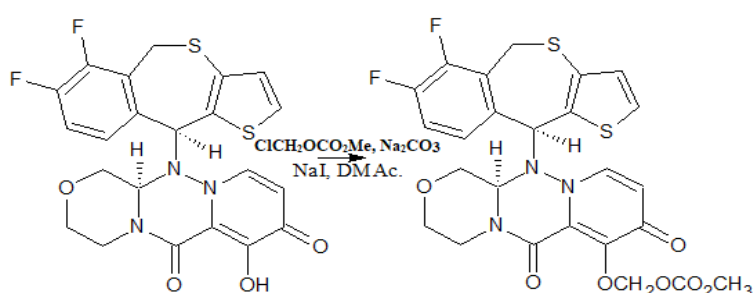


Рисунок 16 – Химические формулы аналогов балоксавира: (12aR)-12-[(R)-(3,4-Дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]-триазин-6,8-дион и (12aR)-12-[(R)-(3,4-Дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-6,8-диоксо-3,4,6,8,12,12a-гексагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо-[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил}окси)метилметилкарбонат [166]

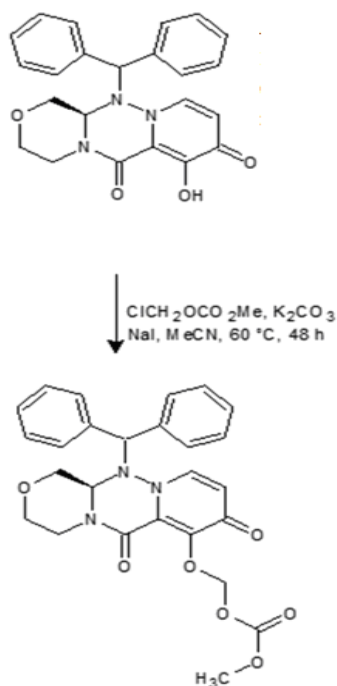


Рисунок 17 – Химические формулы аналогов балоксавира:  
 (12aR)-12-(Дифенилметил)-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1, 2,4]триазин-6,8-дион и {[(12aR)-12-(Дифенилметил)-6,8-диоксо-3,4,6,8,12,12a-гексагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил]окси}-метилметилкарбонат [166]

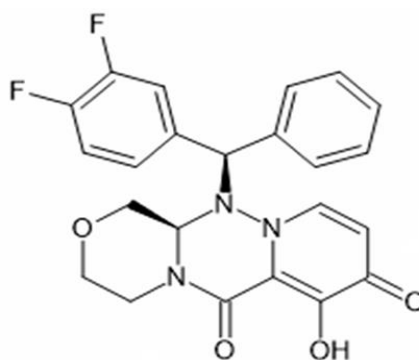


Рисунок 18 – Химическая формула аналога балоксавира:  
 (12aR)-12-[(S)-(3,4-дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазин[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-6,8-дион [166]

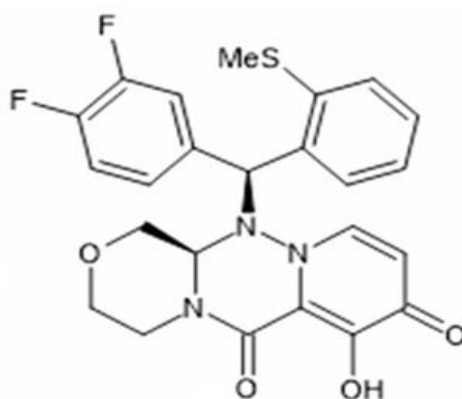


Рисунок 19 – Химическая формула аналога балоксавира:  
(12aR)-12-{(S)-(3,4-дифторфенил)[2-(метилсульфанил)фенил]-метил}-7-  
гидрокси-3,4,12,12а-тетрагидро-1Н-[1,4]оксазино[3,4-с]-пиридо[2,1-  
f][1,2,4]триазин-6,8-дион [166]

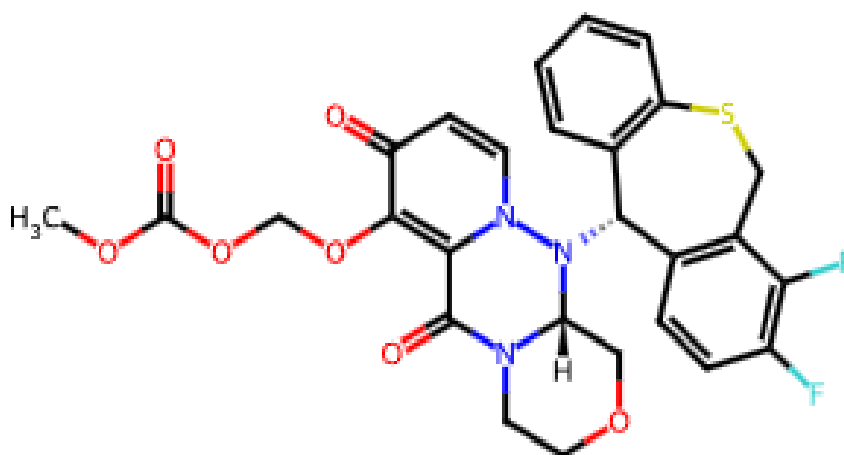


Рисунок 20 – Химическая формула балоксавира [116]

Для исследования в культуре клеток балоксавир и его аналоги готовили следующим образом: были приготовлены сток-растворы, из которых в дальнейшем были приготовлены следующие концентрированные растворы: 100 мкМ; 10 мкМ; 1 мкМ; 100 нМ; 10 нМ; 1 нМ; 2000 нМ; 200 нМ; 20 нМ; 2 нМ; 0,2 нМ; 0,02 нМ.

При разбавлении приготовленных 2-х кратных растворов при добавлении вируса получали 1 кратные растворы на клетках.

Балоксавир и его аналоги для введения животным в первом эксперименте готовили следующим образом:

15 мг НРМС (гидроксипропилметилцеллюлозы) растирали в ступке в течение 30 секунд с 15 мг исследуемого вещества. Добавляли 3 мл дистиллированной воды,

перемешивая и до получения 3 мл суспензии вещества с концентрацией 5 мг/мл в 0,5% НРМС. 1 мл суспензии с концентрацией 5 мг/мл разбавляли 2,3 мл 0,5% НРМС до получения суспензии с концентрацией 1,5 мг/мл. Далее 1 с концентрацией 1,5 мг/мл суспензии разбавили 2 мл 0,5% НРМС до получения суспензии с концентрацией 0,5 мг/мл. Полученные суспензии использовали для дозирования животных.

Балоксавир и его аналоги для введения животным во втором эксперименте готовили следующим образом:

18 мг НРМС (гидроксипропилметилцеллюлозы) растирали в ступке в течение 30 секунд с 18 мг исследуемого вещества. После добавляли 3,6 мл дистиллированной воды, перетирая по ходу до получения 3 мл суспензии вещества с концентрацией 5 мг/мл в 0,5% НРМС. Далее 1,2 мл суспензии разбавляли 1,8 мл 0,5% НРМС до получения суспензии с концентрацией 2,0 мг/мл.

В качестве контроля (плацебо) использовали 0,5% раствор гидроксипропилметилцеллюлозы в воде.

### 2.3. Вирусы и клеточные линии

В исследовании для определения противовирусной активности веществ, а также для титрования вируса использовали культуру клеток MDCK (перевиваемые клетки почки собаки), полученную из ВОЗ (хранение культур в жидком азоте). Культура клеток культивировали при 37°C в питательной среде MEM с L-глутамином (300 мкг/мл), 5% фетальной бычьей сыворотки (ФБС), смесью антибиотиков (пенициллин 100 МЕ/мл и стрептомицин 100 мкг/мл) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>.

Эталонные штаммы вируса гриппа А/Калифорния/04/09(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/Перт/265/2009 (H1N1) предоставлен Antiviral Group, International Society for Influenza and Other Respiratory Virus Diseases (United Kingdom).

Вирусы гриппа В В/Вашингтон/02/2019 (линия Виктория) и клинические изоляты 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 институт вирусологии им. Д.И. Ивановского (предоставлены Е.И. Бурцевой).

Использованные вирусы гриппа А выращивали в аллантоисной полости 9-дневных куриных эмбрионов, аликвоты вируса замораживали и хранили при температуре -80°C. Титр стока составлял не менее 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> ЭИД<sub>50</sub>/мл или 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> БОЕ/мл для вирусов гриппа А и 10<sup>5</sup> ЭИД<sub>50</sub>/мл для вируса гриппа В. В каждом эксперименте использовали новую аликвоту из одного стока. Аликвоты хранили при температуре -80°C. Работу с вирусами проводили в условиях ламинарных боксов 2-ого класса биологической защиты, с использованием одноразовых расходных материалов.

## 2.4. Этические принципы работы с животными

Мышей линии BALB/C, самок весом 12-14 г. получали из питомника «Андреевка» (Московская обл.) и из биопитомника ООО «СМК СТЕЗАР» (Владимирская обл.). Маркировка животных по группам производилась с помощью окраски красителями поверхности тела.

Животные содержались в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986) и правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (ГОСТ 33215-2014. «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», последние правки внесены в 2019г). Мыши размещались по 10 особей в пластиковых клетках (размер ДхШхВ 42х27х17 см) (ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными», последние правки внесены в 2019г) [167] со стерилизованной мелкой стружкой в качестве подстила в соответствии с нормами размещения. В комнате содержания животных поддерживали следующие условия: температура окружающего воздуха 20-24°C; автоматическая смена 12-ти часового светового периода (08:00-20:00 – день, 20:00-08:00 – ночь); относительная влажность 45-65 %; вентилирование без рециркуляции со сменой воздуха 7-12 объемов комнаты в час. В соответствии с утвержденными нормами, кормление животных осуществлялось брикетированными кормами, поение – чистой водой из специализированных поилок. Доступ животных к воде и пище был неограничен.

Мыши адаптировались в виварии института в отдельной комнате в течение 3 дней до начала введения анализируемых образцов. Во время этого периода осуществлялся ежедневный осмотр внешнего состояния животных и клинический осмотр до рандомизации. Животных с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями не выявлено.

Эвтаназия (безболезненное умерщвление животного) производилась ответственным лицом в соответствии с требованиями, принятыми в институте, путем дислокации шейных позвонков с предварительным наркозом эфиром. Эвтаназия осуществлялась своевременно по окончании экспериментов, без причинения страданий.

## **2.5. Определение цитотоксического действия препаратов и субстанций в культуре клеток**

Клетки MDCK, Vero E6 и Vero CCL81 рассеивали в 96-луночных планшетах с изначальной средней плотностью 35000 клеток на лунку в среде MEM (для MDCK, Vero E6) или DMEM (для Vero CCL81) в присутствии 5% фетальной бычьей сыворотки, 10 mM глутамина и антибиотика в течение суток до полного монослоя. Затем среду удаляли и в планшеты вносили по 100 мкл соединений в испытуемой концентрации в среде MEM с двойным набором аминокислот без сыворотки (или DMEM с глутамином и глюкозой 1 г/л) с 10 mM глутамина и антибиотиком (рабочая среда РС) в указанных концентрациях. Затем к каждой лунке планшета добавляли по 100 мкл РС. Каждая точка эксперимента была поставлена в 2-5 повторностях (n=2-5). Часть лунок использовали для контроля клеток.

После инкубации клеток с препаратами в течение 72 часов при 37°C визуально оценивали состояние клеточного монослоя. Количественную оценку цитотоксичности соединений проводили с использованием красителя МТТ (тиазолила голубого), для чего в каждую лунку добавляли по 40 мкл раствора

тетразолиевого красителя МТТ с концентрацией 4 мг/мл, жизнеспособность клеток оценивали по изменению его интенсивности окраски. Клетки инкубировали с красителем в течение 3 часов при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. После инкубации содержимое лунок удаляли, вносили в каждую 200 мкл ДМСО и инкубировали 20 минут при комнатной температуре. Результаты учитывали на автоматическом колориметре при длинах волн 540 и 670 нм. Максимальная концентрация препарата, не изменяющая значение ОП по сравнению с контролем клеток, принималась за максимально переносимую концентрацию (МПК). Концентрация субстанций, уменьшающая значение ОП на 50% по сравнению с контролем клеток, принималась за 50% цитотоксическую дозу (ЦТД<sub>50</sub>).

## **2.6. Изучение противовирусной активности в отношении вирусов гриппа методом иммуноферментного анализа (ИФА)**

Клетки MDCK рассеивали в 96-луночные планшеты для культивирования клеток с плоским дном (30000 клеток/лунку) и культивировали до полного монослоя в среде MEM с 5% фетальной сыворотки, 10 mM глутамином и антибиотиком. Перед заражением вирусом клетки 2 раза промывали средой без сыворотки, далее исследуемое соединение добавляли к клеткам в выбранных испытуемых концентрациях (по 100 мкл на лунку). Часть лунок использовали для контроля вируса и клеток. После инкубации клеток с исследуемыми препаратами в течение 2 часов при 37°C в лунки, исключая клеточный контроль, добавляли вирус, разведенный на используемой среде (по 100 мкл на лунку), при этом множественность заражения составляла приблизительно 0,01-0,001 БОЕ/ на клетку. Клетки, инфицированные вирусами гриппа А и вирусами гриппа В, инкубировали в течение 20 и 36 часов соответственно в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. После клетки планшета просматривали под инвертированным микроскопом, чтобы убедиться в отсутствии в них цитотоксических и цитопатических изменений. Далее среду

удаляли, клетки фиксировали 80% ацетоном на буфере 0,01М ФСБ (20 минут), хорошо высушивали и отмывали 3 раза ФСБ с 0,05% Твин-20. Все дальнейшие процедуры проводили в соответствии с методикой постановки ИФА для выявления антигена. К клеткам добавляли по 100 мкл раствора ФСБ с 1% фетальной сывороткой и 0,05% Твин-20 и инкубировали при 37°C в течение 30 минут. После удаления раствора к клеткам, инфицированным вирусами гриппа А или В добавляли по 100 мкл моноклональных антител (МКА) к внутренним белкам вируса гриппа А (NP+M1), разведенным 1:1000 на ИФА-растворе и вируса гриппа В (NP+M1), разведенным 1:500 на ИФА-растворе, соответственно. После инкубации с антителами в течение 1 часа при 37°C и последующей 3-х-кратной промывки в лунки вносили по 100 мкл IgG козы против IgG мыши, меченных пероксидазой хрена (Sigma) в разведении 1:5000 и инкубировали ещё 1 час при 37°C. После 4-кратной промывки связанную пероксидазу выявляли добавлением в лунки 100 мкл 0,05% раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в 0,003% цитратном буфере pH=5,0, содержащем 0,003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Планшеты выдерживали 15-30 минут в темноте до появления окраски, реакцию останавливали добавлением 50 мкл 4Н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, далее оптическую плотность (ОП) измеряли на спектрофотометре для измерения оптического поглощения в 96-луночных планшетах при длине волны 450 нм. В качестве клеточного контроля использовали лунки, не зараженные вирусом. Процент ингибирования вирусной репродукции изучаемым соединением определяли по формуле:

$$\text{Ингибирование, \%} = \frac{100 - (ОП_{\text{опыт}} - ОП_{\text{кл. контроль}})}{(ОП_{\text{вир. контроль}} - ОП_{\text{кл. контроль}})}.$$

Для одной точки опыта использовали 4 лунки планшета, из которых определяли среднее значение. Концентрация субстанций, уменьшающая значение ОП на 50% по сравнению с контролем клеток, принималась за 50% ингибирующую концентрацию (ИК<sub>50</sub>).

## **2.7. Инфицирование вирусом в животной модели**

Каждому животному внутри группы был присвоен индивидуальный порядковый номер, мыши распределялись по группам рандомизированно (по массе). 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. Параллельно животным контрольной группы, инфицированным вирусом гриппа и не получавшим лечения, вводили фосфатно-солевой буфер (ФСБ). При изучении аналогов умифеновира группы контроля получали 1% раствор крахмала по схеме введения тестируемых образцов.

### **2.7.1.1. Дизайн исследования и экспериментальные группы для аналогов римантадина**

В первой серии опытов мышей заражали высокой дозой  $10^{4,5}$  ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл. Во второй серии экспериментов использовали низкую дозу, соответствующую  $10^4$ ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл. При изучении эффективности аналогов и метаболитов римантадина была использована следующая схема введения препаратов: соединения и контрольный препарат вводили перорально за 4 часа до и через 4 часа после инфекции и далее в течение 5 дней 2 раза в день. Животные получали соединение 39, 41, а также римантадин в дозах 15, 20, 40 и 60 мг/кг/день.

### **2.7.1.2. Дизайн исследования и экспериментальные группы для аналогов умифеновира**

Мышей заражали в дозе  $10^{4,5}$ ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл. Тестируемые образцы вводили 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 в дозах 30, 60 и 90 мг/кг/день. Введение препарата сравнения (осельтамивира карбоксилат, растворяли в дистиллированной воде) осуществляли 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.

### **2.7.1.3. Дизайн исследования и экспериментальные группы для аналогов балоксавира**

Мышей заражали в двух дозах: в дозе  $10^4$ ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл в первом опыте или  $10^{4,5}$ ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл во втором. Тестируемые аналоги балоксавира и балоксавир вводили непосредственно перед заражением вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09 и через 12 часов после внутрижелудочно.

Группа контроля получала 0,5% раствор гидроксипропилметилцеллюлозы в воде по схеме введения тестируемых образцов.

### 2.7.2. Клиническое наблюдение и оценка массы животных

Активность соединений на модели гриппозной пневмонии мышей оценивали по следующим критериям: выживаемость животных, увеличение средней продолжительности жизни, динамика снижения веса, титру вируса в легких.

За лечеными и контрольными животными вели ежедневное наблюдение в течение 16 полных дней (с момента инфицирования животных вирусом гриппа). Смертность фиксировали ежедневно, как в контрольных, так и в опытных группах.

Мышей взвешивали перед введением исследуемых веществ, с 1 по 5 сутки (ежедневно), далее через день до окончания эксперимента (на 6, 8, 10, 12, 14, 16 дни после заражения вирусом). Уменьшение или увеличение веса рассчитывали отдельно для каждой мыши и выражали в процентах. При этом за 100% принимали вес животного перед инфицированием. Для всех мышей одной группы определяли среднее значение процента потери или увеличения веса.

Процент смертности определяли, как отношение числа павших животных к общему числу зараженных особей в группе. Среднюю продолжительность жизни животных определяли из расчета общего количества дней наблюдения за животными (после заражения) согласно формуле:  $MSD = \sum f(d-1)/n$ , где **f** – количество мышей умерших на день **d**, выжившие мыши также включены в **f** и **d** в этом случае равно 16, **n** - количество мышей в группе.

### **2.7.3. Получение образцов легких мышей для изучения и определение вирусного титра**

На 4 день после инфицирования вирусом гриппа в каждой группе эвтаназировали по 3 мыши и извлекали их легкие в стерильных условиях. После трехкратной промывки в растворе 0,01М фосфатно-солевого буфера (ФСБ), легкие гомогенизировали и ресуспендировали в 1 мл холодного стерильного раствора ФСБ. Суспензию осветляли от клеточного дебриса центрифугированием при 2000g в течение 10 мин и супернатант использовали для определения инфекционного титра вируса в культуре клеток MDCK.

Для определения инфекционного титра вируса, клетки MDCK рассеивали в 96-луночных планшетах со средней плотностью 30000-35000 клеток на лунку и выращивали в минимальной среде Игла (MEM) в присутствии 5% фетальной сыворотки телят, 10 мМ глутамин и антибиотиков (пенициллин 100 МЕ/мл и стрептомицин 100 мкг/мл) до полного монослоя. Перед заражением вирусом клетки 2 раза промывали средой MEM без сыворотки. Готовили 10-кратные разведения каждой пробы вируса из легких (цельный до  $10^{-9}$ ) на среде с добавлением ТРСК-трипсина (2 мкг/мл). Полученными разведениями заражали монослой 4-х лунок 96-луночного планшета. После инкубации при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 часов клетки промывали трижды ФСБ и фиксировали 10% раствором формальдегида при температуре 18–23°C в течение 5 мин. После удаления раствора формальдегида в каждую лунку планшета вносили по 100 мкл 1% раствора кристаллического фиолетового и выдерживали при температуре 18 – 23°C в течение 5 мин. После промывки водой и высушивания планшета в лунки добавляли по 0,1 мл 96% спирта, инкубировали при покачивании (комнатная температура в течение 20 мин), а затем измеряли оптическую плотность при длине волны 570 нм. Лунки считали «положительными», если оптическая плотность в них была меньше оптической плотности в клеточном контроле на 20%. Инфекционный титр вируса определяли по 4 повторам для каждой пробы по

методу Рида и Менча и выражали в  $\lg$  ТЦИД<sub>50</sub>/0,1 мл (тканевой цитопатической инфекционной дозы 50). Далее рассчитывали среднее значение титра для пяти одинаковых проб.

## **2.8. Анализ данных**

Полученные цифровые данные были подвергнуты статистической обработке в программах RStudio (Version 1.0.143) и “Statistica 8.0”. Сравнение выживаемости в группах мышей проводили при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в программе “Statistica 8.0”. Статистически значимыми считали различия между группами, если параметр  $p$  не превышал 0,05. Расчет изменения массы тела проводили с использованием программного обеспечения MS Office Excel 2016. Параметры описательной статистики включали среднее значение показателя в группе и стандартное отклонение (SD). Отличия между выборками оценивали с помощью параметрического критерия Стьюдента дисперсионного анализа (ANOVA) и метода нелинейной регрессии. Различия считали статистически значимыми для значений  $p \leq 0,05$ .

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Противовирусная активности и эффективность для аналогов римантадина

Адамантановые блокаторы канала M2 относятся к первому поколению противовирусных препаратов, эффективных в отношении вируса гриппа типа А. Хотя эти препараты успешно использовали в течение более 30 лет [168, 169], с 2006 года их применение не рекомендовано из-за развития лекарственной резистентности к ним у большинства циркулирующих штаммов [170].

Тем не менее уникальный и громадный опыт успешного клинического применения препаратов адамантанового ряда, показавший их высокую эффективность, оставляет эти препараты в арсенале средств противовирусной терапии на случай возникновения вирусов, чувствительных к ним, но резистентных к другим противогриппозным препаратам, в частности к ингибиторам нейраминидазы.

К сожалению, на сегодняшний день блокаторы M2 канала, а именно амантадин и римантадин, не эффективны против штаммов с мутацией S31N. Последние исследования показали, что синтезированные новые экспериментальные M2-ингибиторы достаточно устойчивы к развитию резистентности [171], а подавляющее большинство возникающих штаммов с соответствующими мутациями [171, 172] не сохраняется в популяции, что позволяет полагать, что разработка таких ингибиторов перспективна.

Ранее в институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН был разработан метод синтеза новых энантиомерно чистых адамантильных производных 1,3-оксазинанов и пиперидинов из соответствующих энантиомерных гомоаллиламинов. Ключевыми стадиями процесса были реакции циклобромометирования, дегидробромометирования под действием  $t\text{BuOK}$  и

енолятизоцианатная перегруппировка. Последние две реакции в случае бромида проводятся в «одной колбе». Дикетон далее постадийно восстанавливали в 4-гидроксилактамы и 4-гидроксипиперидин [165]. Оказалось, что полученные соединения ингибируют *in vitro* репликацию пандемических штаммов H1N1 A/Калифорния/04/2009 и A/IV–Оренбург/29–L/2016 [173]. Оба штамма содержат мутацию S31N, ответственную за резистентность к римантадину/амантадину.

### 3.1.1. Изучение противовирусной активности аналогов римантадина в культуре клеток MDCK в отношении вирусов гриппа А методом иммуноферментного анализа (ИФА)

В первой серии экспериментов была изучена противовирусная активность соединений 1,3-оксазинан-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/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09 и A/IV–Оренбург/29–L/2016(H1N1)pdm16, которые содержат мутацию S31N, ответственную за резистентность к римантадину и амантадину. Оба соединения эффективно подавляли размножение вируса (Таблица 1) [165].

Таблица 1 – Значения ингибирующей концентрации 50 для аналогов римантадина в отношении вируса гриппа А в культуре клеток MDCK

Штамм вируса	ИК50 (ингибирующая концентрация), мкМ		ЦТД <sub>50</sub> , 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; p≤0,05			

Поскольку ингибирующая активность соединений оказалась высокой, в следующей серии опытов была изучена их эффективность *in vivo*.

### **3.1.2. Эффективность исследуемых соединений аналогов римантадина на модели вирусной пневмонии мышей**

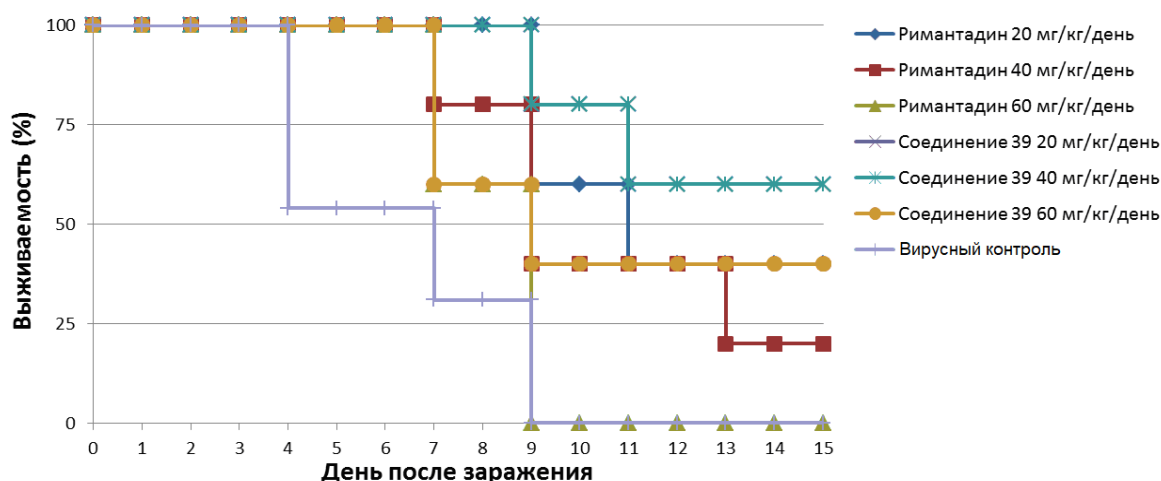
Для исследования на животных были использованы субстанции исследуемых соединений и римантадина в виде готовых растворов 50% водного ДМСО. Исследуемые растворы вводили мышам перорально, соединения 39 и 41 в объеме 200 мкл. Животные получали соединение 39, 41, а также римантадин в дозах 20, 40 и 60 мг/кг/день [165].

В первой серии опытов была изучена эффективность аналогов римантадина с использованием высокой дозы заражения 4,5 lg ТЦИД<sub>50</sub> [165].

В контрольной группе животных, зараженных вирусом гриппа и не получавшей никакого лечения, наблюдалась гибель начиная с 7 дня, которая к 9 дню достигла 100%. Ко дню полной гибели вирусного контроля лечение соединением 39 в дозе 20 и 40 мг/кг/день было наиболее эффективно и защищало 80% животных. Лечение соединениями 41 и римантадином в дозе 20 мг/кг/день защищало от гибели 60% животных. При лечении более высокими дозами всех испытываемых соединений смертности животных от вирусной гриппозной пневмонии была выше (Таблица 2) [165].

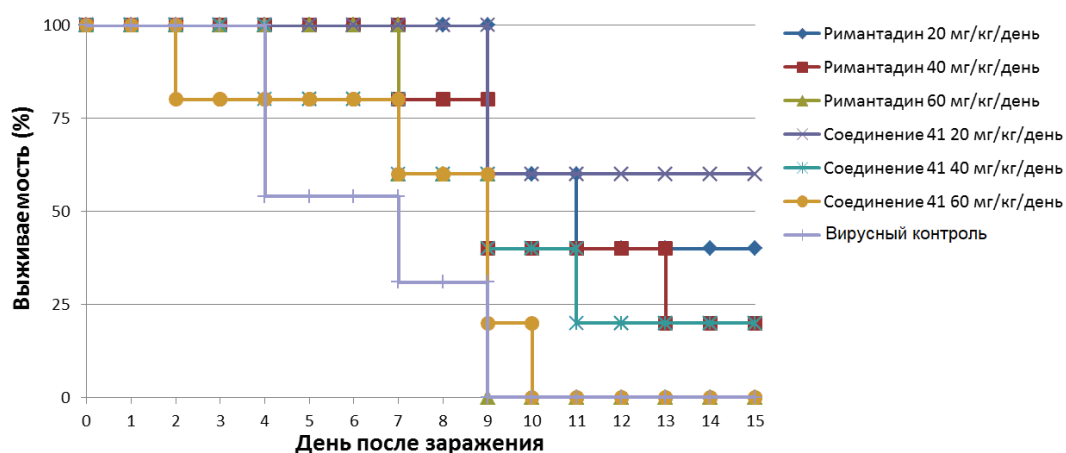
Примечание:  $p \leq 0,05$  рассматривается как достоверное отличие от контроля; для групп римантадина, и соединений 39 и 41  $n=5$ , для вирусного контроля  $n=10$ , где  $n$  – количество мышей в каждой группе

Дальнейшее наблюдение показало, что гибель животных продолжалась, и ко дню окончания опыта больше всего (60%) мышей выжило в группах, леченных соединением 39 в дозах 20 и 40 мг/кг/день, а также соединением 41 в дозе 20 мг/кг/день (Рисунки 21-22, Таблица 3) [165].



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

Рисунок 21 – Выживаемость мышей при лечении аналогом римантадина соединением 39 на модели гриппозной пневмонии мышей



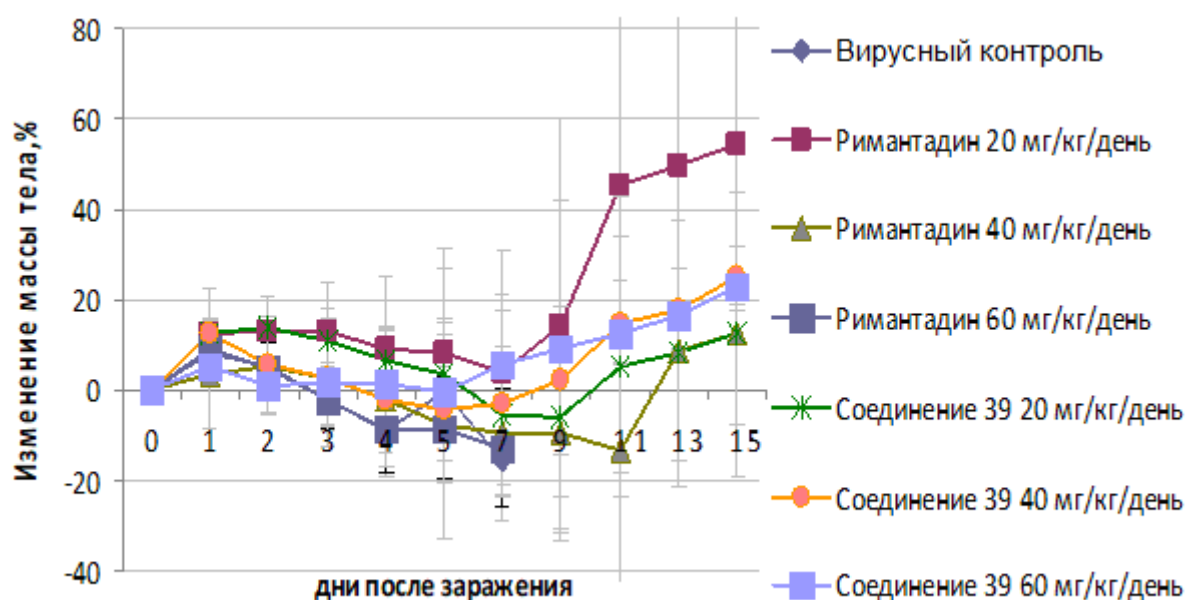
Примечание: Для групп лечёных римантадином и соединением 41  $n=5$ , для вирусного контроля  $n=10$ , где  $n$  – количество мышей в каждой группе;  $p \leq 0,05$

Рисунок 22 – Выживаемость мышей при лечении аналогом римантадина соединением 41 на модели гриппозной пневмонии мышей.

Важно отметить, что при увеличении дозы препаратов до 60 мг/кг/день наблюдалось увеличение смертности. При этом полученные данные по смертности

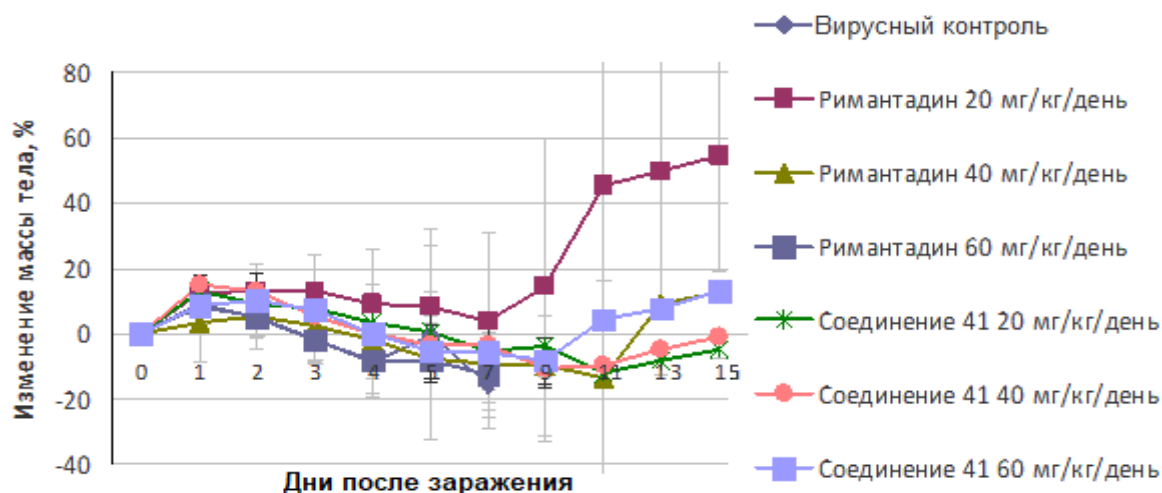
животных были сопоставимы со средней продолжительностью их жизни. При лечении соединением 39 в дозах 20 и 40 мг/кг/день и 41 в дозе 20 мг/кг/день наблюдалось увеличение средней продолжительности в жизни в сравнении с группой вирусного контроля, примерно в 2,5 раза (Рисунки 21-22, Таблица 2) [165].

В группе вирусного контроля, не получавшей лечение, наблюдалась максимальная потеря массы тела, которая составила 18%. При этом при лечении как обоими соединениями в дозе 20 и 40 мг/кг/день, так и римантадином в дозе 20 мг/кг/день наблюдалось снижение потери массы тела. Это совпадает с данным по выживаемости (Рисунки 23-24).



Примечание: Линия показывает среднее значение веса  $\pm$  стандартное отклонение;  $n=10$  где  $n$  — количество мышей в каждой группе;  $p \leq 0,05$

Рисунок 23– Изменение массы тела при лечении аналогом римантадина соединением 39 на модели гриппозной пневмонии мышей.



Примечание: Линия показывает среднее значение веса  $\pm$  стандартное отклонение;  $n=10$ , где  $n$  – количество мышей в каждой группе;  $p \leq 0,05$

Рисунок 24 – Изменение массы тела при лечении аналогом римантадина соединением 41 на модели гриппозной пневмонии мышей.

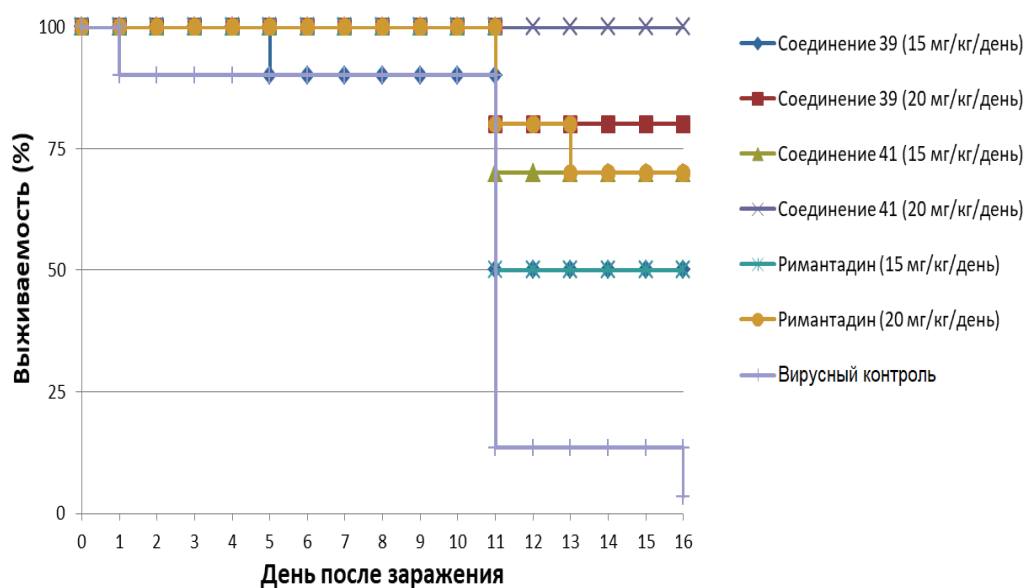
Меньше всего мыши теряли массу тела в тех группах, в которых выживаемость была выше [165].

Во второй серии экспериментов по изучению эффективности аналогов римантадина на основании результатов первого опыта, а также для уточнения, подтверждения и выявления разницы в активности соединений, во втором опыте, была уменьшена доза вируса ( $4.0 \lg \text{ТЦИД}_{50}$ ), а также выбраны следующие дозы препаратов: доза, показавшая максимальную эффективность в первом опыте – 20 мг/кг/день, а также меньшая, не исследованная ранее, доза 15 мг/кг/день.

В группе вирусного контроля гибель наблюдалась со 2 дня и к 16 дню достигла 88%, средняя продолжительность жизни составила 10 дней. Лечение соединениями 41 и 39 было наиболее эффективно при дозе 20 мг/кг/день. При этом соединение 41 в указанной дозе полностью защищало животных от гибели, а лечение соединением 39 и римантадином в этой же дозе защищало 80 и 70% мышей соответственно [165]. При этом применение более низкой дозы 15 мг/кг/день для соединения 39 и римантадина не оказывало статистически значимого влияния на выживаемость, которая составила 50% (Рисунок 25, Таблица 3) [165].

Таблица 3 – Эффективность соединений адамантанового ряда на модели гриппозной пневмонии мышей, инфицированных вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09

Доза, мг/кг/день	Выживаемость		Защита от смертности (%)	Ср. продол- жительность жизни (дни)	Титр вируса, lg ТЦИД <sub>50</sub> /0,1мл
	жив/общее	% смертности			
Соединение 39 (перорально)					
15	5/10 (p=0,075134)	50	40	12,4 (1-5д., 4-11д)	4,5±0,5 (4,5; 5,0; 4,0)
20	8/10 (p=0,001106)	20	70	14 (2-11д.)	1,16±1,6 (0,0,5; 3,0)
Соединение 41 (перорально)					
15	7/10 (p=0,007137)	30	60	13,5 (3-11д)	2,5±2,3 (4,5; 0; 3,0)
20	10/10 (p=0,000000168)	0	100	>16	2,6±2,3 (3,5; 0; 4,5)
Римантадин (перорально)					
15	5/10 (p=0,075134)	50	40	12,5 (5-11д)	1,5±1,5 (0;1,5; 3,0)
20	7/10 (p=0,007137)	30	60	13,7 (2-11д, 1-13д)	1,3±0,3 (1,0;1,5;1,5)
Вирусный контроль					
-	1/9	88	-	10 (1-1д., 7-11д., 1-16д.)	6,1±0,3 (6,0; 6,5; 6,0)
Примечание: p≤0,05 рассматривается как достоверное отличие от контроля; снижение титра в среднем > 2 lg ТЦИД <sub>50</sub> рассматривается как достоверное отличие от контроля					



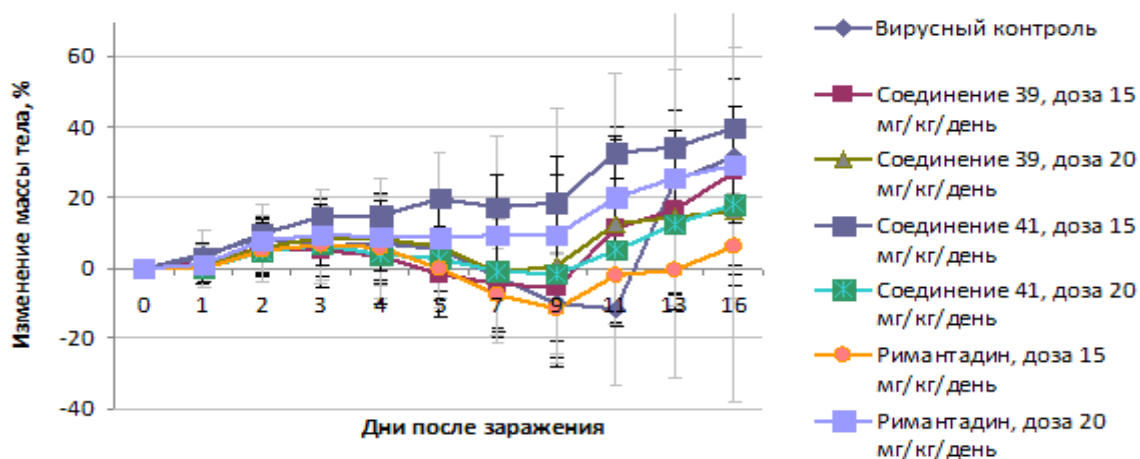
Примечание: n=10, где n – количество мышей в каждой группе;  $p \leq 0,05$

Рисунок 25 – Выживаемость мышей при лечении аналогами римантадина на модели гриппозной пневмонии мышей

По результатам двух опытов доза 20 мг/кг/день обоих соединений увеличивала выживаемость мышей. При этом во втором опыте наблюдалась большая выживаемость мышей, что было связано с уменьшением дозы вируса и с маленькой выборкой в первом опыте, поскольку эффективность соединений обратно пропорциональна дозе заражения [165].

Наибольшее снижение массы тела составило 11% к 11 дню наблюдения в контрольной группе мышей.

При этом снижения массы тела ниже первоначальной массы не наблюдалось в группах, лечёных соединением 39 и римантадин в дозе 20 мг/кг/день, а также соединением 41 в обеих изученных дозах (Рисунок 26).



Примечание: Линия показывает среднее значение веса  $\pm$  стандартное отклонение;  $n=10$ , где  $n$  – количество мышей в каждой группе;  $p \leq 0,05$

Рисунок 26 – Изменение массы тела мышей при лечении аналогами римантадина на модели гриппозной пневмонии мышей

В этих же группах выживаемость была выше, чем в других, что подтверждает эффективность исследуемых соединений.

Важным показателем является титр вируса, поскольку отражает количество вируса и его высокое значение соответствует более тяжёлым патологическим изменениям в лёгких и более тяжёлой форме инфекции. Полученные данные о выживаемости животных при лечении соединениями и римантадином подтверждены вирусологическим методом. В контрольной группе животных титр вируса в лёгких был наибольший ( $6,1 \pm 0,3 \lg \text{ТЦИД}_{50}/0,1 \text{мл}$ ) [165] (Таблица 3).

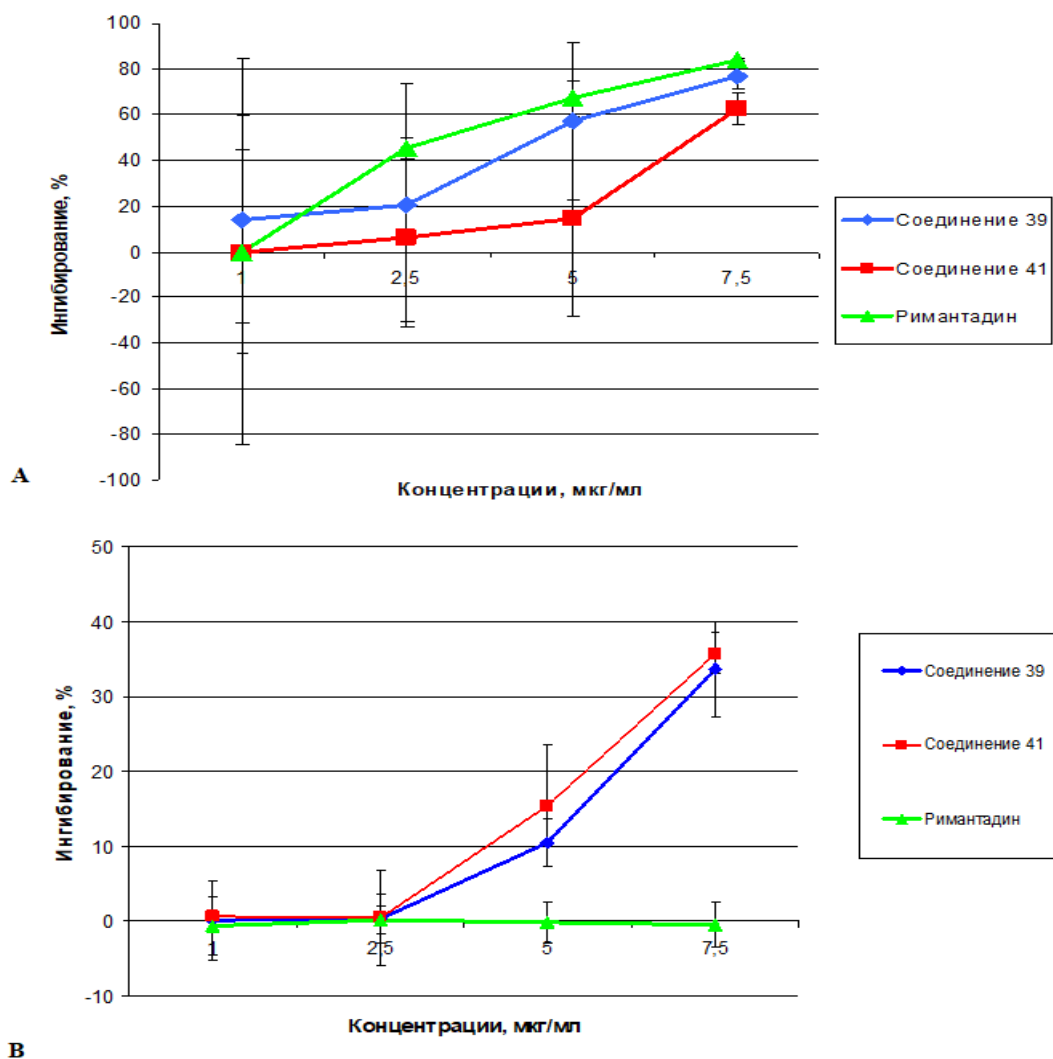
Титр вируса снижался при применении соединения 39 в дозе 20 мг/кг/день, соединения 41 и римантадина в обеих исследуемых дозах, что указывает на его ингибирование. Эти данные соответствуют клиническим параметрам эффективности лечения для этих соединений. При лечении соединением 39 титр вируса зависел от применяемой дозы и снижался с её увеличением. Это совпадало с полученными данными по изменению массы тела и выживаемости животных: наибольшая доза 20 мг/кг/день наиболее эффективна.

### **3.1.2. Изучение возможности возникновения резистентности к аналогам римантадина соединениям 39 и 41 на фоне их приема**

Известно, что появление устойчивых к препаратам адамантанового ряда штаммов в культуре клеток и в организме животных происходит через 2–3 пассажа, в человеческой популяции такие штаммы могут появляться уже через 2–4 дня после начала лечения. Именно поэтому в следующей серии экспериментов была изучена возможность развития резистентности к соединениям 39 и 41 на фоне их приема. Вирусы, выделенные из легких мышей на 4-й день после приема как обоих соединений, так и римантадина, были протестированы на чувствительность к этим препаратам в культуре клеток. В качестве контрольного образца использовался вирус гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2), который обладал чувствительностью к римантадину. Полученные данные показали, что оба соединения обладали активностью в отношении вируса гриппа А/Аичи/2/68, как и римантадин.

При этом вирусы, выделенные из легких мышей, инфицированных римантадин-резистентным штаммом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09, получавших соединения 39 и 41, сохраняли чувствительность к этим препаратам. Это свидетельствует об отсутствии развития резистентности после многократного применения соединений 39 и 41. В то же время вирус, выделенный из легких животных, получавших римантадин, сохранял резистентным к нему (Рисунок 27).

Таким образом, в ходе исследования не было выявлено возникновения резистентности к соединениям 39 и 41 при их использовании, в отличие от римантадина [165].



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

Рисунок 27 – 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 (В)

Таким образом, была исследована противовирусная активность соединений 39 и 41 на культуре клеток, полученные данные показывают, что оба соединения эффективно подавляют размножение вируса гриппа А.

Полученные данные показали, что применение обоих соединений для лечения гриппозной инфекции эффективно в изученных дозах, обеспечивая выживаемость 60-100% животных, снижая потерю массы тела, увеличивая

среднюю продолжительность жизни. Так же наблюдалось снижение титра вируса в лёгких животных по сравнению с группой вирусного контроля. Соединения 39 и 41 показали большую эффективность по сравнению с римантадином в тех же дозах и схеме лечения. Проведённое исследование чувствительности вирусов, выделенных из лёгких животных после 5-ти дневного курса лечения аналогами римантадина, в клеточной культуре MDCK, не выявило возникновения резистентности [165].

*Материалы раздела 3.1. опубликованы в [165]*

### **3.2. Противовирусная активность и эффективность для аналогов умифеновира**

Умифеновир — это противовирусный препарат широкого спектра действия, который демонстрирует доказанную эффективность против различных вирусов, в том числе вирусов гриппа типов А и В. Он безопасен и хорошо переносится организмом человека.

Однако ограничивающими его использование факторами являются особенности растворимости и биодоступности, что обуславливает необходимость применения неудобных для пациента схем лечения, а также несовершенство или отсутствие некоторых лекарственных форм, в частности для лечения тяжелых случаев гриппозной инфекции. Кроме того, умифеновир обладает узким терапевтическим окном в культуре клеток, однако при лечении людей токсического эффекта не наблюдается. Поэтому ведутся работы по разработке эффективных аналогов, которые обладали бы большей биодоступностью по сравнению с умифеновира и при этом не меньшей эффективностью в отношении вирусов гриппа А и В.

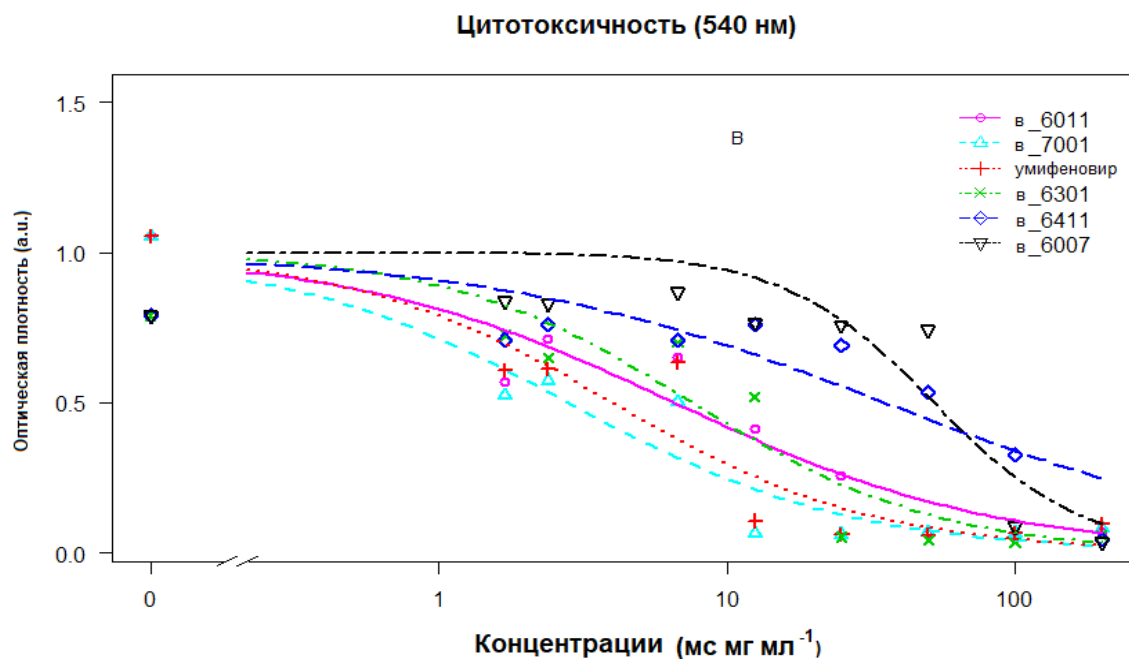
Нами было изучено 10 аналогов умифеновира, а именно производных 6-гидроксibenзотиофена, которые были синтезированы в фармацевтической компании АО «Отисифарм».

### 3.2.1. Изучение цитотоксического действия аналогов умифеновира в культурах клеток

В первой серии опытов были изучены серийные разведения аналогов умифеновира, растворенных в ДМСО, для определения ЦТД<sub>50</sub>. Были использованы линии клеток MDCK, Vero CCL81, HEp-2 и Vero E6, в которых в дальнейшем определялась противовирусная активность для соответствующих вирусов. Данные определения цитотоксического действия образцов препаратов в культурах клеток представлены в Таблице 4 и на Рисунках 28-32.

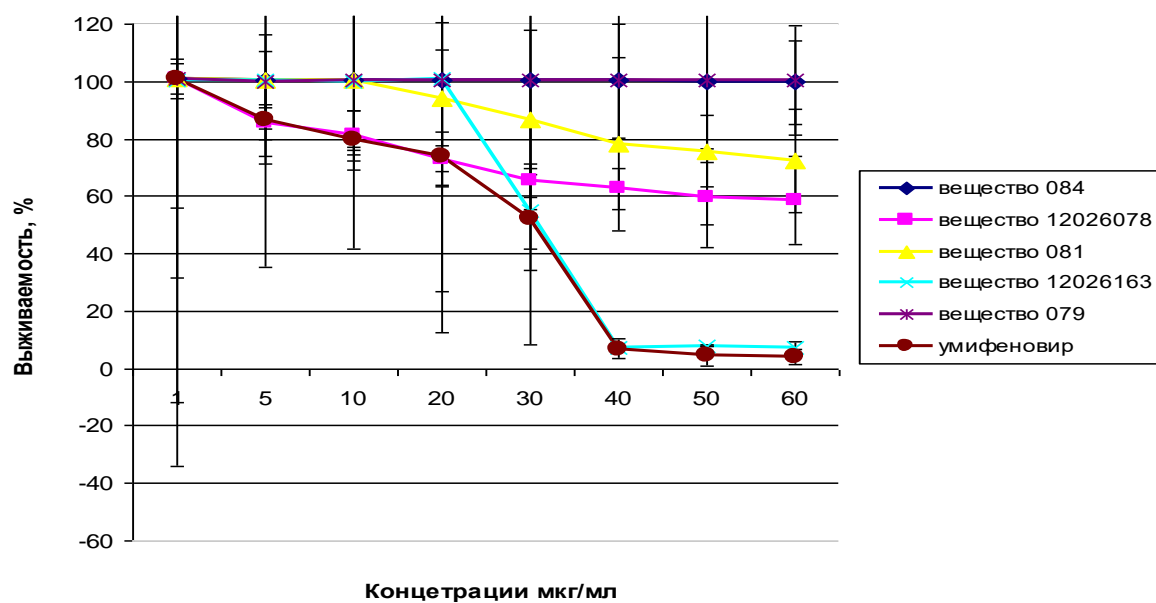
Таблица 4 – Цитотоксичность аналогов умифеновира в культурах клеток пермиссивных для возбудителей ОРВИ

Вещества	Культуры клеток, ЦТД <sub>50</sub> , 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
11926011	14,7±2,9	*н/и	н/и	н/и
11926007	14,4±2,0	н/и	н/и	н/и
11826301	15,01±1,3	н/и	н/и	н/и
11826411	40,5±3,6	н/и	н/и	н/и
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: н/и – не исследовали*; p≤0,05				



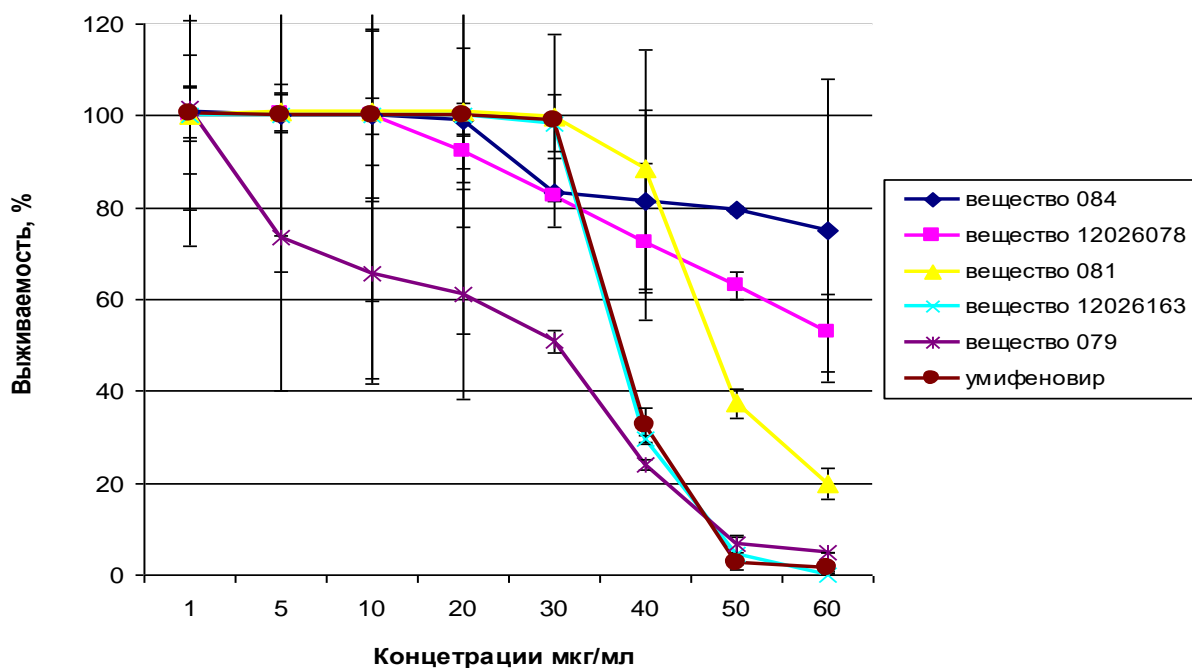
Примечание: Линия показывает среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение;  $p \leq 0,05$

Рисунок 28 – Цитотоксичность различных концентраций аналогов умифеновира в культуре клеток MDCK

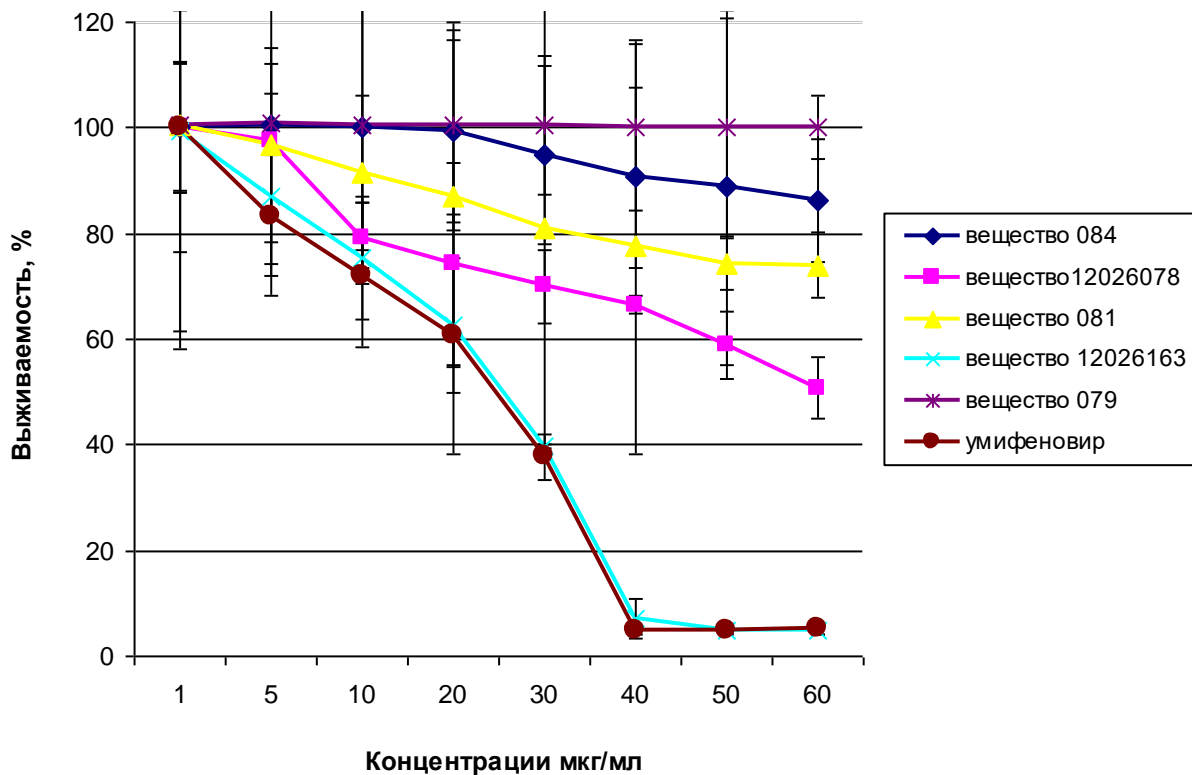


Примечание: Линия показывает среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение;  $p \leq 0,05$

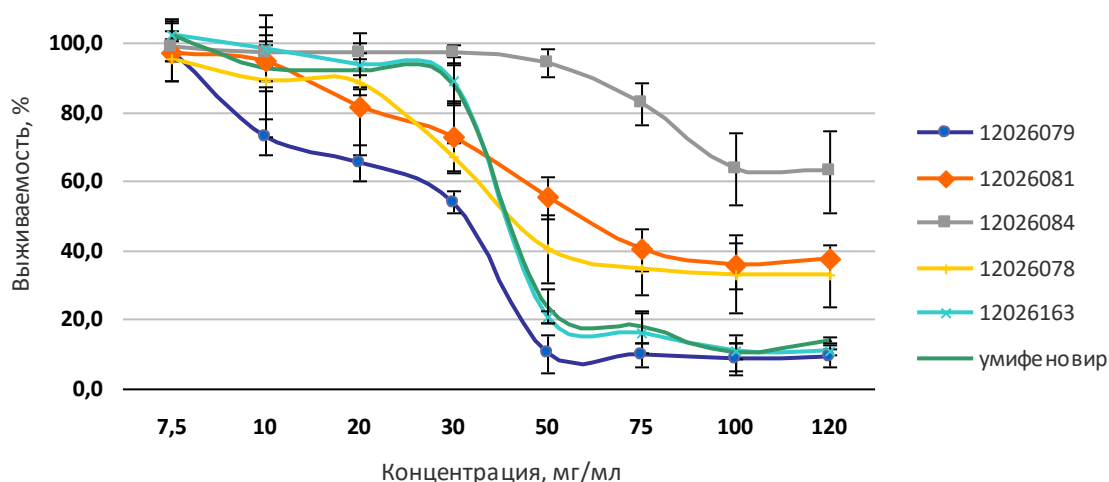
Рисунок 29 – Цитотоксичность различных концентраций аналогов умифеновира в культуре клеток MDCK,  $p < 0,05$



Примечание: Линия показывает среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение;  $p \leq 0,05$   
 Рисунок 30 – Цитотоксичность различных концентраций аналогов урифеновира в культуре клеток Vero CCL81



Примечание: Линия показывает среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение;  $p \leq 0,05$   
 Рисунок 31 – Цитотоксичность различных концентраций аналогов урифеновира в культуре клеток Vero E6



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

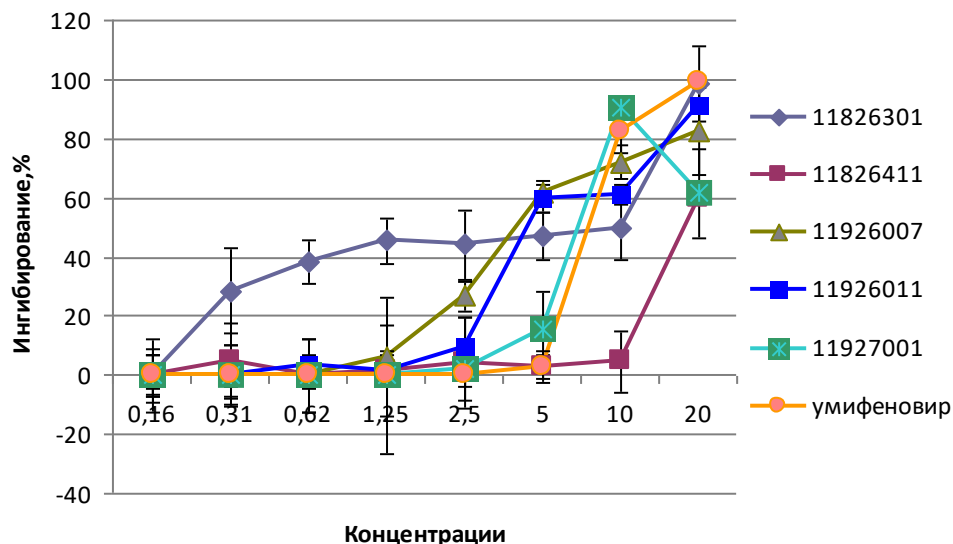
Рисунок 32 – Цитотоксичность различных концентраций аналогов умифеновира в культуре клеток HEp-2

Цитотоксичность субстанции умифеновира и умифеновира, синтезированного для опыта (шифр 12026163), совпадала и была примерно сходной для всех изученных линий клеток. ЦТД<sub>50</sub> колебались от 30,0257 до 41,2991 мкг/мл. 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 были малотоксичны, их значения ЦТД<sub>50</sub> были близки или превышали 100 мкг/мл.

### 3.2.2. Изучение противовирусной активности аналогов умифеновира в культуре клеток MDCK в отношении вирусов гриппа А методом иммуноферментного анализа (ИФА)

Изучение противовирусного действия предоставленных соединений в культуре клеток MDCK было проведено методом ИФА. Для заражения клеточной культуры была использована множественность заражения клеток вирусом гриппа

А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09 – 0,01 БОЕ/на клетку. В качестве препарата сравнения был использован умифеновир, растворенный в ДМСО. Полученные результаты, представлены на Рисунке 33.



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

Рисунок 33 – Зависимость ингибирования вирусной репродукции вируса гриппа А/Калифорния/04/09 (пндм H1N1) в культуре клеток MDCK от концентрации аналогов умифеновира

Специфическим (селективным) считали подавление вирусной репродукции образцом, если эффективность подавления увеличивалась с увеличением концентрации образца, при этом достоверным ингибированием считалось ингибирование не менее 30%. Видно, что практически все соединения специфически ингибировали репродукцию вируса гриппа, ингибирование увеличивалось пропорционально с увеличением их концентрации.

Из полученных в проведенных экспериментах данных о противовирусной активности различных концентраций соединений выведены значения ИК50, которые обобщены в Таблице 5.

Таблица 5 – Значения ингибирующей концентрации 50 и цитотоксической дозы 50 для умифеновира и его аналогов в отношении вируса гриппа А/Калифорния/04/09 (пндм H1N1) в культуре клеток MDCK

	Соединения					
	Умифеновир	11826301	11826411	11926007	11926011	11927001
ИК <sub>50</sub> *, мкг/мл	7,1±0,31	10±0,24	18±0,20	4±0,27	4,6±0,33	7,8±0,29
ЦТД <sub>50</sub> **, 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*** ЦТД <sub>50</sub> /ИК <sub>50</sub>	4,3	1,5	2,25	3,6	3,1	0,69
Примечания: *ИК <sub>50</sub> – ингибирующая концентрация, 50** ЦТД <sub>50</sub> – цитотоксической дозы 50; ***ИС – индекс селективности, определялся как отношение ЦТД <sub>50</sub> к ИК <sub>50</sub> ; p≤0,05						

Используемый в качестве препарата сравнения умифеновир, приготовленный по протоколу растворения в спирте, показал высокую специфическую противовирусную активность, при этом значения ИК<sub>50</sub> в отношении вируса гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09 входили в диапазон концентраций, оцениваемых как активных, для лабораторных и эталонных штаммов вирусов гриппа.

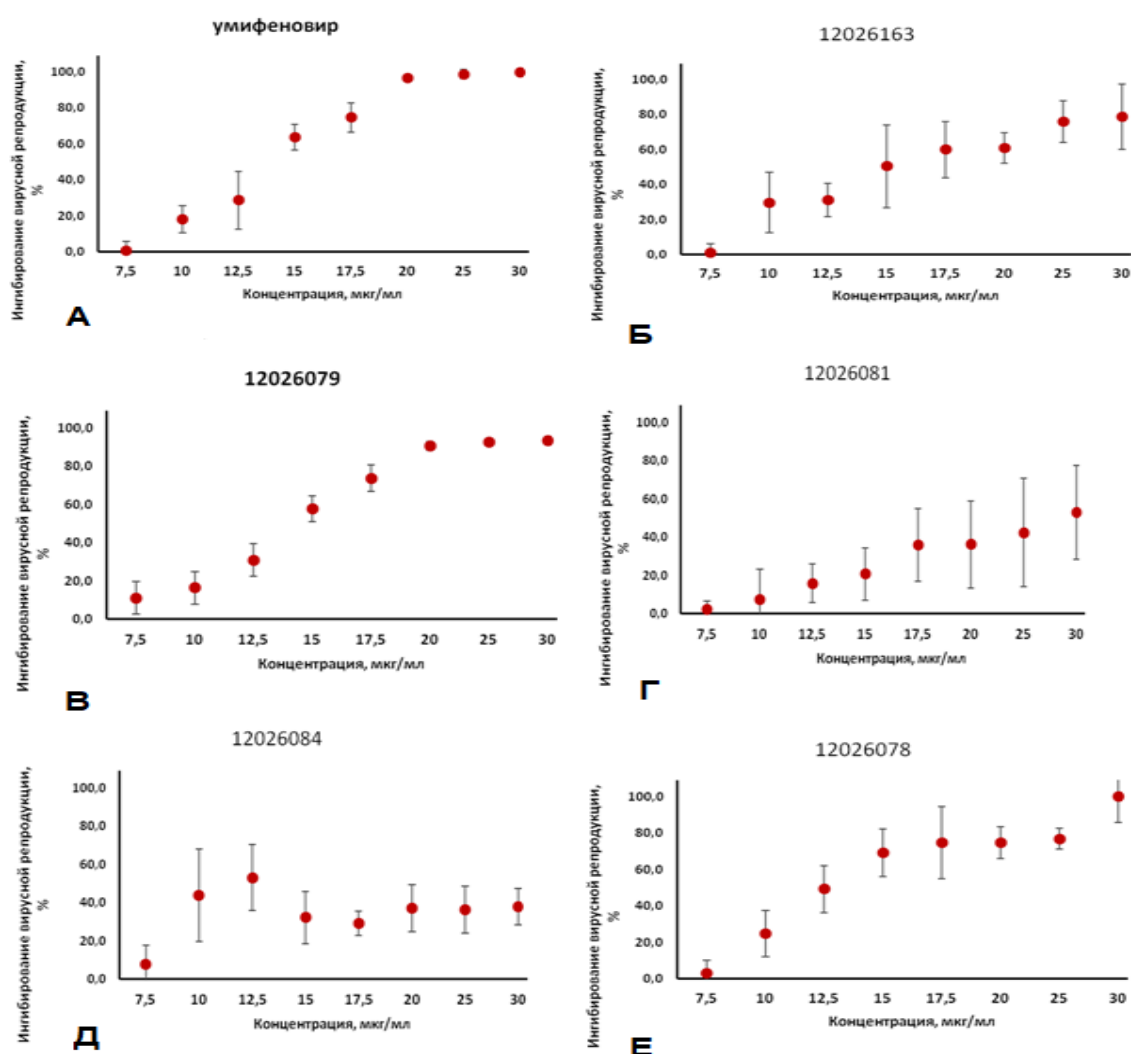
### 3.2.3. Изучение противовирусной активности аналогов умифеновира в культуре клеток MDCK в отношении вирусов гриппа В методом иммуноферментного анализа

Для исследования активности аналогов умифеновира в отношении вируса гриппа В были выбраны концентрации, которые были изучены при определении цитотоксичности для каждого из изучаемых препаратов. Для заражения клеточной культуры была использована множественность заражения клеток вирусами гриппа В – 0,01 БОЕ/на клетку. В качестве препарата сравнения был использован умифеновир в диапазоне таких же концентраций, как и исследуемый соединения. Полученные результаты представлены в Таблице 6 и на Рисунке 34.

Таблица 6 – Значения ингибирующей концентрации 50 аналогов умифеновира в отношении вируса гриппа В/Вашингтон/02/2019 (линия Виктория) в культуре клеток MDCK

Соединения	Умифеновир	12026163	12026078	12026079	12026081	12026084
ИК <sub>50</sub> *, 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 <sub>50</sub> **, мкг/мл	32,7±4,7	30,02±0,11	40,71±0,03	>100	31,12±0,09	>100
ИС*** ЦТД <sub>50</sub> /ИК <sub>50</sub>	1,8	1,86	4,57	>6,8	1,21	>100

Примечания: \*ИК<sub>50</sub> – ингибирующая концентрация 50; \*\*ЦТД<sub>50</sub> – цитотоксической дозы 50; \*\*\*ИС – индекс селективности, определялся как отношение ЦТД<sub>50</sub> к ИК<sub>50</sub>; p≤0,05



Примечание: Линия показывает среднее значение ± стандартное отклонение; p≤0,05

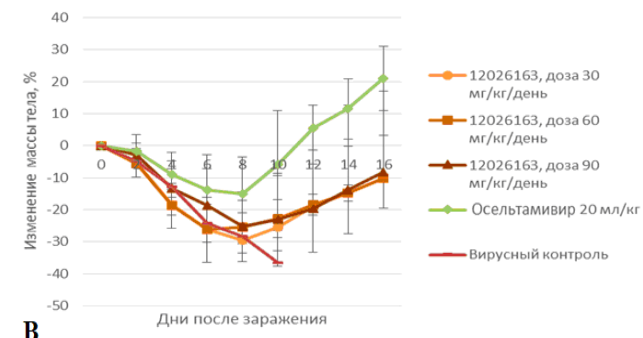
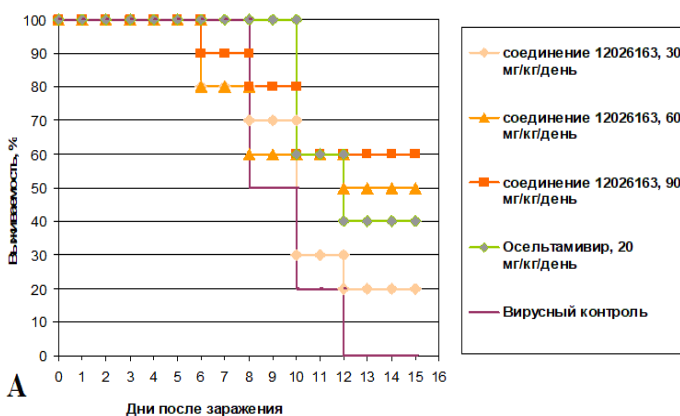
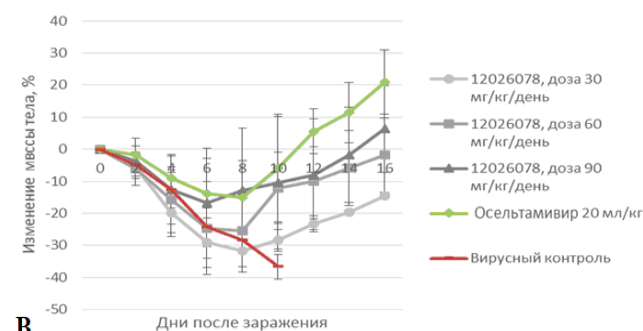
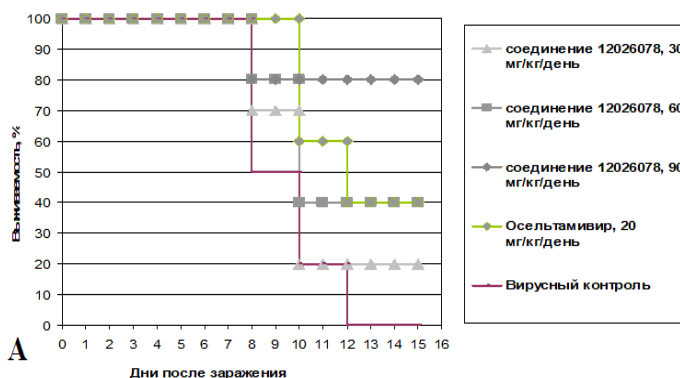
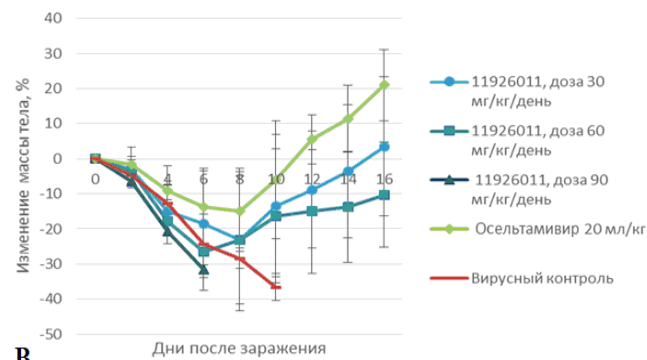
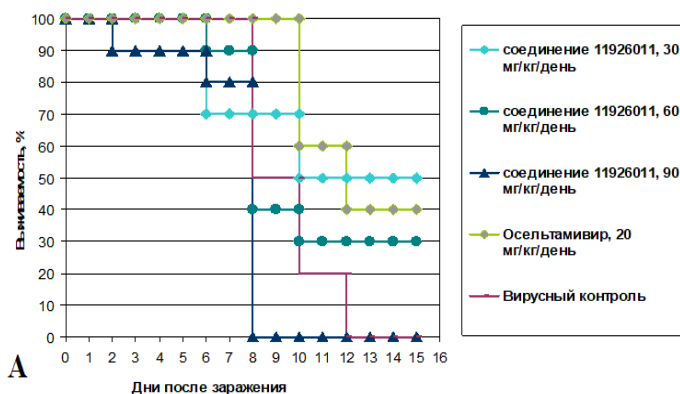
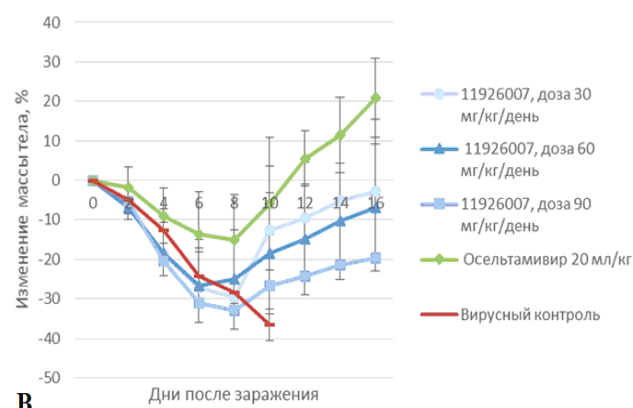
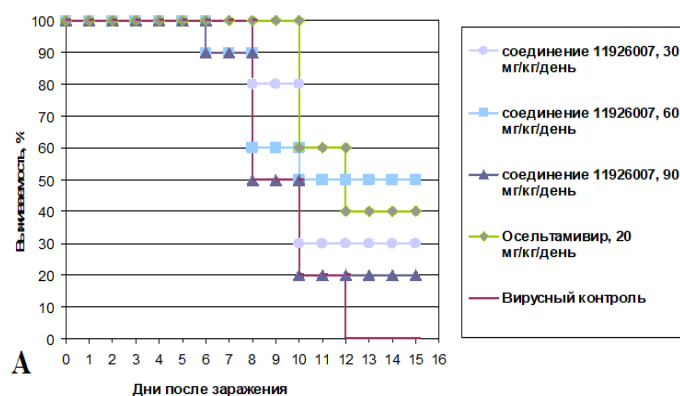
Рисунок 34 – Противовирусная активность умифеновира (А) и его аналогов (Б, В, Г, Д, Е) в отношении вируса гриппа В/Вашингтон/02/2019 (линия Виктория) в культуре клеток MDCK

Специфическим (селективным) считали подавление вирусной репродукции образцом выше 30%, и при том, что эффективность подавления увеличивалась с увеличением концентрации образца. Из полученных данных видно, что все изученные соединения специфически ингибировали репродукцию вируса гриппа, ингибирование увеличивалось пропорционально с увеличением концентрации. На основании полученных результатов были построены кривые доза-ответ, из которых видно, что наибольшей активностью обладали соединения 12026078 и 12026079, которые при нетоксических в культуре клеток MDCK концентрациях практически от 17,5 до 30 мкг/мл практически полностью подавляли размножение вируса. Их активность была сравнима с активностью умифеновира (соединение 12026163), взятого в качестве препарата сравнения, которая также увеличивалась с увеличением его концентрации. Значения ИК<sub>50</sub>, полученные при построении кривых, для соединений 12026078 и 12026079 и умифеновира 12026163 составляли 8,89, 14,62 и 16,1 мкг/мл соответственно. При этом наиболее высокое значение селективного индекса было у соединений 12026078 и 12026079, превосходя значение умифеновира. Наименее цитотоксичны были соединения 12026081 и 12026084. Однако ингибирование ими вируса гриппа В в культуре клеток было ниже, чем у остальных соединений, составляя 30-40% при концентрации 17,5 мкг/мл. Дальнейшее увеличение концентрации не приводило к значительному увеличению ингибирования.

### **3.2.3. 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 качестве препарата сравнения использовали осельтамивир в дозе 20

мг/кг/день. Мышей заражали вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09 в дозе  $10^{4,5}$  ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл. В группе вирусного контроля к 12 дню наблюдения погибли все мыши, средняя продолжительность жизни в группе вирусного контроля составляла 8,7 дня. Заражение вирусом также вызывало значительную потерю веса мышей, более 30% к 10 дню исследования (Рисунок 35, Таблица 7).



Примечание: Линия показывает среднее значение веса  $\pm$  стандартное отклонение,  $p \leq 0,05$ ,  $n=10$ , где  $n$  – количество животных в каждой группе

Рисунок 35 – Выживаемость мышей (А) и изменение массы тела мышей (В) при лечении аналогами умифеновира (11926007, 11926011, 12026078, 12026163) при заражении вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09

Таблица 7 – Эффективность аналогов умифеновира на модели гриппозной пневмонии мышей при заражении адаптированным к мышам вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09

Доза, мг/кг	Выживаемость		Защита от смертно сти (%)	Ср. продол- жительность жизни, дни	Титр вируса, lg ТЦИД <sub>50</sub> /0,1мл*
	жив/общее	% смертн ости			
11926007					
30	3/10 (p=0,065169)	70	30	10,2 (1-6д.,1-8д.,5-10д.)	4,58±0,38 (5; 4,5; 4,25)
60	5/10 (p=0,007685)	50	50	11,0 (1-6д.,3-8д.,1-10д.)	4±0,5 (3,5; 4; 4,5)
90	2/10 (p=0,150950)	80	20	9,0 (1-6д.,4-8д.,3-10д.)	3,67±0,76 (4,5; 3; 3,5)
11926011					
30	5/10 (p=0,007685)	50	50	10,8 (3-6д.,2-10д.)	4,83±0,76 (5,5; 4; 5)
60	3/10 (p=0,065169)	70	30	9,4 (1-6д.,5-8д.,1-10д.)	3,83±0,76 (4,5; 4; 3)
90	0/10	100	0	6,2 (1-2д.,1-6д.,8-8д.)	3,67±0,58 (4; 3; 4)
12026078					
30	2/10 (p=0,150950)	80	20	9,6 (3-8д.,5-10д.)	4,67±0,76 (5,5; 4; 4,5)
60	4/10 (p=0,024770)	60	40	11,0 (2-8д.,4-10д.)	3,33±1,15 (4; 4; 2)
90	8/10 (p=0,000011)	20	80	13,4 (2-8д.)	2,67±1,15 (2; 4; 2)
12026163					
30	2/10 (p=0,150950)	80	20	9,4 (2-6д.,1-8д.,4-10д.,1-12д.)	5±0,5 (4,5; 5,5; 5)
60	5/10 (p=0,007685)	50	50	11,0 (2-6д.,2-8д.,1-12д.)	3,67±0,58 (4; 4; 3)
90	6/10 (p=0,001735)	40	60	12,0 (1-6д.,1-8д.,2-10д.)	3,17±0,29 (3; 3; 3,5)

## Продолжение Таблицы 7

Доза, мг/кг	Выживаемость		Защита от смертно сти (%)	Ср. продол- жительность жизни, дни	Титр вируса, lg ТЦИД <sub>50</sub> /0,1 мл*
	жив/общее	% смертн ости			
Осельтамивир					
20	4/10 (p=0,024770)	60	40	11,8 (4-10д.,2-12д.)	2,67±0,58 (3; 3; 2)
Вирусный контроль					
	0/10			8,4 (5-8д.,3-10д.,2-12д.)	6,83±0,76 (7,5; 6; 7)
Примечания: p≤0,05 рассматривается как достоверное отличие от контроля; *ТЦИД <sub>50</sub> - тканевая цитопатическая инфекционная доза 50; снижение титра в среднем > 2 lg ТЦИД <sub>50</sub> рассматривается как достоверное отличие от контроля; n=10, где n – количество животных в каждой группе					

Кроме того, титр вируса из легких животных контрольной группы на 4 день после заражения вирусом гриппа А/Калифорния/04/09 (H1N1) был высоким 6,83±0,76 lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл, что и обуславливало гибель животных от вирусной пневмонии.

При лечении соединениями 11926007, 11926011, 12026078 наибольшая выживаемость (50%) и наименьшая потеря веса наблюдалась при самой низкой 30 мг/кг/день (11926011) и при средней 60 мг/кг/день (11926007) из изучаемых доз, однако увеличение дозы приводило к увеличению смертности (100-80%) и большей потери веса. В то же время при увеличении дозы несмотря на высокую смертность наблюдалось более значительное ингибирование размножения вируса в легких (более 2-3 lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл), что позволяет предположить, что высокая смертность при высоких дозах соединений обусловлено их токсическими свойствами.

Лечение соединением 12026078 не давало статистически значимых отличий по клиническим показателям от контрольной группы животных, заражённых вирусом гриппа. Однако при увеличении дозы до 60 мг/кг/день соединение 12026078 достоверно увеличивалась выживаемость животных до 40%, снижалась потеря массы тела и увеличивалась продолжительность жизни. При дальнейшем увеличении дозы наблюдалась увеличение выживаемости до 80%, а также

предотвращение потери массы тела. Клинические данные полностью соотносились с размножением вируса в легких животных, при увеличении дозы препарата снижение титра вируса в легких по сравнению с титром вируса в группе контроля увеличивалось примерно на 2-4 lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл. Лечение соединением 12026078 по все параметрам было сравнимо с лечением умифеновиром (12026163 соединение). Эффективность данного соединения на животной модели превосходила контрольный препарат осельтамивир, который защищал от гибели 40% животных, предотвращал потерю ими массы тела, увеличивал продолжительность их жизни в 1,4 раза и снижал размножение вируса в легких более, чем на 4 lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл (Таблица 7, Рисунок 35).

В следующей серии экспериментов на основании результатов первого опыта и для уточнения и подтверждения активности двух соединений, повторно изучили соединение 11926007, 11926011 12026078, изменив их дозы. В первом опыте при использовании высоких доз соединений 11926007 и 11926011 предположительно наблюдались токсические эффекты, поэтому во второй серии экспериментов нами были изучены более низкие дозы. Таким образом, животные получали соединение 11926007 и 11926011 в дозах 20, 30, 60 и соединение 12026078 в дозах 60, 90, 120, а также препарат сравнения осельтамивир 20 мг/кг/день.

В группе вирусного контроля к 12 дню наблюдения погибли все животные, кроме того, сразу после заражения мыши постоянно теряли вес, на 6-8 дни после инфекции наблюдалась значительная потеря веса (более 20%), средняя продолжительность жизни составляла 7,4 дня. Титр вируса в легких контрольной группы животных, заражённых вирусом гриппа, составлял  $6,08 \pm 0,88$  lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл.

Результаты, полученные во втором опыте, практически полностью совпадали с результатами первого опыта. Также как и в первом опыте при лечении этими соединениями наибольшая выживаемость (60-70%) и наименьшая потеря веса наблюдалась в дозах 30 мг/кг/день (11926011) и 60 мг/кг/день (11926007). При применении более низкой дозы 20 мг/кг/день выживало 30-40% животных. В дозе 60 мг/кг/день лечение соединением 12026078 достоверно защищало от гибели 60%

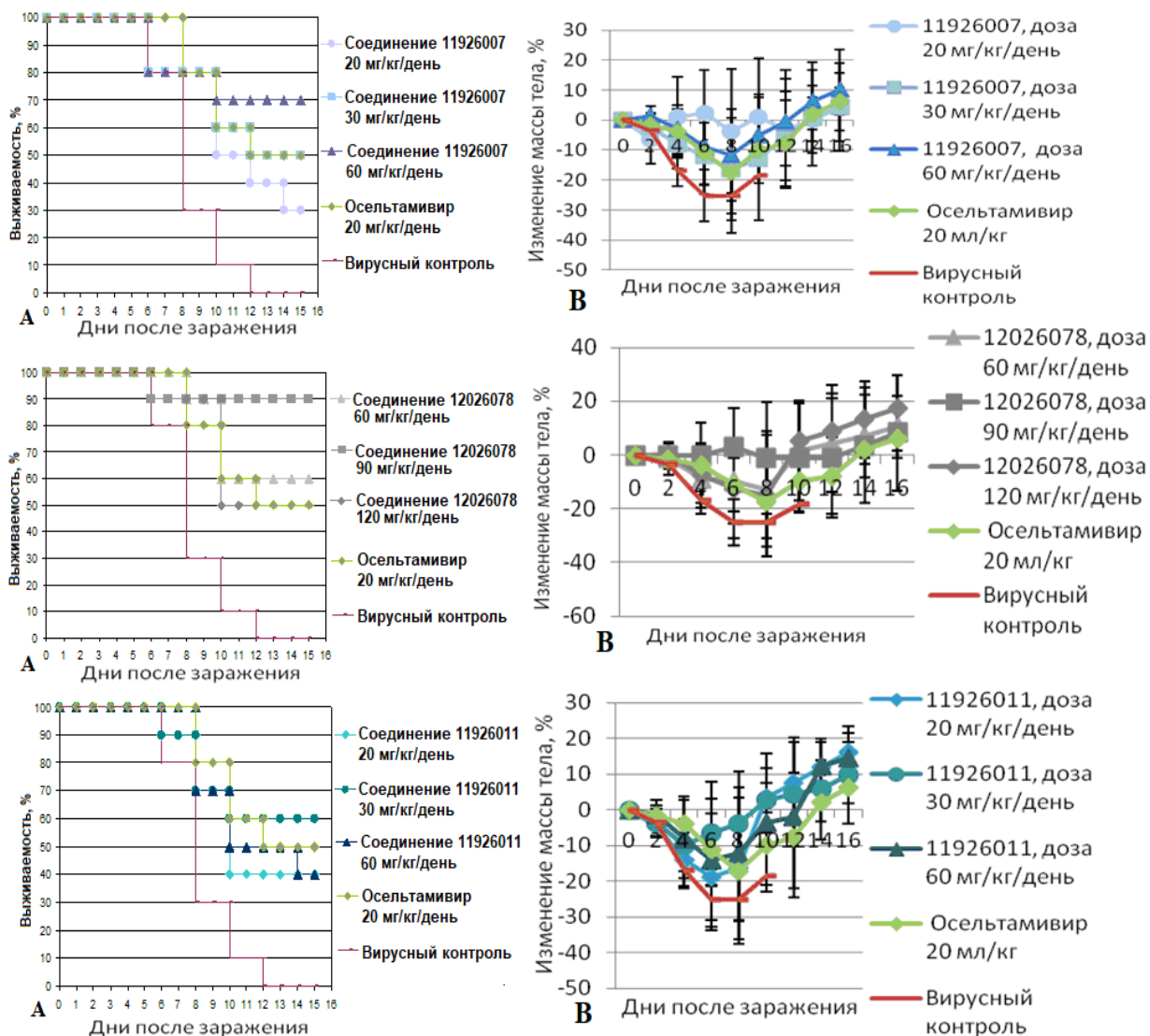
животных, предотвращало потерю ими веса, увеличивало продолжительность их жизни в 1,7 раза. Также как и в первом опыте наиболее эффективным для соединения было лечение им в дозе 90 мг/кг/день, которое защищало от гибели 90% животных, полностью предотвращало потерю ими веса, увеличивало продолжительность их жизни почти в 2 раза и значительно снижало размножение вируса в легких (примерно на 4 lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл). При увеличении дозы до 120 мг/кг/день наблюдалось увеличение смертности животных и потеря ими массы тела, а титр вируса не отличался от титра вируса при наиболее эффективном лечении этим соединением в дозе 90 мг/кг/день ( $2,68 \pm 1,15$  vs  $2,33 \pm 0,58$  lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл). Лечение соединением 12026078 в дозах 60 и 90 мг/кг/день было примерно одинаково эффективным по всем параметрам с лечением животных инфицированных вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09 препаратом умифеновир (12026163 соединение). Кроме того, лечение соединением 12026078 было более эффективно, чем лечение препаратом осельтамивир сравнения, которое защищало от гибели 50% животных, предотвращало потерю ими веса, увеличивало продолжительность их жизни в 1,6 раза и снижало размножение вируса в легких более чем на 4 lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл (Таблица 8, Рисунок 36).

Таблица 8 – Эффективность аналогов умифеновира на модели гриппозной пневмонии мышей при заражении адаптированным к мышам вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09

Доза, мг/кг	Выживаемость		Защита от смертно сти (%)	Ср. продол- жительность жизни, дни	Титр вируса, lg ТЦИД <sub>50</sub> /0,1мл*
	жив/общее	% смертн ости			
11926007					
20	3/10 (p=0,065169)	70	30	10,6(2-6д.,3-10д.,1-12д., 1-14д.)	4,25±1 (5,25; 4,25; 3,25)
30	5/10 (p=0,007685)	50	50	11,4 (2-6д.,2-10д.,1- 12д.)	3,33±0,58 (3; 4; 3)
60	7/10 (p=0,000231)	30	70	12,8 (2-8д.,1-10д.)	3,17±0,29 (3; 3; 3,5)
11926011					
20	4/10 (p=0,024770)	60	40	10,6 (1-6д.,2-8д.,3-10д.)	4,25±0,9 (5,25; 4; 3,5)
30	6/10 (p=0,001735)	40	60	11,8 (1-6д.,2-8д.,1-10д.)	3±1 (2; 4; 3)
60	4/10 (p=0,024770)	60	40	11,2 (3-8д.,2-10д.,1- 14д.)	3±1 (2; 3; 4)
12026078					
60	6/10 (p=0,001735)	40	60	12,4 (1-8д.,3-10д.)	4,25±0,25 (4,25; 4; 4,5)
90	9/10 (p=0,000000 044)	10	90	14,0 (1-6д.)	2,68±1,15 (2; 4; 2)
120	5/10 (p=0,007685)	50	50	11,8 (1-8д., 4-10д.)	2,33±0,58 (2; 3; 2)

Продолжение Таблицы 8

Доза, мг/кг	Выживаемость		Защита от смертно сти (%)	Ср. продол- жительность жизни, дни	Титр вируса, lg ТЦИД <sub>50</sub> /0,1мл*
	жив/общее	% смертн ости			
Осельтамивир					
20	5/10 (p=0,007685)	60	50	11,8 (2-8д.,2-10д.,1- 12д.)	2,25±0,43 (2,75; 2; 2)
Вирусный контроль					
	0/10	100	0	7,4 (2-6д.,5-8д.,2-10д.,1- 12д.)	6,08±0,88 (5,25; 6; 7)
Примечания: p≤0,05 рассматривается как достоверное отличие от контроля; *ТЦИД <sub>50</sub> - тканевая цитопатическая инфекционная доза 50; снижение титра в среднем > 2 lg ТЦИД <sub>50</sub> рассматривается как достоверное отличие от контроля; n=10, где n – количество животных в каждой группе					



Примечание: Линия показывает среднее значение веса  $\pm$  стандартное отклонение;  $p \leq 0,05$ ;  $n=10$ , где  $n$  – количество животных в каждой группе

Рисунок 36 – Выживаемость мышей (А) и изменение массы тела мышей (В) при лечении аналогами умифеновира (11926007, 12026078, 11926011) при заражении вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09

Таким образом, была изучена цитотоксичность на различных культурах клеток аналогов умифеновира и их противовирусная активность в отношении вирусов гриппа А и В *in vitro*. Также была изучена эффективность аналогов умифеновира на животной модели.

В ходе изучения аналогов умифеновира были выявлены соединения с наименьшей цитотоксичностью в различных культурах клеток, при этом обладающие активностью против вирусов гриппа, а именно: 11926007, 11926011, 12026078, 12026163.

При дальнейшем исследовании данных соединений на животных было показано, что лечение гриппозной инфекции, индуцированной вируса гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09, всеми соединениями было эффективно и в дозах 60 и 90 мкг/кг/день защищало от гибели 50-60% животных, снижая потерю массы тела животных. Наиболее эффективным было лечение соединением 12026078 в дозах 60 и 90 мг/кг/день, которое защищало 80-90% животных, полностью предотвращало потерю массы тела.

### **3.3. Противовирусная активность и эффективность для аналогов балоксавира против вируса гриппа А**

Балоксавир — это ингибитор кэп-зависимый эндонуклеазы вируса гриппа. Важным преимуществом препарат является эффективность при однократном или двукратном применении. Стоимость этого препарата достаточно велика, кроме того, он находится под патентом, поэтому разработка Российского аналога является актуальной. В России в лаборатории Исследовательского Института Химического Разнообразия ведётся поиск новых аналогов данного препарата в том же химическом ряду с целью разработки Российского аналога.

Синтез проводился с помощью алкилирования полученных ранее соединений и последующего дебензилирования. Полученные активные метаболиты обрабатывали хлорметилметилкарбонатом в ацетонитриле в присутствии карбоната калия и иодида натрия с получением соответствующих этерифицированных соединений пролекарств [166]. Из полученного ряда соединений были отобраны самые перспективные: (12aR)-12-[(S)-(3,4-дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазин[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-6,8-дион и (12aR)-12-{(S)-(3,4-дифторфенил)[2-(метилсульфанил)фенил]-метил}-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]-пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-6,8-дион

(соединения 5115 и 5117 соответственно), (12aR)-12-[(R)-(3,4-Дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[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]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил}окси)метилметилкарбонат (далее соединения указывается как активный метаболит 5116 и его пролекарство 5124), а так же (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-дион и {[(12aR)-12-(дифенилметил)-6,8-диоксо-3,4,6,8,12,12a-гексагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил}окси} метилметилкарбонат (далее соединения указывается как активный метаболит 5106 и его пролекарство 5125).

### **3.3.1. Изучение противовирусной активности аналогов балоксавира в культуре клеток MDCK в отношении вирусов гриппа А и В методом иммуноферментного анализа (ИФА)**

Для исследования в культуре клеток вещества готовили следующим образом: были приготовлены сток-растворы, из которых в дальнейшем были приготовлены следующие концентрированные растворы: 100 мкМ; 10 мкМ; 1 мкМ; 100 нМ; 10 нМ; 1 нМ; 2000 нМ; 200 нМ; 20 нМ; 2 нМ; 0,2 нМ; 0,02 нМ.

При разбавлении приготовленных 2-х кратных растворов при добавлении вируса получали 1 кратные растворы на клетках.

#### ***Изучение противовирусной активности аналогов балоксавира в культуре клеток MDCK в отношении различных подтипов вирусов гриппа А***

При изучении противовирусной активности соединений были использованы следующие вирусы гриппа А: подтип H1N1 А/Калифорния/04/09(H1N1)pdm09 и А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), подтип H3N2 А/Аичи/2/69 (H3N2). Кроме того, была изучена активность соединений в отношении осельтамивир-резистентного штамма

вируса гриппа А А/Perth/265/2009 (H1N1), имеющего мутацию в NA, ответственного за резистентность к осельтамивиру H275Y. Для заражения клеточной культуры вирусами гриппа А/Калифорния/04/09(H1N1)pdm09 и А А/Perth/265/2009 (H1N1) была использована множественность заражения клеток вирусами гриппа – 0,01 БОЕ/на клетку, вирусами гриппа А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1) и А/Аичи/2/69 (H3N2) – 0,01 БОЕ/на клетку. Были проведены несколько серии опытов, в качестве препарата сравнения во всех опытах был использован балаксавир.

Все изученные соединения ингибировали вирусную репродукцию, причем ингибирующий эффект соединений увеличивался с увеличением их концентраций.

Концентрации препаратов, ингибирующие вирусную репродукцию на 50% (ИК<sub>50</sub>) представлены в Таблице 9.

Таблица 9 – Значения ингибирующей концентрации 50 аналогов балоксавира в отношении вирусов гриппа А различных подтипов в культуре клеток MDCK

Соединения	ИК <sub>50</sub> (ингибирующая концентрация, нМ)				Цитотоксичность (ЦТД <sub>50</sub> , 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
Балоксавир	12,45±1,4	2,6±1,3	5,045±0,36	0,775±0,03	30±11,2
Примечание: *Не исследовано; p≤0,05					

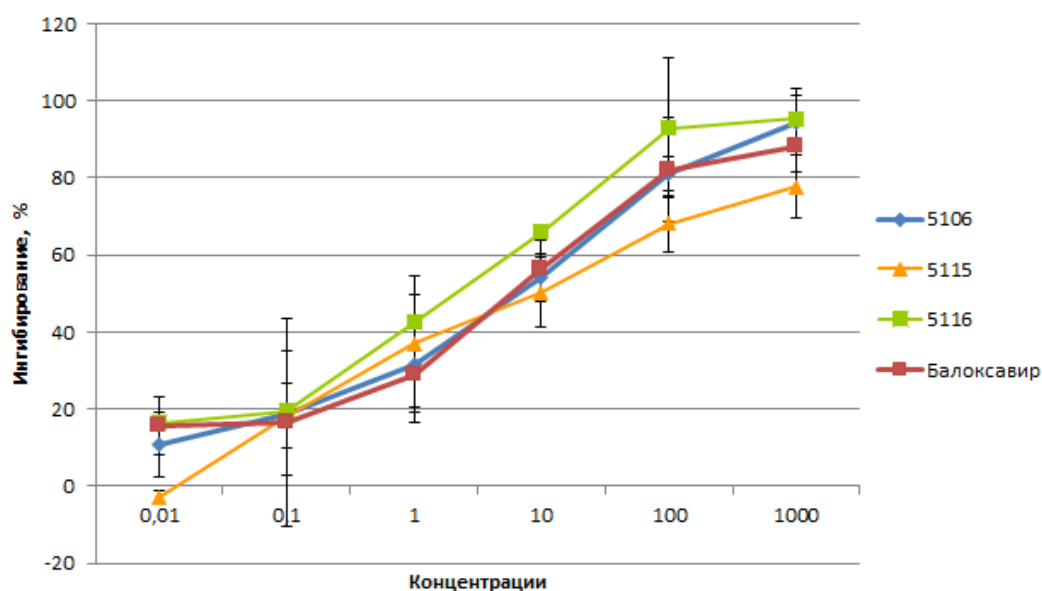
Практически во всех опытах значения ИК<sub>50</sub> для всех изученных соединений активность была высокой. Соединение 5115 было наименее активным по результатам всех опытов. Наиболее активным в отношении изученных вирусов гриппа, включая осельтамивир-резистентный вирус гриппа А/Перт/265/2009, было соединение 5116, которое по своей активности было сравнимо с балоксавиром.

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 9).

***Изучение противовирусной активности аналогов балоксавира в культуре клеток MDCK в отношении вирусов гриппа В***

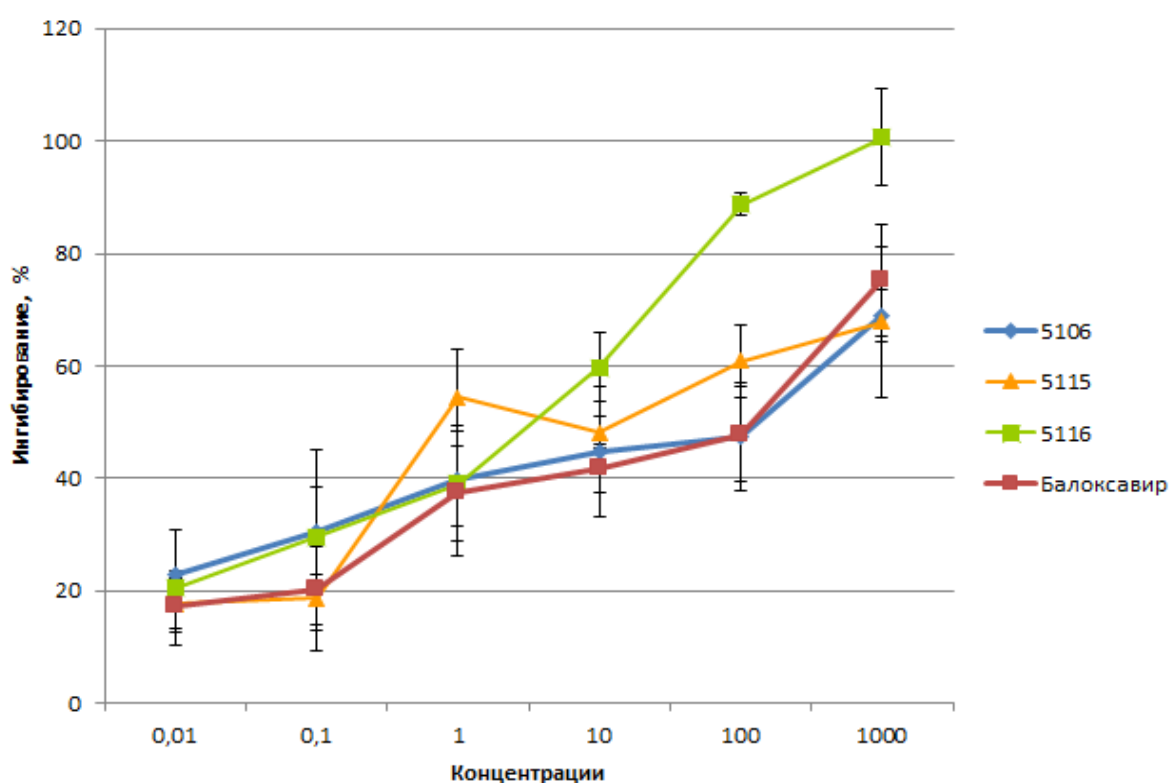
При изучении противовирусной активности соединений были использованы следующие вирусы гриппа В: В/Висконсин/1/2010(Ямагатская линия), клинические изоляты вирусы гриппа В В/Москва/3/19 и В/Грозный/6/19 (линия Виктория). При изучении исследуемых соединений на репликацию вирусов гриппа В были получены кривые зависимости вирусингибирующего эффекта от концентрации (доза-ответ), из которых для них были определены ИК50, представленные в Таблице 10. Видно, что все соединения подавляли размножение вирусов гриппа В в культуре клеток. При этом, противовирусная активность изученных соединений, была сходна с противовирусной активностью балоксавира.

Таким образом, проведённое изучение противовирусной активности соединений, показало, что все они обладают противовирусной активностью в культуре клеток MDCK в отношении вирусов гриппа А подтипа H1N1, H3N2 и 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, не меньшей, чем препарат сравнения балоксавир (Рисунки 37-39, Таблица 10).



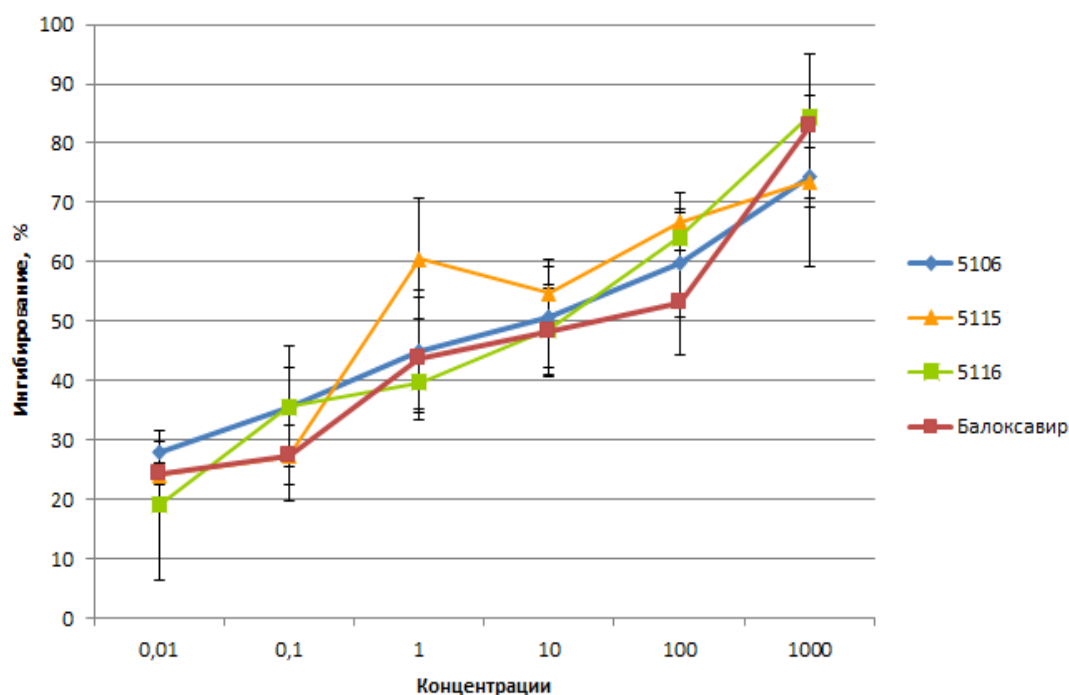
Примечание: Линия показывает среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение;  $p \leq 0,05$

Рисунок 37 – Зависимость ингибирования вирусной репродукции вируса гриппа В/Висконсин/1/2010 (Ямагатская линия) от концентрации аналогов балоксавира



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

Рисунок 38 – Зависимость ингибирования вирусной репродукции вируса гриппа В/Москва/3/19 (линия Виктория) от концентрации аналогов балоксавира



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

Рисунок 39 – Зависимость ингибирования вирусной репродукции вируса гриппа В/Грозный/6/19(линия Виктория) от концентрации аналогов балоксавира

Таблица 10 – Значения ингибирующей концентрации 50 аналогов балоксавира в отношении вирусов гриппа В различных линий в культуре клеток MDCK

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

### 3.3.2. Изучение противовирусной активности аналогов балоксавира в культуре клеток MDCK в отношении балоксавир резистентных вирусов гриппа А

Кроме того, было изучено ингибирование активного метаболита 5116 и балоксавира в отношении балоксавир-резистентных вирусов гриппа, проведённое

в ИИХР. Ингибирующая активность 5116 была сопоставима с ингибирующей активностью балоксавира для восприимчивых к балоксавиру вирусов гриппа А/Калифорния/04/2009А(Н1N1)pdm09 и А/Техас/71/2017А(Н3N2), несущих мутацию I38-WT. Метаболит 5116 ингибировал полимеразные комплексы балоксавир-резистентных вирусов гриппа А/Калифорния/04/2009А(Н1N1)pdm09 и А/Техас/71/2017А (Н3N2), несущего мутацию в положении I38Т, и был более эффективен, чем балоксавир. При этом активность 5116 была сопоставима с эффективностью балоксавира в ингибировании полимеразной активности балоксавир-резистентных вирусов гриппа А/Калифорния/04/2009А(Н1N1)pdm09 и А/Техас/71/2017А (Н3N2), несущих мутацию I38М, еще один важный маркер устойчивости к балоксавиру. Полученные данные представлены в Таблице 11.

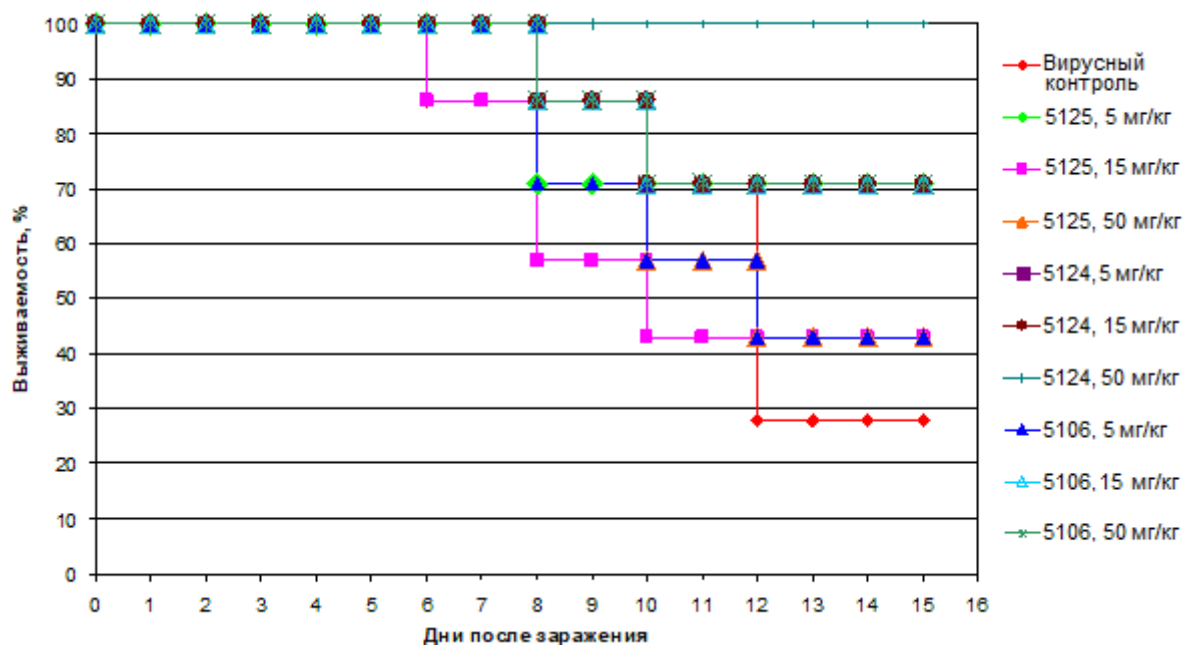
Таблица 11 – Значения ингибирующей концентрации 50 аналогов балоксавира в отношении вирусов гриппа А резистентных к балоксавиру

Вирусы	Мутация	ИК <sub>50</sub> (ингибирующая концентрация, нМ)	
		5116	балоксавир
А/Калифорния/04/2009 (H1N1)pdm09	I38-WT	1,8±0,1	1,4±0,3
	I38Т	74,8±31,0	212,2±34,3
	I38М	33,8±1,5	32,5±0,2
А/Техас/71/2017 (H3N2)	I38-WT	2,2±0,2	1,8±0,5
	I38Т	51,8±10,2	96,3±31,3
	I38М	19,9±2,5	20,5±4,5

### 3.3.3. Эффективность аналогов балоксавира на модели гриппозной пневмонии мышей, индуцированной А/Калифорния/04/2009(Н1N1)pdm09

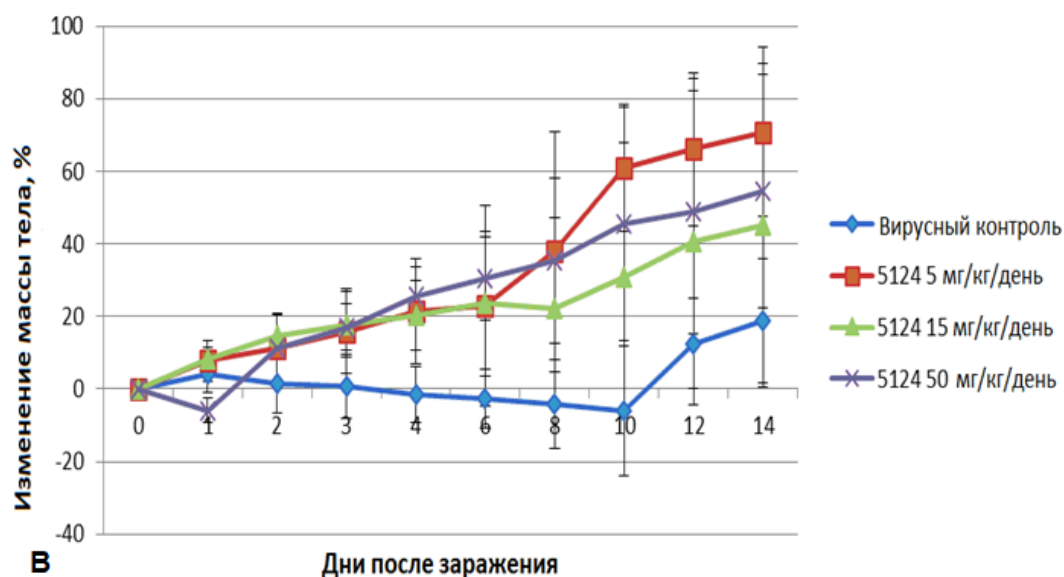
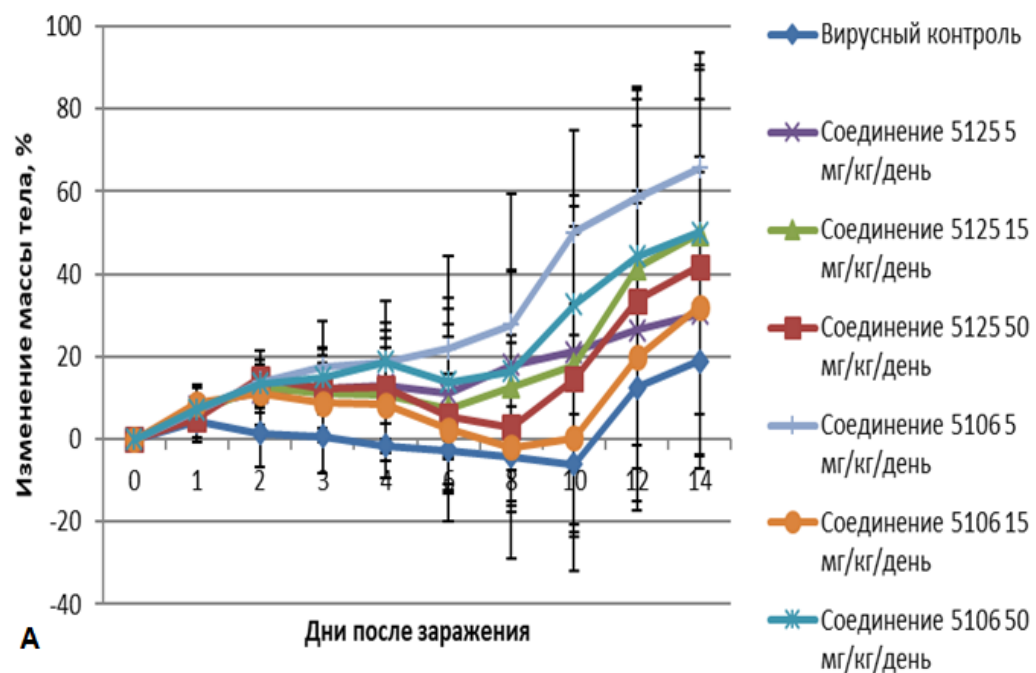
Изучение эффективности исследуемых веществ проводили с использованием заражающей дозы адаптированного к мышам вируса гриппа А/Калифорния/04/2009(Н1N1)pdm09, равной 10<sup>4</sup> ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл. В соответствии с дозой заражения указанная доза в группе вирусного контроля вызвала гибель 72% животных, при этом средняя продолжительность жизни составляла 11 дней.

Заражение вирусом также вызывало значительную потерю веса мышей до 23% у отдельных животных, 6% в среднем по группе к 10 дню исследования (Рисунки 40-41, Таблица 12).



Примечание:  $p \leq 0,05$ ;  $n=7$ , где  $n$  – количество животных в каждой группе

Рисунок 40 – Выживаемость мышей при лечении аналогами балоксавира при заражении низкой дозой вируса гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09



Примечание: Линия показывает среднее значение веса  $\pm$  стандартное отклонение;  $p \leq 0,05$ ;  $n=7$ , где  $n$  – количество животных в каждой группе

Рисунок 41 – Изменение массы тела мышей (А) при лечении аналогами балоксавира, 5125 и 5106, при заражении высокой дозой вируса гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09 и изменение массы тела мышей (В) при лечении аналогом балоксавира 5124 при заражении высокой дозой вируса гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09

Таблица 12 - Эффективность аналогов балоксавира на модели гриппозной пневмонии мышей при заражении низкой дозой адаптированного к мышам вируса гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09

Доза, мг/кг	Выживаемость		Защита от смертно сти (%)	Ср. продол- жительность жизни, дни	Титр вируса, lg ТЦИД <sub>50</sub> /0,1мл*
	жив/общее	% смерт ности			
Соединение 5125					
5	5/7 (p=0,126274)	29	71	12,7(2-8д.)	5±1,22 (5; 3; 6; 5; 6)
10	3/7 (p=0,611013)	58	42	10,4 (1-6д.,2-8д.,1-10д.)	3,8±1,3(2; 5; 5; 4; 3)
15	3/7 (p=0,611013)	58	42	11,6 (1-8д.,2-10д.,1-12д.)	3,8±0,8 (4; 4; 3; 3; 5)
Соединение 5124					
5	5/7 (p=0,126274)	29	71	13(1-8д.,1-10д.)	4±0,71 (5; 4; 4; 4; 3)
10	5/7 (p=0,126274)	29	71	13 (1-8д.,1-10д.)	1,8±1,48 (4; 2; 1; 2; 0)
15	7/7 (p=0,002216)	0	100	>16	0,8±1,09 (2; 0; 2; 0; 0)
Соединение 5106					
5	3/7 (p=0,611013)	58	42	11,2(2-8д.,1-10д.,1-12д.)	5±0,71 (6; 5; 5; 5; 4)
10	5/7 (p=0,126274)	29	71	13 (1-8д.,1-10д.)	3,9±2,01(2; 2; 6; 6; 3,5)
15	5/7 (p=0,126274)	29	71	13 (1-8д.,1-10д.)	3,8±0,45(4; 3; 4; 4; 4)
Вирусный контроль					
	2/7	72	-	11,0 (1-6д., 1-10д.,3-12д.)	>6 (>6; >6; >6; >6;)
Примечание: p≤0,05 рассматривается как достоверное отличие от контроля; *ТЦИД <sub>50</sub> -тканевая цитопатическая инфекционная доза 50; снижение титра в среднем > 2 lg ТЦИД <sub>50</sub> рассматривается как достоверное отличие от контроля; n=7, где n – количество животных в каждой группе					

Кроме того, титр вируса из легких животных контрольной группы через 24 часа после заражения вирусом гриппа А/Калифорния/04/09 (H1N1) был высоким и превышал  $6,0 \lg \text{ТЦИД}_{50}/0,1 \text{мл}$ , что и обуславливало гибель животных от вирусной пневмонии.

Лечение всеми предоставленными образцами в используемой модели зависело от дозы препарата. При использовании соединения 5125 эффективность лечения уменьшалась с увеличением дозы. Лечение этим соединением в наименьшей дозе 5 мг/кг 2 раза в день было наиболее эффективно, однако несмотря на увеличение выживаемости животных, оно не было статистически значимо. Также данное лечение увеличивало продолжительность жизни животных, но практически не снижало размножение вируса в легких животных. При увеличении дозы до 15 и 50 мг/кг 2 раза в день выживаемость и средняя продолжительность жизни животных практически не отличалась от таковой в группе вирусного контроля (Таблица 12). Однако увеличение дозы 5125 привело к статистически значимому снижению титра вируса по сравнению с контрольной группой.

Эффективность лечения соединением 5106 увеличивалась с увеличением его дозы, лечение этим соединением в наименьшей из изученных доз 5 мг/кг 2 раза в день было неэффективно, выживаемость, продолжительность жизни животных и титр вируса в их легких незначительно отличались от группы вирусного контроля. При увеличении дозы 5106 до 15 и 50 мг/кг 2 раза в день выживаемость и средняя продолжительность жизни животных увеличивались, однако это увеличение не было статистически значимо. При этом размножение вируса в легких животных уменьшилось более чем в 100 раз.

Наиболее эффективным было лечение соединением 5124, которое в дозах 5 и 15 мг/кг 2 раза в день снижало смертность животных и титр вируса в их легких, увеличивая среднюю продолжительность жизни. Увеличение дозы до 50 мг/кг полностью предотвращало гибель животных, потерю ими массы тела и размножение вируса в легких.

Известно, что эффективность противовирусного препарата обратно пропорционально дозе заражения. Для уточнения и подтверждения результатов первого опыта, а также получения новых данных в следующей серии экспериментов для вирусного заражения использовали более высокую по сравнению с первым дозу заражения ( $10^{4,5}$  ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл).

В отличие от первого опыта с более низкой дозой заражения во втором опыте в группе вирусного контроля к 12 дню наблюдения погибли все мыши, наблюдалась значительная потеря веса (около 16%), средняя продолжительность жизни составляла 8, 9 дней. При этом титр вируса в легких животных контрольной группы мышей, которую заражали вирусом гриппа А/Калифорния/04/09(H1N1)pdm09 составлял  $5,7 \pm 0,97 \lg$  ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл.

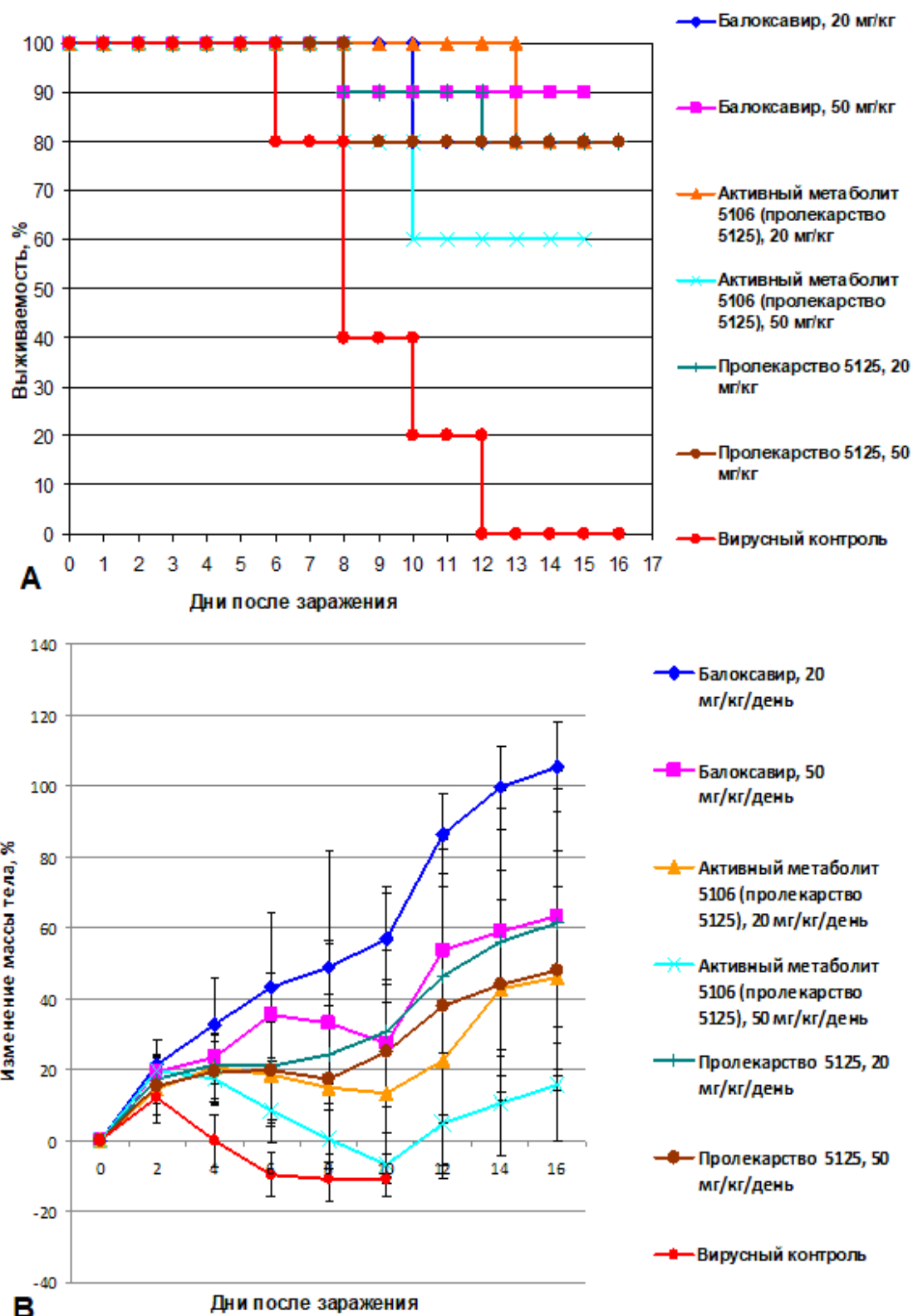
Препарат сравнения балоксавир продемонстрировал выраженную противовирусную активность – в дозе 50 мг/кг было достигнута 90% защита животных от гибели, увеличение продолжительности жизни, а также полное подавление репликации вируса (Рисунки 42-43, Таблица 13).

Таблица 13 – Эффективность аналогов балоксавира на модели гриппозной пневмонии мышей при заражении высокой дозой адаптированного к мышам вируса гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09

Доза, мг/кг	Выживаемость		Защита от смертности (%)	Ср. продол- жительность жизни, дни	Титр вируса, lg ТЦИД <sub>50</sub> /0,1мл*
	жив/общее	% смертности			
Балоксавир					
20	8/10 (p=0,000011)	20	80	13,8(2-10д.)	1,8±1,6 (3; 3; 3; 0; 0)
50	9/10 (p=0,000000044 )	10	90	14,2 (1-8д.)	0 (0;0; 0; 0; 0)
Соединение 5106					
20	8/10 (p=0,000011)	20	80	14,6 (2-14д.)	0 (0; 0; 0; 0; 0)
50	6/10 (p=0,001735)	40	60	12,2 (2-8д., 2-10 д.)	0,4± 0,89 (0;2; 0; 0; 0)

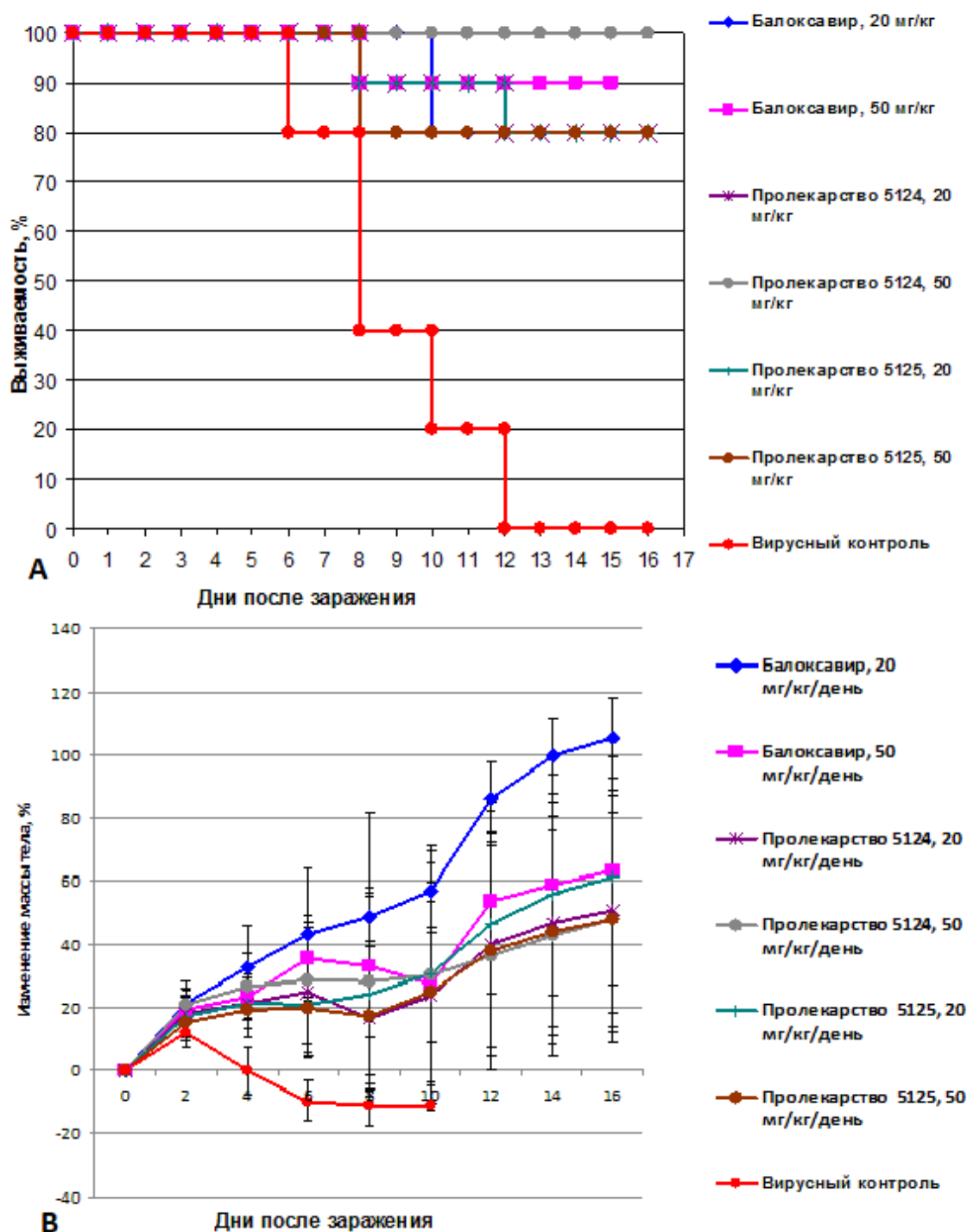
## Продолжение Таблицы 13

Доза, мг/кг	Выживаемость		Защита от смертности (%)	Ср. продол- жительность жизни, дни	Титр вируса, lg ТЦИД <sub>50</sub> /0,1мл*
	жив/общее	% смертности			
Соединение 5124					
20	6/10 (p=0,001735)	40	60	13(2-8д.,1-10д., 1- 12д.	0 (0;0; 0; 0; 0)
50	10/10	0	100	>16	0 (0;0; 0; 0; 0)
Соединение 5125					
20	8/10 (p=0,000011)	20	80	13,8 (1-8д.,1-12д.)	0,6±1,34 (3; 0; 0; 0; 0)
50	8/10 (p=0,000011)	20	80	13,4(2-8д.)	0 (0;0; 0; 0; 0)
Вирусный контроль					
	0/10	100	-	8,9 (2-6д.,4-8д., 2- 10д.,3-12д.)	5,7±0,97 (5; 7; 6,5; 5; 5)
Примечание: p≤0,05 рассматривается как достоверное отличие от контроля; *ТЦИД <sub>50</sub> -тканевая цитопатическая инфекционная доза 50; снижение титра в среднем > 2 lg ТЦИД <sub>50</sub> рассматривается как достоверное отличие от контроля; n=7, где n – количество животных в каждой группе					



Примечание: Линия показывает среднее значение веса  $\pm$  стандартное отклонение;  $p \leq 0,05$ ;  $n=10$ , где  $n$  – количество животных в каждой группе

Рисунок 42 – Выживаемость мышей (А) и изменение массы тела мышей (Б) при лечении соединением 5125 и его пролекарством 5106 (аналоги балоксавира) при заражении высокой дозой вируса гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09



Примечание: Линия показывает среднее значение веса  $\pm$  стандартное отклонение;  $p \leq 0,05$ ;  $n=10$ , где  $n$  – количество животных в каждой группе

Рисунок 43 – Выживаемость мышей (А) и изменение массы тела мышей (В) при лечении соединениями 5125 и 5124 (аналоги балоксавира) при заражении высокой дозой вируса гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09.

Соединение 5124 было наиболее эффективным в дозе 50 мг/кг 2 раза в день, полностью предотвращая гибель животных, увеличивая продолжительность их жизни в 2 раза, а также полностью предотвращая потерю массы тела животных и подавляя размножение вируса в лёгких животных. При лечении более низкой дозой также наблюдалось полное подавление размножения вируса в лёгких животных.

Остальные исследуемые соединения при применении в обеих изученных дозах также были высокоэффективны, достоверно увеличивая выживаемость животных ( $p \leq 0,001$ ) и среднюю продолжительность жизни, практически полностью предотвращая потерю массы тела и значительно подавляя размножение вируса в их легких.

Таким образом была изучена противовирусная активность аналогов балоксавира на культуре клеток MDCK и отобраны наиболее активные в отношении широко спектра вирусов гриппа А различных подтипов, в том числе резистентных к осельтамивиру и балоксавиру. При этом соединение 5116 было более активно, чем препарат сравнения балоксавир. Также была изучена противовирусная активность аналогов балоксавира в отношении вирусов гриппа В.

В первом опыте с использованием низкой дозы  $10^4$ ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл заражения вирусом на модели гриппозной инфекции мышей, индуцированной адаптированным к мышам вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09 показано, что 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 5124, которое в дозах 5 и 15 мг/кг снижало смертность животных и титр вируса в их легких, увеличивая среднюю продолжительность их жизни.

Во втором опыте с использованием высокой дозы  $10^{4,5}$ ТЦИД<sub>50</sub>/0,1мл заражения показано, что все соединения в дозах 20 и 50 мг/кг 2 раза в день были высокоэффективны, достоверно увеличивая выживаемость животных и их среднюю продолжительность жизни, практически полностью предотвращая потерю массы тела и значительно подавляя размножение вируса в их легких.

Наиболее эффективным было лечение соединением 5124, которое в дозе 50 мг/кг полностью предотвращало гибель животных и потерю ими массы тела.

*Материалы раздела 3.3. опубликованы в [166, 249]*

### **3.4. Обсуждение результатов**

Всемирная организация здравоохранения считает основной стратегией борьбы с гриппом вакцинацию. Наиболее важным фактором для эффективности вакцины является её соответствие вакцинным и эпидемическим штаммам. Вакцина против гриппа наиболее эффективна, когда циркулирующие вирусы совпадают с вирусами, содержащимися в вакцинах. Когда антигены, входящие в состав вакцины против гриппа, аналогичны циркулирующим вирусам гриппа, вакцина против гриппа снижает риск заболевания гриппом на 40–80% [174, 175, 176, 177], риск госпитализации у пожилых людей и лиц с хроническими заболеваниями. Вирус гриппа обладает высокой изменчивостью, из-за чего состав вакцин постоянно корректируется в зависимости от антигенной структуры циркулирующих штаммов. Если наблюдается несоответствие между вакциной и циркулирующими штаммами, то эффективность вакцины значительно ниже [177, 178, 179, 180, 181]. Для создания и проверки вакцины необходимо не менее 6 месяцев, что делает невозможным быстрое применение вакцин в условиях пандемии, вызванной новыми штаммами [182, 183]. Это особенно актуально при пандемии, вызванной новыми штаммами вируса гриппа А [180, 184]. По этой причине, вместе с вакцинацией, которая является основной стратегией борьбы с вирусом гриппа, ВОЗ рекомендует применение противогриппозных этиотропных средств.

Тем не менее, ассортимент химических препаратов прямого вирусспецифического действия, предназначенных для этиотропного лечения, ограничен: блокаторы M2 белка, ингибиторы нейраминидаз, ингибиторы фузии гемагглютинина, ингибиторы полимеразы. Имеющиеся препараты имеют ряд как преимуществ, так и недостатков. Поэтому создание новых препаратов для преодоления имеющихся у лицензированных препаратов недостатков остаётся актуальным.

Создание новых препаратов долгий процесс, который включает поиск и разработку, доклинические исследования, клинические исследования. От начала поиска до выхода лекарства на рынок может пройти более 10 лет [185]. Долгий срок создания лекарства имеет множество недостатков, в том числе задержку в разработке новых лекарств, которые могут спасти жизни людей и капитал, необходимый для финансирования каждой фазы процесса разработки. Полную стоимость вывода на рынок нового лекарственного препарата, начиная от поиска и до клинических испытаний и утверждения, сложно оценить в точности. Например, были опубликованы данные за период с 2004 по 2012 года, которые показали, что средняя стоимость исследования фазы 1, варьировалась от 1,4 млн до 6,6 млн долларов, фаза 2 стоила от 7,0 млн до 19,6 млн долларов, а стоимость фазы 3 в среднем варьировалась от 11,5 млн. до 52,9 млн долларов [186]. При этом так же было показано, что в обзоре 106 кандидатов на лекарства, оцененных в ходе клинических испытаний, в 2016 году общие капитальные затраты производителя, имеющего лекарство, одобренное в ходе успешных испытаний 3 фазы, составили 2,6 миллиарда долларов (на 2013 год), и при этом сумма увеличивается на 8,5 % в год [187].

Одним из самых распространённых и эффективных путей для создания препаратов является поиск новых активных аналогов, которые обладают улучшенными качествами, среди уже существующих препаратов.

Поэтому целью нашей работы была оценка эффективности и противовирусной активности аналогов уже существующих этиотропных препаратов различных по механизму действия.

Римантадин — это ингибитор M2 белка. Он обладает подтвержденной эффективностью против вируса гриппа типа А как в культуре клеток, так и в животных моделях, а также применялся для лечения людей [29-35, 188, 189, 190]. Римантадин успешно применялся в течении 30 лет вместе с амантадином, начиная с 1993 года, когда был одобрен для клинического использования [29, 37]. Оба препарата успешно подавляли вирус гриппа А при лечении и профилактики, их эффективность достигала 90% [1, 191, 192, 193, 194]. Устойчивость гриппа А к амантадину была впервые обнаружена во время эпидемии гриппа А в 1980 году [195, 196]. При этом устойчивость к обоим препаратам у сезонных подтипов вируса гриппа была редкой и составляла всего 1–2% до 2000 года [169, 197], но с 2004 года резистентность стала резко расти и уже начиная с 2006 года римантадин и амантадин не рекомендуют для применения при лечении и профилактики гриппа из-за возникновения и распространения резистентности, за которую отвечает мутация S31N [161, 173, 198, 199, 200], у большинства циркулирующих штаммов.

Учитывая все преимущества римантадина и его степень его изученности, в мире продолжается поиск эффективных аналогов. Так, например, были разработаны экспериментальные M2-ингибиторы, которые более устойчивы к развитию резистентности [171, 201, 202, 203, 204]. Также было обнаружено, что большинство мутантных вирусов возвращается к своему дикому типу, чувствительному к амантадину и римантадину, что позволяет предположить, что мутации могли нарушить способность к репликации [172, 201, 205, 206]. Кроме того, всесторонние знания о механизме действия аминоадамантанов как ингибиторов протонного канала M2 вируса гриппа, а также высокая фармацевтическая ценность производных адамантана стимулируют исследования по синтезу новых адамантансодержащих молекул. Это позволило предположить, что поиск и разработка M2-ингибиторов, в частности аналогов римантадина, которые были бы эффективны против резистентных к римантадину и амантадину вирусов гриппа, является актуальной и перспективной задачей.

В недавних исследованиях было выявлено несколько блокаторов, которые продемонстрировали обнадеживающую противовирусную активность в культуре клеток [207]. Более того, комбинированные исследования выявили особенно эффективный дуэт препаратов – араинозин и теобромин, значительно превосходящий осельтамивир как в культуре клеток, так и на животных. Комбинация препаратов была эффективна против римантадин-резистентных штаммов и чувствительных штаммов вируса гриппа А. Однако использование препаратов по отдельности в значительной мере снижало их эффективность.

В институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН был разработан метод синтеза новых энантиомерно чистых адамантильных производных 1,3-оксазинанов и пиперидинов из соответствующих энантиомерных гомоаллиламинов. Ожидалось, что у новых энантиомерно чистых молекул с совместными адамантановым и пиперидиновым скелетами, противовирусную активность будет выше, чем у римантадина. При изучении противогриппозной активности было показано, что соединения ингибируют *in vitro* репликацию пандемических штаммов H1N1 А/ Калифорния/04/2009 и А/IV–Оренбург/29–L/2016 [165]. Оба штамма содержат мутацию S31N, ответственную за резистентность к римантадину и амантадину. При этом наиболее эффективно ингибировали репликацию вирусов (R)-изомеры (асимметрический центр при адамантильной группе).

Даже на модели гриппозной пневмонии мышей, индуцированной римантадин-резистентным вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09, были изучены аналоги римантадина, 1,3-оксазинан-2-он и пиперидин-2,4-дион. Лечение соединениями 39 и 41 (1,3-оксазинан-2-он и пиперидин-2,4-дион соответственно) снижало гибель животных, потерю ими массу тела, а также подавляло размножение вируса гриппа А в лёгких животных.

При исследовании на животных было обнаружено, что римантадин, несмотря на использование римантадин-резистентного вируса гриппа А, проявлял противовирусную активность. Эта активность обуславливается тем, часто концентрации препаратов в плазме крови могут значительно превышать

концентрации, необходимые для подавления противовирусной активности в опытах *in vitro*. Это может объяснять сниженную, но, тем не менее, выраженную эффективность препаратов в отношении резистентных к ним вирусов. Это подтверждается данными, полученными при изучении эффективности осельтамивира у хорьков [161]. В этих исследованиях осельтамивир был эффективным не только в отношении чувствительного к осельтамивиру вируса гриппа H1N1, но и осельтамивир-резистентного вируса с мутацией H274Y, хотя и в меньшей степени. Эти данные совпадают также с результатами клинических исследований, в которых показана эффективность осельтамивира во время эпидемического сезона 2008–2009 при циркуляции осельтамивир-резистентного штамма H1N1 (H274Y). Однако эта эффективность была ниже эффективности родственного ингибитора нейраминидазы занамивира, к которому чувствителен этот штамм [208]. Кроме того, показана эффективность римантадина при сезонном гриппе с циркуляцией римантадин-резистентного вируса гриппа A/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09, однако эффективность такого лечения была ниже, чем при применении осельтамивира [209].

Известно, что штаммы, устойчивые к препаратам адамантанового ряда, могут образовываться в культуре клеток и у животных уже после 2–3 пассажа. В человеческой популяции такие штаммы могут появиться всего через 2–4 дня после начала терапии [40, 169, 170, 165]. По этой причине было проведено дополнительное исследование оценки потенциального риска развития резистентности при использовании аналогов римантадина 39 и 41 в лечении гриппозной инфекции. Для этого нами исследована чувствительность вирусов, выделенных из легких животных после приема как обоих соединений, так и римантадина, к этим же препаратам в культуре клеток. Данное исследование показало, что вирус, полученный из лёгких лечёных животных, остаётся чувствительный к данным аналогам римантадина после их неоднократного применения и сохраняет устойчивость к римантадину.

Таким образом, можно предположить, что к данным аналогам не будет быстро развиваться резистентность при длительном использовании, и на их основе

могут быть созданы новые лекарственные препараты, эффективные в отношении резистентных к римантадину штаммов вируса гриппа А.

Препарат умифеновир действует как ингибитор слияния гемагглютиниона и обладает широким спектром противовирусной активности, включая вирусы гриппа типов А и В [106, 108, 210, 211]. Основными преимуществами этого препарата является низкая токсичность и то, что он практически не вызывает появление резистентных штаммов вируса гриппа среди циркулирующих в мире [113, 211, 212, 213, 214, 215, 216]. Умифеновир является отечественным препаратом и одобрен для профилактики и лечения гриппа А и В у человека, а также осложнений после гриппа и других ОРВИ в России, и входит в рекомендации для лечения [217]. Данный лекарственный препарат долго и успешно используется в клинической практике [59, 106, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228]. Умифеновир также рекомендован для лечения и профилактики вирусов гриппа и ОРВИ в Китае [229] и некоторых странах СНГ.

Однако, несмотря на свои преимущества, данный препарат имеет низкую биодоступность и сложную схему применения, а также имеет несовершенство ряда лекарственных форм, в частности для лечения тяжелых случаев гриппозной инфекции [230]. Одним из основных недостатков умифеновира является то, что для достижения максимальной концентрации в плазме и терапевтической эффективности необходимо вводить большую дозу препарата. Также умифеновир, как производное индола, плохо растворим в водных средах. Это существенно влияет на его биодоступность, формы применения и фармакокинетику. Однако в настоящее время умифеновир представляет большой интерес и в нескольких лабораториях мира ведётся поиск эффективных аналогов умифеновира, которые обладали бы большей биодоступностью и при этом были бы не менее эффективны [231, 232, 233]. Подобные аналоги позволили бы получить препараты с более простой схемой приёма и которые могут быть более эффективны для лечения тяжёлых случаев гриппозной инфекции. Например, были предприняты попытки улучшить водорастворимость умифеновира посредством химического добавления полимеров акриламида к молекуле умифеновира [234]. У данных комплексов

индекс селективности *in vitro* лучше, чем у умифеновира и сохранялись противовирусные свойства. Однако эти полимеры не получили дальнейшего развития.

Аналоги умифеновира разрабатываются в том числе и в России. Так, например, в научно-исследовательском институте биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича ведётся разработка наномолекулы умифеновира. А в фармацевтической компании АО «Отисифарм» были синтезированные аналоги умифеновира, производные 6-гидроксibenзотиофена. Проведенное исследование многочисленной патентной и научной литературы, а также документов ЦХЛС-ВНИХФИ позволило на первом этапе работ выявить атомы и фрагменты молекулы умифеновира, ответственные за противовирусную активность, и использовать эти данные для дизайна оригинальных производных 6-гидроксibenзотиофена.

Также обнаружено, что значительное количество аналогов умифеновира на основе индола попадает под какие-либо патенты или опубликованы в статьях, и соединений со значительной активностью среди них нет. Многочисленные исследования указывают, что введение диметиламинометиленового фрагмента не является существенным для достижения противовирусной активности, но позволяет получить водорастворимые вещества. Аналогичная картина складывается и для бензофурановых производных.

Было предположено, что можно сконструировать аналоги умифеновира на основе бензотиофена с сохранением ключевых заместителей исходного скаффолда, таких как электроноакцепторная группа в третьем положении, гидроксигруппа в пятом положении, объемный заместитель во втором положении, не имеющий возможности образовывать водородные связи и т.д.

Для проведения данного анализа молекула умифеновира была теоретически разделена на несколько составляющих атомов и фрагментов, и проведено изучение важности каждого атома и фрагмента, как для достижения высокой противовирусной активности, так и для достижения низких показателей цитотоксичности.

Было определено, что ряд фрагментов умифеновира не несет никакой полезной нагрузки, в то время как другие заместители являются необходимыми для проявления противовирусной активности. Так, например, атом брома приводит к существенному повышению цитотоксичности, не оказывая никакого влияния на противовирусную активность, в то время как атом серы является необходимым для нее. Метилендиметиламиновый заместитель тоже не оказывает прямого влияния на противовирусную активность, но обеспечивает возможность получения водорастворимой соли по атому азота в его структуре и, в конечном итоге, влияет на биодоступность соединения.

Исследование упомянутой выше литературы и полученные данные о важности каждого отдельного атома и фрагмента умифеновира позволили предположить, что возможно провести замену местами атома серы и азота индола при сохранении основных остальных заместителей. Таким образом, была сконструирована молекула бензотиофенас ключевыми заместителями, ответственными за противовирусную активность, и на основе этого скаффолда получены оригинальные производные, которые были исследованы на возможность подавлять размножение вируса гриппа.

Для серии соединений были получены производные бензотиофена с различными по свойствам заместителями с целью понимания, какие положения уже в этом скаффолде будут существенны для противовирусной активности и как это соотносится с положением аналогичных заместителей в умифеновире.

В дальнейшем удалось синтезировать соединения, в которых ввели бензиламинный фрагмент во второе положение и тем самым усилить принцип *similarity* (англ. «подобие», «схожесть») по отношению к умифеновиру.

Введение же в молекулу диметиламинометиленового заместителя на примере соединений показало, что этот фрагмент не приводит к заметной противовирусной активности, но может быть использован для синтеза водорастворимых производных, что является важным для биодоступности лекарственного средства.

Таким образом, были синтезированы следующие соединения: 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).

Известно, что умифеновир обладает широким спектром действия против различных штаммов вируса гриппа А и В. Противовирусная активность умифеновира не раз подтверждалась в экспериментах на культурах клеток [102, 235, 236, 237, 238]. Так, было показано, что для вирусов гриппа А H1N1 значение ИК50 было сходно и составляло от 3,2 до 7,5 мкг/мл, а для вирусов гриппа А H5N1 значение ИК50 составляло от 9,8 до 13,9 мкг/мл [238].

В следующих экспериментах по изучению противогриппозной активности в отношении вирусов гриппа А/Калифорния/04/09(H1N1)pdm09 и В/Вашингтон/02/2019 (линия Виктория) были использованные отобранные ранее наименее цитотоксичные аналоги умифеновира. Изученные аналоги умифеновира в культуре клеток MDCK значительно подавляли вирусную репродукцию вирусов гриппа типов А и В, причём степень ингибирования возрастала с повышением концентрации препарата. При этом значения ИК50 для умифеновира было сходно с таковым в других исследованиях [238].

В соответствии с индексом селективности нами были отобраны наиболее активные и наименее цитотоксичные соединения для дальнейшего исследования на животных.

Противовирусная эффективность соединений оценивалась на модели гриппозной пневмонии мышей, индуцированной вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09. Умифеновир при применении в высоких

дозах эффективен у мышей, повышая их выживаемость, продолжительность жизни и предотвращая потерю веса [103, 104, 230].

Проведённые исследования показали, что соединение 11926011 наиболее эффективно в дозе 50 мг/кг/день, а соединение 11926007 более эффективно в дозе 60 мг/кг/день. При этом самым эффективным было соединением 12026078 в дозах 60 и 90 мг/кг/день, которое защищало 80-90% животных, полностью предотвращало потерю массы тела. Клинические данные полностью коррелировали с размножением вируса в легких животных: при увеличении дозы препарата снижение титра вируса в легких по сравнению с титром вируса в группе контроля увеличивалось примерно на 2-4 lg ТЦИД<sub>50</sub>/0.1мл. При этом они были сравнимы или превышали эффективность препарата сравнения осельтамивир, а данные по выживаемости и потере массы тела были сходны с данными по умифеновиру (соединение 12026163).

Полученные данные позволяют предположить, что соединение 12026078 обладает большей биодоступностью, чем умифеновир, и может являться кандидатом для дальнейшего доклинического изучения.

Следующим классом ингибиторов, аналоги которого были изучены, является ингибитор кэп-зависимой эндонуклеазы вируса гриппа балоксавир. В течение последнего десятилетия значительные усилия были направлены на разработку низкомолекулярных ингибиторов кэп-зависимой эндонуклеазы как на новых кандидатов для лечения гриппозной инфекции [239, 240, 241]. Стоит отметить, что большой вклад для дальнейших исследований и разработок стало создание Балоксавира марбоксила. В 2018 году этот препарат был одобрен для лечения в США и Японии, в 2020 году его стали также применять в Австралии и России.

Стратегия пролекарства, которая используется балоксавиром, представляет собой практический подход к улучшению биодоступности лекарства. Легко проникаемое этерифицированное пролекарство быстро превращается в активную лекарственную форму балоксавириной кислоты в печени, таким образом опосредуя свой мощный биологический эффект у пациентов, инфицированных вирусом гриппа [117, 125, 127, 242, 243].

Кроме того, важным преимуществом балоксавира является его эффективность при однократном применении.

Однако во время клинических испытаний у пациентов, леченных балоксавиром, возникали резистентные вирусы с частотой от ~3 до 11% у взрослых и >23% у детей [125, 244, 245, 246, 247, 248]. За снижение чувствительности к балоксавиру отвечает мутация I38T. Жесткая структура объёмной гидрофобной группы у балоксавирной кислоты и её этерифицированного пролекарства может ограничить адаптацию молекулы к активному центру связывания кЭП-зависимой эндонуклеазы, особенно если некоторые мутации могут изменить форму активного центра.

Таким образом, появилась следующая гипотеза: замена жесткого объёмной гидрофобной группы на более гибкую сохранит ингибирующую эффективность против вирусов гриппа и позволит доработать эти потенциально противовирусные препараты широкого спектра действия [166].

Подобные молекулы были получены в российском Исследовательском Институте Химического Разнообразия путём молекулярного докинга. Компьютерное моделирование было основано на кристаллической структуре кЭП-зависимой эндонуклеазы вируса гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09 в комплексе с балоксавирной кислотой. Основная цель моделирования заключалась в том, чтобы убедиться, что гибкая структура объёмной гидрофобной группы, сможет вписаться в связывающий карман кЭП-зависимой эндонуклеазы. Основываясь на разнообразии громоздких гидрофобных групп, было разработано и синтезировано небольшое количество аналогов балоксавирной кислоты с различными стерически подвижными фрагментами в виде диарилметилов. Молекулярное моделирование показало, что позы связывания соединений с симметричными громоздкие гидрофобными группами были очень похожи на таковые у балоксавирной кислоты.

Несмотря на высокое структурное сходство фенильной и фторфенильной групп, фторзаместители изменяют распределение частичных зарядов в фенильных кольцах, что влияет на взаимодействие с ключевыми остатками связующего

кармана. Действительно, согласно моделированию, 4-фторфенильные фрагменты громоздких гидрофобных групп (12aR)-12-[бис(4-фторфенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-6,8-диона образуют более сильные нековалентные взаимодействия, в частности, кулоновские и ван-дер-ваальсовы силы с His41 и Tyr24 в отличие от незамещенных фенилов (12aR)-12-(дифенилметил)-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазин[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-6,8-диона. С другой стороны, модель предсказала, что громоздкие гидрофобные группы (12aR)-12-(дифенилметил)-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазин[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-6,8-диона более благоприятен с точки зрения взаимодействия с другими ближайшими остатками, Ala20, Glu26, Ala37 и Ile38. Различий между этими двумя соединениями в их взаимодействии с Met21 не наблюдалось. Тем не менее, существенная разница в оценках *in silico* между (12aR)-12-(дифенилметил)-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазин[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-6,8-дионом и (12aR)-12-[бис(4-фторфенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-6,8-дионом вызвана различиями в кулоновских взаимодействиях металлосвязующей группы с двумя катионами  $Mn^{2+}$ . Это может быть результатом ориентации частичные положительные заряды 4-фторфенильных колец, близких к катионам марганца.

Диастереомеры (12aR)-12-[(S)-(3,4-дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[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-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]-триазин-6,8-дион используют режим связывания, аналогичный режиму балоксавиновой кислоты. Тем не менее, их громоздкие гидрофобные группы были немного смещены по сравнению с балоксавиновой кислотой. Это может быть связано со стерически меньшими громоздкими гидрофобными группами, а также с вращением фенильных колец. 3,4-дифторфенильный фрагмент (12aR)-12-[(R)-(3,4-дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]-

триазин-6,8-диона располагался в кармане, образованном боковыми цепями Tyr24, Lys34, Ile38, Ala20 и Glu26. Фенильная группа (12aR)-12-[(R)-(3,4-дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]-триазин-6,8-диона образовывала ван-дер-ваальсовы взаимодействия с Ile38 и His41. Напротив, 3,4-дифторфенильная группа (12aR)-12-[(S)-(3,4-дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]-триазин-6,8-диона была ориентирована в противоположном направлении по отношению к той же функциональной группе (12aR)-12-[(R)-(3,4-дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]-триазин-6,8-диона. Моделирование показало, что два атома фтора (12aR)-12-[(S)-(3,4-дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]-триазин-6,8-диона взаимодействуют с Ile38, His41 и Ala37. Оксазиновое кольцо (12aR)-12-[(S)-(3,4-дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]-триазин-6,8-диона и (12aR)-12-[(R)-(3,4-дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]-триазин-6,8-диона взаимодействовало с Tyr24.

Согласно результатам компьютерного моделирования, предсказанные режимы связывания соединений в кЭП-зависимой эндонуклеазы вируса гриппа А занимают тот же связывающий карман, что и балоксавириновая кислота, при этом гибкие громоздкие гидрофобные группы позволяют приспосабливаться к большему количеству различных поз по сравнению с жестким громоздкими гидрофобными группами балоксавириновой кислоты [166].

Далее из полученного ряда соединений были отобраны наиболее перспективные аналоги для дальнейшего изучения: (12aR)-12-[(S)-(3,4-дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]-триазин-6,8-дион и (12aR)-12-[(S)-(3,4-дифторфенил)[2-(метилсульфанил)фенил]-метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-

тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]-пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-6,8-дион (соединения 5115 и 5117 соответственно), (12aR)-12-[(R)-(3,4-Дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-3,4,12,12a-тетрагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]-триазин-6,8-дион (соединение 5116) и (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-дион (соединение 5106). После химической обработки были получены (12aR)-12-[(R)-(3,4-Дифторфенил)(фенил)метил]-7-гидрокси-6,8-диоксо-3,4,6,8,12,12a-гексагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо-[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил}окси)метилметилкарбонат (соединение 5124), а так же {[ (12aR)-12-(Дифенилметил)-6,8-диоксо-3,4,6,8,12,12a-гексагидро-1H-[1,4]оксазино[3,4-с]пиридо[2,1-f][1,2,4]триазин-7-ил}окси}-метилметилкарбонат (соединение 5125).

В культуре клеток MDCK была изучена цитотоксичность соединений. Результаты показали, что они имеют слабую цитотоксичность в микромолярном диапазоне (от 5,8 до > 100 мкМ). При исследовании противовирусной активности в культуре клеток MDCK соединения продемонстрировали активность против широкого спектра вирусов гриппа А: А/ Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), А/Калифорния/04/09(H1N1)pdm09, подтип H3N2 А/Аичи/2/69 и осельтамивир-резистентный вирус гриппа А/Perth/265/2009 (H1N1). При этом соединение 5116 было более активно, чем препарат сравнения балоксавир. Кроме того, при дополнительном исследовании против вирусов гриппа В (В/Висконсин /1/2010 (Ямагатская линия), клинические изоляты вирусы гриппа В/Москва/3/19 и В/Грозный/6/19, выделенных от пациентов на территории России) соединения также показали противовирусную активность.

Помимо этого, соединение 5116, как наиболее активное, было изучено на противовирусную активность в культуре клеток против осельтамивир-резистентных вирусов А/Денмарк/528/2009 (H1N1)pdm09 с мутацией в положении H275Y-NA, А/Фукуи/45/2004 (H3N2) с мутацией в положении E119V-NA и А/Перт/265/2009 (H1N1) с мутацией в положении H275Y.

Полученные данные показали, что соединение 5116 активно и по своей активности сравнимо с препаратом сравнения балоксавиром. При этом второй препарат сравнения осельтамивир не подавлял вирусное размножение этих штаммов.

Кроме того, нашими коллегами в ИИХР было проведено исследование для сравнения активности балоксавира и активного метаболита 5116 в отношении балоксавир-резистентных вирусов гриппа, а именно против А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09 с мутацией в положении I38T и А/Техас/71/2017 (H3N2) с мутацией в положении I38T. Полученные результаты показали, что метаболит 5116 был более эффективен, чем балоксавир, ингибируя полимеразные комплексы балоксавир-резистентных вирусов гриппа А с мутацией I38T [249].

На основе полученных данных *in vitro* можно выделить соединение 5116, как обладающее выраженной дозозависимой противовирусной активностью в отношении вирусов гриппа А и вирусов гриппа В, не меньшей, чем препарат сравнения балоксавир.

Тем не менее, 5116, хотя и более эффективный, чем балоксавир, все же был менее мощным в ингибировании полимеразной активности балоксавир-резистентных (I38T) комплексов по сравнению с балоксавир-чувствительными комплексами I38-WT [249].

При дальнейшем изучении на модели летальной гриппозной инфекции мышей максимальную эффективность показало соединение 5124, которое является пролекарством 5116, и эффективность которого превышала эффективность препарата сравнения балоксавира.

Также в исследовательском институте химического разнообразия проводили исследования фармакокинетики данных соединений на мышах показали их высокую пероральную биодоступность, которая значительно превышала биодоступность препарата сравнения, балоксавира, в сопоставимых условиях [166].

Таким образом, 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 клинического изучения.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Полученные в ходе работы результаты показывают, что среди аналогов уже существующих противогриппозных препаратов с различным механизмом действия найдены перспективные кандидаты, обладающие противовирусной активностью и улучшенными свойствами, которые в дальнейшем могут стать перспективными кандидатами для создания новых противогриппозных препаратов.

## ВЫВОДЫ

1. Аналоги римантадина, соединения 1,3-оксазинан-2-он (39) и пиперидин-2,4-дион (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 ТЦИД<sub>50</sub>/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 аналогами 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 (линия Виктория).

4. Аналоги умифеновира 12026078 и 11926007 были эффективны у мышей, инфицированных вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009(H1N1)pdm09, увеличивая выживаемость и снижая потерю массы тела. Наиболее эффективным было лечение соединением 12026078 в дозах 60 и 90 мг/кг/день, защищая от гибели 40-90% 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 высокая 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 защищало до 100% животных от гибели, практически полностью предотвращало потерю их массы тела и размножение вируса в лёгких животных ( $0,4 \pm 0,89$ -0 VS  $5,7 \pm 0,97$  lg ТЦИД<sub>50</sub>/0,1 мл).

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

CDC – Центры по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention)

FDA – Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (Food and Drug Administration)

HEF – слияние гемагглютинина и эстеразы (hemagglutinin-esterase-fusion)

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

HPMC – Гидроксипропилметилцеллюлоза (hydroxypropil methylcellulose)

HA – гемагглютинин (hemagglutinin)

M2 – белок ионного канала

M1 – матриксный белок (matrix 1)

MDCK – Клетки почек собаки Мадина-Дарби

NA – нейраминидаза (neuraminidase)

NEP (NS2) – белок ядерного экспорта (nuclear export protein)

NS1 – неструктурный белок 1 (non-structural protein 1)

PA – полимеразная кислота (polimerase acid)

PB1 – белок полимеразного комплекса 1 (polymerase basic 1 protein)

PB2 - белок полимеразного комплекса 2 (polymerase basic 2 protein)

pdm09 – пандемический 2009 года

pdm16 – пандемический 2016 года

SD – стандартное отклонение

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

БОЕ – бляшкообразующая единица

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГОСТ – государственный стандарт

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМЕМ – модифицированная по методу Дульбекко минимальная среда Игла

ИИХР – Исследовательский Институт Химического Разнообразия

ИФА – иммуноферментный анализ

ИК50 – ингибирующая концентрация 50

ИС – индекс селективности

МТТ – колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

МПК – максимально переносимая концентрация

МЕМ – минимальная среда Игла

РНК – рибонуклеиновая кислота

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция

ОП – оптическая плотность

РС – рабочая среда

РН – реакция нейтрализации

ТЦИД, TCID – тканевая цитопатическая инфекционная доза

ТЦИД<sub>50</sub> - тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток

монослоя

ТРСК – L-(тозиламидо-2-фенил)этилхлорметилкетон

ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор

ФБС – фетальная бычья сыворотка

ЦТД – цитотоксическая доза

ЦПД – цитопатическое действие

ЦХЛС-ВНИХФИ – Центр по химии лекарственных средств (Всесоюзный научно-исследовательский химико-фармацевтический институт им. Серго Орджоникидзе)

ЭИД – эмбриональная инфекционная доза

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lampejo, T. Influenza and antiviral resistance: an overview / T. Lampejo // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2020. – Vol.39 – P.1201-1208.
2. Neumann, G. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus / G. Neumann, T. Noda, Y. Kawaoka // Nature. – 2009. – Vol.459, №7249. – P.:931-9.
3. Rossman, J. S., Lamb R. A. Influenza virus assembly and budding / J. S. Rossman, R. A. Lamb // Virology. – 2011. – V. 411, №2. – P. 229-236.
4. Krammer, F. Advances in the development of influenza virus vaccines / F. Krammer, P. Palese // Nature Reviews Drug Discovery. – 2015. – Vol.14, №3. – P.167-182.
5. Литусов, Н.В. Вирусы гриппа. Иллюстрированное учебное пособие / Н.В. Литусов. – Екатеринбург: УГМУ, 2018. – 22 с. Электронный архив УГМУ [Электронный ресурс]. — URL: <http://elib.usma.ru/handle/usma/1058> (дата обращения: 10.08.2023). Текст: электронный.
6. Virology blog. About viruses and viral disease. Structure of influenza virus disease [Electronic resource]. — URL: <https://virology.ws/2009/07/30/structure-of-influenza-virus/> (дата обращения: 04.09.2023). – Текст: электронный.
7. Kinetics of proton transport into influenza virions by the viral M2 channel / T. Ivanovic, R. Rozendaal, D. L. Floyd [et al.] // PLoS One. – 2012. – V.7, №3. – P.e31566.
8. Influenza a virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture / M. Takeda, A. Pekosz, K. Shuck [et al.] // J Virol. – 2002. – Vol.76, №3. – P.1391-9.
9. McCown, M.F., Pekosz A. Distinct domains of the influenza a virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production / M. F. McCown, A. Pekosz // J Virol. – 2006. – V.80, №16. – P.8178-89.

10. Ильичева, Т. Н. Вирусы гриппа. Методы. / Т. Н. Ильичева, С.В. Нетёсов, В.Н. Гуреев – Новосибирск: Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 2019. – 260с. – ISBN: 978-5-4437-0946-8 – Текст: непосредственный

11. Report of the Review Committee on the Functioning of the International Health Regulations (2005) in relation to Pandemic (H1N1) 2009 [Electronic resource]. — URL: <https://biosecuritycentral.org/resource/policies-and-legislation/ihr-during-covid-19-report/> (дата обращения: 10.08.2023). – Текст: электронный.

12. Michaelis, M., Novel swine-origin influenza A virus in humans: another pandemic knocking at the door / M. Michaelis, H. W. Doerr, J. Cinatl // *Med Microbiol Immunol* – 2009. – Vol. 198. – P.175-183.

13. Centers for Disease Control and Prevention: official website. CDC H1N1 Flu | Questions and Answers: Antiviral Drugs, 2009-2010 Flu Season [Electronic resource]. — URL: <https://www.cdc.gov/h1n1flu/antiviral.htm> (дата обращения: 10.08.2023). – Текст: электронный.

14. Чучалин, А. Г. Грипп А (H1N1) swl: клинические аспекты, диагностический алгоритм и стратегия лечения. Изучение эволюции вирусов в рамках проблем биобезопасности и социально значимых инфекций. / А. Г. Чучалин, Л. В. Колобухина // Ингавирин® – результаты клинических исследований и публикации [Электронный ресурс]. — URL: [https://ingavirin.uz/publications/27\\_chuchalin\\_sbornik\\_bb\\_2011.pdf](https://ingavirin.uz/publications/27_chuchalin_sbornik_bb_2011.pdf) (дата обращения: 10.08.2023). – Текст: электронный.

15. World Health Organization: official website. Influenza Update N° 449 [Electronic resource]. — URL: <https://www.who.int/publications/m/item/influenza-update-n--449> (дата обращения: 14.09.2023). – Текст: электронный.

16. Has influenza B/Yamagata become extinct and what implications might this have for quadrivalent influenza vaccines? / J. Paget, S. Caini, M. Del Riccio [et al.] // *Euro Surveill.* – 2022. – Vol.27, №39. – P.2200753.

17. World Health Organization: official website. Burden of disease [Electronic resource]. — URL: <https://www.who.int/teams/global-influenza-programme/surveillance-and-monitoring/burden-of-disease> (дата обращения: 24.08.2023). — Текст: электронный.

18. Ahmed, A. A. Arbidol targeting influenza virus A Hemagglutinin; A comparative study/ A. A. Ahmed, M. Abouzid // *Biophysical Chemistry*. — 2021 — Vol. 277. — P.106663.

19. World Health Organization: official website. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2020 [Electronic resource]. — URL:

[https://web.archive.org/web/20200603072330/https://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/2020\\_MAY\\_tableH5N1.pdf](https://web.archive.org/web/20200603072330/https://www.who.int/influenza/human_animal_interface/2020_MAY_tableH5N1.pdf) (дата обращения: 24.08.2023) — Текст: электронный.

20. Centers for Disease Control and Prevention: official website. Technical Report: June 2023 Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Viruses [Electronic resource]. — URL: [https://www.cdc.gov/flu/avianflu/spotlights/2022-2023/h5n1-technical-report\\_june.htm](https://www.cdc.gov/flu/avianflu/spotlights/2022-2023/h5n1-technical-report_june.htm) (дата обращения: 24.08.2023) — Текст: электронный.

21. *In Vitro* Profiling of Laninamivir-Resistant Substitutions in N3 to N9 Avian Influenza Virus Neuraminidase Subtypes and Their Association with *In Vivo* Susceptibility / J. H. Jeong, W. S. Choi, K. J. C. Antigua [et al.] // *J Virol*. — 2020. — Vol.95, №1. — P.e01679-20.

22. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus / R. Gao, B. Cao, Y. Hu [et al.] // *N Engl J Med*. — 2013. — Vol.368, №20. — P.1888-97.

23. Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. Avian influenza A (H5N1) infection in humans / J. H. Beigel, J. Farrar, A. M. Han [et al.] // *N Engl J Med*. — 2005. — Vol.353, №13. — P.1374-85.

24. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus Infections in Humans / S. Garg, K. Reinhart, A. Couture [et al.] // *N Engl J Med*. — 2025. — Vol.392, №9. — P.843-854.

25. Противовирусная активность производных адамантана в отношении вируса гриппа а(H1N1)pdm09 на модели *in vivo* / М. Ю. Щелканов, В. А. Шибнев, М. П. Финогонова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2014. – Т.59, №2. – С.37-40.

26. Influenza A virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture / M. Takeda, A. Pekosz, K. Shuck [et al.] // J Virol. – 2002. – Vol.76, №3. – P.1391-9.

27. Регистр лекарственных средств. Амантадин (Amantadinum) [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.rlsnet.ru/active-substance/amantadin-845> (дата обращения: 05.09.2023) – Текст: электронный.

28. Регистр лекарственных средств. Римантадин (Rimantadine) [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.rlsnet.ru/drugs/rimantadin-15002> (дата обращения: 05.09.2023) – Текст: электронный.

29. Amantadine and rimantadine for influenza A in adults / T. Jefferson, V. Demicheli, C. Di Pietrantonj, D. Rivetti // Cochrane Database Syst Rev. – 2006. – Vol.2006, №2. – P.CD001169.

30. Tsunada, A. Antiviral activity of alpha-methyl-1-adamantane methylamine hydrochloride / A. Tsunada, H. F. Maasab, K. W. Cochran, W. C. Eveland // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1965. – Vol.5. – P.553-560.

31. Davies, W. L. Influenza virus growth and antibody response in amantadine-treated mice / W. L. Davies, R. R. Grunert, C. E. Hoffmann // J Immunol. – 1965. – Vol.95, №6. – P.1090-4.

32. Younkin, S. W. Reduction in fever and symptoms in young adults with influenza A/Brazil/78 H1N1 infection after treatment with aspirin or amantadine / S. W. Younkin, R. F. Betts, F. K. Roth, R. G. Jr. Douglas // Antimicrob Agents Chemother. – 1983. – Vol.23, №4. – P.577-82.

33. Quarles, J. M. Comparison of amantadine and rimantadine for prevention of type A (Russian) influenza / J. M. Quarles, R. B. Couch, T. R. Cate, C. B. Goswick // Antiviral Res. – 1981. – Vol.1, №3. – P.149-55.

34. Hayden, F. G. Plaque inhibition assay for drug susceptibility testing of influenza viruses / F. G. Hayden, K. M. Cote, R. G. Jr. Douglas // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1980. – Vol.17, №5. – P.865-70
35. Nicholson, K.G. Amantadine for influenza A / K. G. Nicholson, M. J. Wiselka // *BMJ.* – 1991. – Vol.302, №6774. – P.425-6.
36. Rabinovich, S. Treatment of influenza. The therapeutic efficacy of rimantadine HCL in a naturally occurring influenza A2 outbreak / S. Rabinovich, J. T. Baldini, R. Bannister // *American Journal of Medical Sciences.* – 1969. – Vol.257, №5. –P. 328-335.
37. Safety and prophylactic efficacy of low-dose rimantadine in adults during an influenza A epidemic / M. T. Brady, S. D. Sears, D. L. Pacini [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1990. – Vol.34, №9. – P.1633-6.
38. Hayden, F. G. Oral rimantadine hydrochloride therapy of influenza A virus H3N2 subtype infection in adults / F. G. Hayden, A. S. Monto // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1986. – Vol.29, №2. – P.339-41.
39. Alves Galvão, M. G. Amantadine and rimantadine for influenza A in children and the elderly / M. G. Alves Galvão, M. A. Rocha Crispino Santos, A. J. Alves da Cunha // *Cochrane Database Syst Rev.* – 2014 – Vol.2014, №11. – P.CD002745
40. Comparative single-dose pharmacokinetics of amantadine hydrochloride and rimantadine hydrochloride in young and elderly adults / F. G. Hayden, A. Minocha, D. A. Spyker [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother* – 1985. – Vol.28, №2. – P. 216-221.
41. The emerging influenza virus threat: status and new prospects for its therapy and control / B. Kumar, K. Asha, M. Khanna [et al.] // *Arch Virol.* – 2018. – Vol.163, №4. – P.831-844.
42. Li, T. C. Clinical Implications of Antiviral Resistance in Influenza / T. C. Li, M. C. Chan, N. Lee // *Viruses.* – 2015. – Vol.7, №9. – P.4929-44
43. Hayden, F.G. Emergence and Transmission of Influenza A Viruses Resistant to Amantadine and Rimantadine / F. G. Hayden, A. J. Hay // *Current Topics in Microbiology and Immunology.* – 1992. –Vol.176. – P.119–130.

44. ChemSpider Search and share chemistry. Zanamivir [Electronic resource]. — URL: <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.54842.html> (дата обращения: 15.09.2023) — Текст: электронный.
45. Świerczyńska, M. Antiviral Drugs in Influenza / M. Świerczyńska, D. M. Mirowska-Guzel, E. Pindelska // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. — 2022. — Vol.19. — P.3018.
46. Cheer, S. M. Zanamivir: an update of its use in influenza / S. M. Cheer, A. J. Wagstaff // *Drugs*. — 2002. — Vol.62, №1. — P.71-106.
47. Zanamivir Diminishes Lung Damage in Influenza A Virus-infected Mice by Inhibiting Nitric Oxide Production / B. Zablockienė, T. Kačergius, A. Ambrozaitis [et al.] // *In Vivo*. — 2018. — Vol.32, №3. — P.473-478.
48. Действие субстанции занамивир на инфекцию, вызванную высококовирулентным вирусом гриппа птиц A/H5N1 в культурах клеток / П. Г. Дерябин, Г. А. Галегов, А. Г. Ботиков [и др.] // *Вопросы вирусологии*. — 2011. — Т.56., № 1. — С. 21-24.
49. Чувствительность эпидемических и пандемических штаммов вирусов гриппа к занамивиру (РелензеТМ) в опытах *in vitro* / Д. К. Львов, Е. И. Бурцева, Г. А. Галегов [и др.] // *Вопросы вирусологии*. — 2010. — Т. 55, №6. — С.10-14.
50. Association between adverse clinical outcome in human disease caused by novel influenza A H7N9 virus and sustained viral shedding and emergence of antiviral resistance / Y. Hu, S. Lu, Z. Song [et al.] // *Lancet*. — 2013. — Vol.381, №9885. — P.2273-2282.
51. Zanamivir for influenza in adults and children: systematic review of clinical study reports and summary of regulatory comments / C. J. Heneghan, I. Onakpoya, M. Thompson [et al.] // *BMJ*. — 2014. — Vol.348. — P.g2547.
52. Zanamivir Family Study Group. Inhaled zanamivir for the prevention of influenza in families. Zanamivir Family Study Group / F. G. Hayden, L. V. Gubareva, A. S. Monto [et al.] // *N Engl J Med*. — 2000. — Vol.343, №18. — P.1282-9.

53. Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenzavirus infections. GG167 Influenza Study Group / F. G. Hayden, A. D. Osterhaus, J. J. Treanor [et al.] // *N Engl J Med.* – 1997. – Vol.337, №13. – P.874-80.

54. Zanamivir for treatment of symptomatic influenza A and B infection in children five to twelve years of age: a randomized controlled trial / J. A. Hedrick, A. Barzilai, U. Behre [et al.] // *Pediatr Infect Dis J.* – 2000. – Vol.19, №5. – 410-7.

55. Lalezari, J. Zanamivir for the treatment of influenza A and B infection in high-risk patients: a pooled analysis of randomized controlled trials / J. Lalezari, K. Campion, O. Keene, C. Silagy // *Arch Intern Med.* – 2001. – Vol.161, №2. – P.212-7.

56. Clinical efficacy and safety of the orally inhaled neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza: a randomized, double-blind, placebo-controlled European study / M. J. Mäkelä, K. Pauksens, T. Rostila [et al.] // *J Infect.* – 2000. – Vol.40, №1. – P.42-8.

57. Регистр лекарственных средств. Занамивир (Zanamivirum) [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.rlsnet.ru/active-substance/zanamivir-2528> (дата обращения: 03.10.2023) – Текст: электронный.

58. Регистр лекарственных средств. Осельтамивир (Oseltamivirum) [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.rlsnet.ru/active-substance/oseltamivir-2489> (дата обращения: 03.10.2023) – Текст: электронный.

59. Virus susceptibility and clinical effectiveness of anti-influenza drugs during the 2010–2011 influenza season in Russia / I.A. Leneva, E.I. Burtseva, S.B. Yatsyshina [et al.] // *International Journal of Infectious Diseases.* – 2016. – Vol.43. – P.77-84.

60. Efficacy of oseltamivir therapy in ferrets inoculated with different clades of H5N1 influenza virus / E. A. Govorkova, N. A. Ilyushina, D. A. Boltz [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2007. – Vol.51, №4. – P.1414-24.

61. Assessment of the efficacy of the neuraminidase inhibitor oseltamivir against 2009 pandemic H1N1 influenza virus in ferrets / E. A. Govorkova, B. M. Marathe, A. Prevost [et al.] // *Antiviral Res.* – 2011. – Vol.91, №2. – P.81-88.

62. The neuraminidase inhibitor GS4104 (oseltamivir phosphate) is efficacious against A/Hong Kong/156/97 (H5N1) and A/Hong Kong/1074/99 (H9N2) influenza

viruses / I. A. Leneva, N. Roberts, E. A. Govorkova [et al.] // *Antiviral Res.* – 2000. – Vol.48, №2. – P.101-15.

63. Oral oseltamivir treatment of influenza in children / R. J. Whitley, F.G. Hayden, K. Reisinger [et al.] // *Pediatr Infect Dis J.* – 2021. – Vol.20, №2. – P.127-133.

64. Efficacy and Safety of the Oral Neuraminidase Inhibitor Oseltamivir in Treating Acute Influenza: A Randomized Controlled Trial / J. J. Treanor, F. G. Hayden, P. S. Vrooman [et al.] // *JAMA.* – 2000. – Vol.283, №8. – P.1016–1024.

65. Effectiveness of neuraminidase inhibitors in treatment and prevention of influenza A and B: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials / N. J. Cooper, A. J. Sutton, K. R. Abrams [et al.] // *BMJ* – 2003. – Vol.326, №7401. – P.1235-1239.

66. Efficacy and Safety of Oseltamivir in Children: Systematic Review and Individual Patient Data Meta-analysis of Randomized Controlled Trials / R. E. Malosh, E. T. Martin, T. Heikkinen [et al.] // *Clin Infect Dis.* – 2018 – Vol.66, №10. – P.1492-1500.

67. Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. Neuraminidase Inhibitor Flu Treatment Investigator Group / K. G. Nicholson, F. Y. Aoki, A. D. Osterhaus [et al.] // *Lancet.* – 2000. – Vol.355, №9218. – P.1845-50.

68. Schirmer, P. Oseltamivir for treatment and prophylaxis of influenza infection / P. Schirmer, M. Holodniy // *Expert Opin Drug Saf.* – 2009. – Vol.8, №3. – P.357-71.

69. Dobson, J. Oseltamivir treatment for influenza in adults: a meta-analysis of randomised controlled trials / J. Dobson, R. J. Whitley, S. Pocock, A. S. Monto // *Lancet.* – 2015. – Vol.385, №9979. – P.1729-1737.

70. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007–08 / S. H. Hauge, S. Dudman, K. Borgen [et al.] // *Emerging Infectious Diseases.* – 2009. – Vol.15, №2. – P.155-162.

71. Centers for Disease Control and Prevention: official website. CDC. Update: Influenza activity—United States, 2009–10 season [Electronic resource]. — URL: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5929a2.htm> (дата обращения: 25.10.2023) — Текст: электронный.

72. Oseltamivir-Resistant Pandemic (H1N1) 2009 Virus Infections, United States, 2010–11 / A. D. Sorms, L. V. Gubareva, S. Su, [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. — 2012. — №18. — P.308 - 311.

73. Centers for Disease Control and Prevention: official website. CDC. Issues Interim Recommendations for the Use of Influenza Antiviral Medications in the Setting of Oseltamivir Resistance among Circulating Influenza A (H1N1) Viruses – 2008–09 Influenza Season. [Electronic resource]. — URL: <https://www.cdc.gov/MMWR/Preview/MMWRhtml/mm5805a4.htm><https://www.cdc.gov/MMWR/Preview/MMWRhtml/mm5805a4.htm> (дата обращения: 25.10.2023) — Текст: электронный.

74. Japanese Influenza Collaborative Study Group. Emergence of H274Y oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Japan during the 2008-2009 season / T. Baranovich, R. Saito, Y. Suzuki [et al.] // *J Clin Virol*. — 2010. — Vol.47, №1. — P.23-8.

75. Detection of the rapid emergence of the H275Y mutation associated with oseltamivir resistance in severe pandemic influenza virus A/H1N1 09 infections / B. Wang, D. E. Dwyer, C. C. Blyth [et al.] // *Antiviral Res*. — 2010. — Vol.87, №1. — P.16-21.

76. Influenza antivirals and their role in pandemic preparedness / J. C. Jones, H. L. Yen, P. Adams [et al.] // *Antiviral Research*. — 2023. — Vol.210. — P.105499.

77. Global update on the susceptibilities of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir, 2018-2020 / E. A. Govorkova, E. Takashita, R. S. Daniels [et al.] // *Antiviral Res*. — 2022. — Vol.200. — P.105281.

78. Donner, B. Safety of oseltamivir in pregnancy: a review of preclinical and clinical data / B. Donner, V. Niranjana, G. Hoffmann // *Drug Saf.* – 2010. – Vol.33, №8. – P.631-642.

79. Справочник лекарственных средств. Осельтамивир [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.vidal.ru/drugs/oseltamivir-3> (дата обращения: 27.10.2023) – Текст: электронный.

80. ChemSpider search and share chemistry. Laninamivir [Electronic resource]. — URL: <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.439182.html> (дата обращения: 27.10.2023) – Текст: электронный.

81. Peramivir and laninamivir susceptibility of circulating influenza A and B viruses / S. K. Leang, S. Kwok, S. G. Sullivan [et al.] // *Influenza Other Respir Viruses.* – 2014. – Vol.8, №2. – P.135-9.

82. CS-8958, a prodrug of the new neuraminidase inhibitor R-125489, shows long-acting anti-influenza virus activity / M. Yamashita, T. Tomozawa, M. Kakuta [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2009. – Vol.53, №1. – P.186-92.

83. Efficacy of the new neuraminidase inhibitor CS-8958 against H5N1 influenza viruses / M. Kiso, S. Kubo, M. Ozawa [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2010. – Vol.6, №2. – P.e1000786.

84. Yamashita, M. Laninamivir and its prodrug, CS-8958: long-acting neuraminidase inhibitors for the treatment of influenza / M. Yamashita // *Antivir Chem Chemother.* – 2010. – Vol.21, №2. –P.71-84.

85. Laninamivir Prodrug CS-8958, a Long-Acting Neuraminidase Inhibitor, Shows Superior Anti-Influenza Virus Activity after a Single Administration / S. Kubo, T. Tomozawa, M. Kakuta [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2010. – Vol.54, №3. – P.1256-1264.

86. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses / Y. Itoh, K. Shinya, M. Kiso [et al.] // *Nature.* – 2009. – Vol.460, №7258. – P.1021-5.

87. Ikematsu, H. Laninamivir octanoate: a new long-acting neuraminidase inhibitor for the treatment of influenza. / H. Ikematsu, N. Kawai // *Expert Rev Anti Infect Ther.* – 2011– Vol.9, №10. – P.851-857.

88. Impact of the number of repeated inhalations and patient characteristics on the residual amount of inhaled laninamivir octanoate hydrate dry powder in pediatric patients with influenza / T. Murasaka, K. Ikemura, T. Enokiya [et al.] // *J Pharm Health Care Sci.* – 2017. – Vol.8, №3. – P.26.

89. High and continuous exposure of laninamivir, an anti-influenza drug, may work suppressively to generate low-susceptibility mutants in animals / S. Kubo, A. Tokumitsu, T. Tomozawa [et al.] // *Journal of Infection and Chemotherapy.* – 2012. – Vol.18, №1. – P.69-74.

90. Alame, M.M. Peramivir: A Novel Intravenous Neuraminidase Inhibitor for Treatment of Acute Influenza Infections / M. M. Alame, E. Massaad, H. Zaraket // *Front Microbiol.* – 2016. – №7. – P. 450.

91. Anti-influenza virus activity of peramivir in mice with single intramuscular injection / S. Bantia, C. S. Arnold, C. D. Parker [et al.] // *Antivir Res.* – 2006. – Vol.69, №1. –P. 39-45.

92. Kohno, S. Efficacy and Safety of Intravenous Peramivir for Treatment of Seasonal Influenza Virus Infection / S. Kohno, H. Kida, M. Mizuguchi, J. Shimada // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2010. – Vol.54, №11. – P.4568-4574.

93. Intravenous Peramivir for Treatment of Influenza in Hospitalized Patients / M. G. Ison, J. Fraiz, B. Heller [et al.] // *Antiviral Therapy.* –2014. – Vol.19, №4. – P.349-361.

94. McKimm-Breschkin, J. L. Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance / J. L. McKimm-Breschkin // *Influenza Other Respir Viruses.* – 2013. – Vol.1, №1. –P.25-36.

95. Wester, A. Peramivir injection in the treatment of acute influenza: a review of the literature / Wester A., Shetty A. K. // *Infect Drug Resist.* – 2016. – Vol.9. – P.201-14.

96. Leneva, I. A. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol / I. A. Leneva, R. J. Russell, Y. S. Boriskin, A. J. Hay. // *Antiviral Res.* – 2009. – Vol.81, №2. – P.132-140.

96. Регистр лекарственных средств. Умифеновир (Umifenovirum) [Электронный ресурс]. — URL: <https://www.rlsnet.ru/active-substance/umifenovir-1209> (дата обращения: 29.10.2023) – Текст: электронный.

97. Kadam, R. U. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol / R. U. Kadam, I. A. Wilson // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2017. – Vol.114, №2. – P.206-214.

98. Клиническая эффективность умифеновира при гриппе и ОРВИ (исследование АРБИТР) / Н. Ю. Пшеничная, В. А. Булгакова, Н. И. Львов [и др.] // *Терапевтический архив.* – 2019. – Т.91, №3. – С. 56-63.

99. Исследование противовирусной активности российских противогриппозных препаратов на культуре клеток и животных моделях / И. А. Ленева, И. Т. Федякина, М. И. Еропкин [и др.] // *Вопросы вирусологии.* – 2010. – Vol.55, №3. – P.19-27.

100. Antiviral activity of arbidol, a broad-spectrum drug for use against respiratory viruses, varies according to test conditions / M. J. Brooks, E. I. Burtseva, P. J. Ellery, G. A. Marsh [et al.] // *J Med Virol.* – 2012. – Vol.84, №1. – P.170-81.

101. Изучение чувствительности пандемических вирусов гриппа А 2009 Н1N1 и высоковирулентных вирусов гриппа птиц А (H5N1) к противогриппозным химиопрепаратам / И. Т. Федякина, М. Ю. Щелканов, П. Г. Дерябин [и др.] // *Антибиот Химиотер.* – 2011. – Vol.56, №3-4. – P.3-9.

102. Ленева, И. А. Чувствительность различных штаммов вируса гриппа к арбидолу. Влияние комбинации арбидола с различными противовирусными препаратами на репродукцию вируса гриппа А / И. А. Ленева, И. Т. Федякина, Т. А. Гуськова, Р. Г. Глушков // *Тер Арх.* – 2005. – Т.77, №8. – P.84-8.

103. Inhibition of the infectivity and inflammatory response of influenza virus by Arbidol hydrochloride in vitro and in vivo (mice and ferret) / Y. Wang, Y. Ding, C. Yang [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2017. – Vol.91. – P.393-401.

104. Ленева, И.А. Противовирусные этиотропные препараты: эффективность в отношении вирусов гриппа А подтипа H5N1 / И. А. Ленева, А. М. Шустер // *Вопр. Вирусол.* – 2006. – Т.51. – Р. 4–7.

105. Antiviral and anti-inflammatory activity of arbidol hydrochloride in influenza A (H1N1) virus infection / Q. Liu, H. R. Xiong, L. Lu [et al.] // *Acta Pharmacol Sin.* – 2013. – Vol.34, №8. – P.1075-83.

106. Профилактическая и лечебная эффективность Арбидола / Е. П. Селькова, Т. А. Семененко, В. Ф. Учайкин [и др.] // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* – 2005. – Т.1, №20. – С.49-53.

107. Efficacy and safety of arbidol in treatment of naturally acquired influenza / M. Z. Wang, B. Q. Cai, L. Y. Li [et al.] // *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* – 2004. – Vol.26, №3. – P.289-93.

108. Арбидол - новое средство для профилактики гриппа и острых респираторных вирусных инфекций у детей / А. Л. Беляев, Е. И. Бурцева, А. Н. Слепушкин [и др.] // *Вестн Росс Акад Мед Наук.* – 1996. – Т.8 – С.34-7.

109. Химиопрепараты в терапии гриппа и других респираторных вирусных инфекций у детей / В. П. Дриневский, Л. В. Осидак, В. К. Нацина [и др.] // *Антибиот Химиотер.* – 1998. – Т.43, №9. – С.29-34.

110. Virus susceptibility and clinical effectiveness of anti-influenza drugs during the 2010-2011 influenza season in Russia / I. A. Leneva, E. I. Burtseva, S. B. Yatsyshina [et al.] // *Int J Infect Dis.* – 2016. – Vol.43. – P.77-84.

111. Тютюник, Л. П. Проблема выбора этиотропного препарата при гриппе у детей / Л. П. Тютюник, Е. С. Гасилина, Г. В. Санталова // *Известия Самарского научного центра РАН.* – 2015. – Т.17, №5-3. – С.883-888

112. Multicenter, randomized controlled, open label evaluation of the efficacy and safety of arbidol hydrochloride tablets in the treatment of influenza-like cases / X. Bai, S. Xi, G. Chen [et al.] // *BMC Infect Dis.* – 2023. – Vol.23, №1. – P.585.

113. Umifenovir susceptibility monitoring and characterization of influenza viruses isolated during ARBITR clinical study / I. A. Leneva, I. N. Falynskova, N. R. Makhmudova, [et al.]. // *Medical Virology*. – 2019. – V.91, №4. – P.588-597.

114. Зырянов, С. К. Фармакотерапия острых респираторных инфекций, вызванных вирусами гриппа / С. К. Зырянов, О. И. Бутранова, Д. С. Гайдай, Крышень К. Л. // *Терапевтический архив*. – 2021. – Т. 93, №1. – С. 114-124.

115. Ng, K.E. Xofluza (Baloxavir Marboxil) for the Treatment Of Acute Uncomplicated Influenza / K. E. Ng // *P T*. –2019 – Vol.44, №1. – P.9-11.

116. ChemSpider search and share chemistry. Baloxavir marboxil [Electronic resource]. — URL: <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.59718643.html> (дата обращения: 17.11.2023) – Текст: электронный.

117. In vitro characterization of baloxavir acid, a first-in-class cap-dependent endonuclease inhibitor of the influenza virus polymerase PA subunit / T. Noshi, M. Kitano, K. Taniguchi, [et al.] // *Antiviral Res.* – 2018. – Vol.160. – P.109-117.

118. S-033447/S-033188, a Novel Small Molecule Inhibitor of Cap-Dependent Endonuclease of Influenza A and B Virus: In Vitro Antiviral Activity Against Clinical Strains / T. Noshi, A. Yamamoto, M. Kawai, [et al.] // *Open Forum Infectious Diseases*. – 2016. – V.3, №1. – P.645.

119. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of baloxavir marboxil, a novel cap-dependent endonuclease inhibitor, in a murine model of influenza virus infection / Y. Ando, T. Noshi, K. Sato [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2021. – Vol.76, №1. – P.189-198.

120. Inhibition of avian-origin influenza A(H7N9) virus by the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil / K. Taniguchi, Y. Ando, H. Nobori [et al.] // *Sci Rep.* – 2019. – Vol.9, №1. – P.3466.

121. Baloxavir marboxil, a novel cap-dependent endonuclease inhibitor potently suppresses influenza virus replication and represents therapeutic effects in both immunocompetent and immunocompromised mouse models / K. Fukao, Y. Ando, T. Noshi [et al.] // *PLoS One*. – 2019. – Vol.14, №5. – P.e0217307.

122. Koszalka, P. Influenza antivirals currently in late-phase clinical trial / P. Koszalka, D. Tilmanis, A. C. Hurt // *Influenza Other Respir Viruses*. – 2017. – Vol.11, №3. – P.240-246.

123. Inhibition of avian-origin influenza A(H7N9) virus by the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil / K. Taniguchi, Y. Ando, H. Nobori [et al.] // *Sci Rep*. – 2019. – Vol.9, №1. – P.3466.

124. Combination treatment with the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil and a neuraminidase inhibitor in a mouse model of influenza A virus infection / K. Fukao, T. Noshi, A. Yamamoto [et al.] // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2019. – 74 – P.654–662.

125. Baloxavir marboxil for uncomplicated influenza in adults and adolescents / F. G. Hayden, N. Sugaya, N. Hirotsu [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2018. – № 379 – P.913–923.

126. LB16. Phase 3 Trial of Baloxavir Marboxil in High-Risk Influenza Patients (CAPSTONE-2 Study) / M. G. Ison, S. Portsmouth, Y. Yoshida [et al.] // *Open Forum Infectious Diseases*. – 2018. – Vol.5, №1. – P. S764–S765.

127. Odagiri Susceptibility of Influenza Viruses to the Novel Cap-Dependent Endonuclease Inhibitor Baloxavir Marboxil / E. Takashita, H. Morita, R. Ogawa [et al.] // *Front Microbiol.* – 2018. – Vol.9. – P.3026.

128. Baloxavir Marboxil Single-dose Treatment in Influenza-infected Children: A Randomized, Double-blind, Active Controlled Phase 3 Safety and Efficacy Trial (miniSTONE-2) / J. Baker, S. L. Block, B. Matharu [et al.] // *Pediatr Infect Dis J.* – 2020. – Vol.39, №8. – P.700-705.

129. Phase 3 trial of baloxavir marboxil in high-risk influenza patients (CAPSTONE-2 study) / M. G. Ison, S. Portsmouth, Y. Yoshida [et al.] // *Open Forum Infect Dis.* – 2018. – Vol.5. – P.S764–S765.

130. Efficacy of baloxavir marboxil on household transmission of influenza infection / T. Umemura, Y. Mutoh, T. Kawamura [et al.] // *J Pharm Health Care Sci.* – 2020. – Vol.6. – P. 21.

131. Pharmacokinetics and safety of a novel influenza treatment (baloxavir marboxil) in Korean subjects compared with Japanese subjects / Y. Kim, S. Lee, Y. Kim [et al.] // Clin Transl Sci. – 2022. – Vol.15, №2. – P.422-432.

132. Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil / S. Omoto, V. Speranzini, T. Hashimoto [et al.] // Sci Rep. – 2018. – Vol.8, №1. – P.9633.

133. Противовирусный препарат Триазавирин: от скрининга до клинической апробации / Э. Г. Деева, В. Л. Русинов, В. Н. Чарушин [и др.] // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. – № 2. – С.144-151.

134. Triazavirin—A Novel Effective Antiviral Drug / O. N. Chupakhin, V. L. Rusinov, M. V. Varaksin [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – Vol.23. – P.14537.

135. ChemSpider search and share chemostry. Riamilovir [Electronic resource]. — URL: <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2367718.html> (дата обращения: 17.01.2024) – Текст: электронный.

136. Исследование противовирусной активности триазавирина в отношении вируса гриппа А (H5N1) в культуре клеток / С. И. Логинова, С. В. Борисевич, В. А. Максимов [и др.] // Антибиот Химиотер. – 2007. – Т.52, №11-12. – P.18-20.

137. Effect of Triazavirine on the Outcome of a Lethal Influenza Infection and Secondary Bacterial Pneumonia Following Influenza in Mice / I. A. Leneva, I. N. Falynskova, N. R. Makhmudova [et al.] // Microbiol. Indep. Res. J. – 2017. – Vol.4. – P.52–57.

138. Antiviral properties, metabolism, and pharmacokinetics of a novel azolo-1,2,4-triazine-derived inhibitor of influenza A and B virus replication / I. Karpenko, S. Deev, O. Kiselev [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2010. – Vol.54, №5. – P. 2017-22.

139. Изучение профилактической эффективности Триазавирина в отношении возбудителя гриппа А (H5N1) / С. Я. Логинова, С. В. Борисевич, В. А. Максимов [и др.] // Антибиотики и Химиотерапия. – 2010. – Т.55, № 9-10. – С.25-28.

140. Вереvщиков, В. К. Современная этиотропная терапия гриппа и ОРВИ у взрослых больных с отягощённой преморбидной патологией / В. К. Вереvщиков, Е. К. Шемякина, А. У. Сабитов, Н. А. Бацкалевич // Антибиотики и химиотерапия. – 2018. – №7-8. – С. 47-50.

141. Новый противовирусный препарат Триазавирин. Результаты II фазы клинического исследования / О. И. Киселев, Э. Г. Деева, Т. И. Мельникова [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2012. – №6. – С.9-12.

142. Метаанализ рандомизированных клинических исследований эффективности препарата Риамилловир в этиотропной терапии гриппа / А. У. Сабитов, О. П. Ковтун, Н. А. Бацкалевич [и др.] // Антибиотики и Химиотерапия. – 2021. – Т. 66, № 5-6. – С. 58-71.

143. Метаанализ рандомизированных контролируемых клинических исследований эффективности препарата Риамилловир в этиотропной терапии острой респираторной вирусной инфекции / А. У. Сабитов, О. П. Ковтун, Н. А. Бацкалевич [и др.] // Антибиотики и Химиотерапия. – 2021. – Т.66, № 5-6. – С.48-57.

144. ChemSpider search and share chemistry. Favipiravir [Electronic resource]. — URL: <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.431002.html> (дата обращения: 17.01.2024) – Текст: электронный.

145. Furuta, Y. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase / Y. Furuta, T. Komeno, T. Nakamura // Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. – 2017. – Vol.93, № 7. – P.449-463.

146. The ambiguous base-pairing and high substrate efficiency of T-705 (Favipiravir) Ribofuranosyl 5'-triphosphate towards influenza A virus polymerase / Z. Jin, L. K. Smith, V. K. Rajwanshi [et al.] // PLOS One. – 2013 – Vol.8, №7. – P.e68347.

147. T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influenza A H1N1 viruses in vitro / T. Baranovich, S. S. Wong, J. Armstrong [et al.] // Journal of Virology. – 2013. – Vol.87, №7. – P. 3741-3751.

148. Du, Y. Favipiravir: Pharmacokinetics and Concerns About Clinical Trials for 2019-nCoV Infection / Y. Du, X. Chen // *Clin Pharmacol Ther.* – 2020 – Vol.108, №2 – P.242-247.

149. L. Role of human hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase in activation of the antiviral agent T-705 (favipiravir) / L. W. Naesens, D. T. Guddat, A. B. Keough [et al.] // *Mol. Pharmacol.* – 2013. – Vol.84, №4. – P.615-629.

150. Fang, Q. Advanced researches on the inhibition of influenza virus by Favipiravir and Baloxavir / Q. Fang, D. Wang // *Biosafety and Health.* – 2020. – Vol. 2, №2. – P. 64-70.

151. In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705 / Y. Furuta, K. Takahashi, Y. Fukuda [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2002. – Vol.46, № 4. – P. 977-81.

152. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor / Y. Furuta, B. B. Gowen, K. Takahashi [et al.] // *Antiviral Res.* – 2013. – Vol.100, №2. – P.446-54.

153. In vitro and in vivo activities of T-705 and oseltamivir against influenza virus / K. Takahashi, Y. Furuta, Y. Fukuda [et al.] // *Antivir Chem Chemother.* – 2003. – Vol.14, №5 – P.235-41.

154. Efficacy of orally administered T-705 on lethal avian influenza a (H5N1) virus infections in mice Antimicrob / R. W. Sidwell, D. L. Barnard, C. W. Day [et al.] // *Agents Chemother.* – 2007– Vol.51, №3. – P.845-851.

155. Effectiveness of favipiravir (T-705) against wild-type and oseltamivir-resistant influenza B virus in mice / Q. Q. Fang, W. J. Huang, X. Y. Li [et al.] // *Virology.* – 2020. – Vol.545 – P.1-9.

156. Efficacy of orally administered T-705 on lethal avian influenza A (H5N1) virus infections in mice / R. W. Sidwell, D. L. Barnard, C. W. Day [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2007. – Vol.51, №3. – P.845-51.

157. T-705 (favipiravir) activity against lethal H5N1 influenza A viruses / M. Kiso, K. Takahashi, Y. Sakai-Tagawa [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – Vol.107, №2. – P.882-7.

158. In vitro and in vivo activities of T-705 and oseltamivir against influenza virus / K. Takahashi, Y. Furuta, Y. Fukuda [et al.] // *Antivir Chem Chemother.* – 2003. – Vol.14, №5. – P.235-41.

159. Optimizing T-705 (favipiravir) treatment of severe influenza B virus infection in the immunocompromised mouse model / P. N. Q. Pascua, B. M. Marathe, P. Vogel [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2019. – Vol.74, №5 – P.1333-1341.

160. In vitro antiviral activity of favipiravir (T-705) against drug-resistant influenza and 2009 A(H1N1) viruses / K. Sleeman, V. P. Mishin, V. M. Deyde [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. – Vol.54, №6. – P.2517-24.

161. Prevention and treatment of respiratory viral infections: Presentations on antivirals, traditional therapies and host-directed interventions at the 5th ISIRV Antiviral Group conference / J. L. McKimm-Breschkin, S. Jiang, D. S. Hui [et al.] // *Antiviral Res.* – 2018. – Vol.149. – P.118-142.

162. McKimm-Breschkin, J. L. Meeting report: 4th ISIRV antiviral group conference: Novel antiviral therapies for influenza and other respiratory viruses / J. L. McKimm-Breschkin, A. M. Fry // *Antiviral Res.* – 2016. – Vol.129. – P.21-38.

163. Shiraki, K. Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections / K. Shiraki, T. Daikoku // *Pharmacol Ther.* – 2020. – Vol. 209. – P.107512.

164. Pilkington, V. A review of the safety of favipiravir – a potential treatment in the COVID-19 pandemic? / V. Pilkington, T. Pepperrell, A. Hill // *Journal of Virus Eradication.* – 2020. – Vol.6, №2. – P.45–51.

165. 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 Virus / E. A. Glubokova, I. A. Leneva, N. P. Kartashova [et al.] // *Acta Naturae.* – 2021. – Vol.13, № 2. – P.116-125.

166. Non-rigid Diarylmethyl Analogs of Baloxavir as Cap-Dependent Endonuclease Inhibitors of Influenza Viruses / A. A. Ivashchenko, O. D. Mitkin, J. C. Jones [et al.] // *J Med Chem.* – 2020. – Vol.63, №17. – P.9403-9420.

167. ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200127506> (дата обращения: 19.12.2023). – Текст: электронный.

168. Zlydnikov, D. M. Study of rimantadine in the USSR: a review of the literature / D. M. Zlydnikov, O. I. Kubar, T. P. Kovaleva, L. E. Kamforin // *Rev Infect Dis.* –1981. – Vol.3№3. – P.408-421.

169. Resistance of influenza A virus to amantadine and rimantadine: results of one decade of surveillance / R. B. Belshe, B. Burk, F. Newman [et al.] // *J Infect Dis.* – 1989. – Vol.159, №3. – P.430-435.

170. High levels of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses and interim guidelines for use of antiviral agents—United States, 2005-06 influenza season / R. A. Bright, D. Shay, J. Bresee [et al.] // *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* – 2006. – Vol.55, № 2. – P.44-46.

171. Musharrafieh, R. Profiling the in vitro drug-resistance mechanism of influenza A viruses towards the AM2-S31N proton channel blockers / R. Musharrafieh, C. Ma, J. Wang // *Antiviral Res.* – 2018. – Vol.153 – P.10-22.

172. The L46P mutant confers a novel allosteric mechanism of resistance toward the influenza A virus M2 S31N proton channel blockers / R. Musharrafieh, P. I. Lagarias, C. Ma [et al.] // *Mol Pharmacol.* – 2019. – Vol.96, №2. – P.148-157.

173. Stereoselective synthesis of novel adamantane derivatives with high potency against rimantadine-resistant influenza A virus strains / N. Y. Kuznetsov, R. M. Tikhov, I. A. Godovikov [et al.] // *Org. Biomol. Chem.* – 2017. – Vol.15, №15. – P. 3152–3157.

174. Centers for Disease Control and Prevention: official website. What are the benefits of flu vaccination? [Electronic resource]. — URL: <https://www.cdc.gov/flu/prevent/vaccine-benefits.htm> (дата обращения: 27.01.2024) – Текст: электронный.

175. Influenza Vaccine Effectiveness Against 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Virus Differed by Vaccine Type During 2013-2014 in the United States / M. Gaglani, J. Pruszynski, K. Murthy [et al.] // *J Infect Dis.* – 2016. – Vol.213, №10. – P.1546-56.

176. Ruben, F. L. Prevention and control of influenza. Role of vaccine / F. L. Ruben // *Am J Med.* – 1987. – Vol.82, №6A. – P.31-4.
177. Chen, J. R. Better influenza vaccines: an industry perspective / J. R. Chen, Y. M. Liu, Y. C. Tseng, C. Ma // *J Biomed Sci.* – 2020. – Vol.27, №1. – P.33.
178. Selecting and Using the Appropriate Influenza Vaccine for Each Individual / T. Sekiya, M. Ohno, N. Nomura [et al.] // *Viruses.* – 2021. – Vol.13, №6. – P.971.
179. Poland, G. A. Influenza vaccine failure: failure to protect or failure to understand? / G. A. Poland // *Expert Rev Vaccines.* – 2018. – Vol.17, №6. – P.495-502.
180. Bosaeed, M. Seasonal influenza vaccine in immunocompromised persons / M. Bosaeed, D. Kumar // *Hum Vaccin Immunother.* – 2018. – P.14, №6. – P.1311-1322.
181. Centers for Disease Control and Prevention: official website. Preliminary assessment of the effectiveness of the 2003-04 inactivated influenza vaccine--Colorado, December 2003 [Electronic resource]. — URL: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5301a3.htm> (дата обращения: 27.01.2024) – Текст: электронный.
182. Hadler, J. L. Public health strategies for distribution of influenza vaccine during an influenza pandemic / J. L. Hadler // *Yale J Biol Med.* – 2005. – Vol.78, №5. – P.277-86.
183. A pandemic influenza vaccine in India: from strain to sale within 12 months / R. Dhere, L. Yeolekar, P. Kulkarni [et al.] // *Vaccine.* – 2011. – Vol.29, №1. – P.A16-21.
184. He, D.H. Pre-pandemic live-attenuated influenza vaccine / D. H. He, A. P. Y. Chiu, J. T. K. Wu, B. J. Cowling // *Hong Kong Med J.* – 2019. – Vol.25, №9. – P.24-27.
185. Everts, M. Accelerating Drug Development: Antiviral Therapies for Emerging Viruses as a Model / M. Everts, T. Cihlar, J. R. Bostwick, R. J. Whitley // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* – 2017. – Vol.57, №1. – P.155-169.

186. Sertkaya, A. Key cost drivers of pharmaceutical clinical trials in the United States / A. Sertkaya, H. H. Wong, A. Jessup, T. Beleche // *Clinical Trials*. – 2016. – Vol.13, №2. – P.117-126.
187. DiMasi, J. A. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs / J. A. DiMasi, H. G. Grabowski, R. W. Hansen // *Journal of Health Economics*. – 2016. – Vol.47. – P.20-33.
188. Экстренная профилактика гриппа ремантадином / А. С. Шадрин, А. М. Малышева, В. П. Луговская [и др.] // *Ж Микробиол Эпидемиол Иммунобиол*. – 1982. – Т.9 С.78-81.
189. Защитное действие ремантадина во время вспышки гриппа, вызванного вирусом А (H1N1) в декабре 1977 г. / Н.П. Обросова-Серова, А.Н. Слепушкин, Л.М. Купряшина [и др.] // *Вопр Вирусол*. – 1979. – Т.4. – С.353-7.
190. Rimantadine prophylaxis in children: a follow-up study / S. A. Crawford, R. D. Clover, T. D. Abell [et al.] // *Pediatr Infect Dis J*. – 1988. – Vol.7, №6. – P.379-83.
191. Drug resistance in influenza A virus: the epidemiology and management / M. Hussain, H. D. Galvin, T.Y. Haw [et al.] // *Infect Drug Resist*. – 2017. – Vol.10. – P.121-134.
192. Effectiveness of rimantadine prophylaxis of children within families / R. D. Clover, S. A. Crawford, T. D. Abell [et al.] // *Am J Dis Child*. – 1986. – Vol.140, №7. – P.706-9.
193. A controlled trial of amantadine and rimantadine in the prophylaxis of influenza A infection / R. Dolin, R. C. Reichman, H. P. Madore [et al.] // *N Engl J Med*. – 1982. – Vol.307, №10. – P.580-4.
194. Efficacy and safety of low dosage amantadine hydrochloride as prophylaxis for influenza A / P. D. Reuman, D. I. Bernstein, M. C. Keefer [et al.] // *Antiviral Res*. – 1989. – Vol.11, №1. – P.27-40.
195. Hay, A. J. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine / A. J. Hay, A. J. Wolstenholme, J. J. Skehel, M. H. Smith // *EMBO J*. – 1985. – Vol.4, №11. – P.3021-4.

196. Occurrence of amantadine- and rimantadine-resistant influenza A virus strains during the 1980 epidemic / H. Heider, B. Adamczyk, H. W. Presber [et al.] // *Acta Virol.* – 1981. – Vol.25, №6. – P.395–400.

197. Emergence of amantadine-resistant influenza A viruses: epidemiological study / H. Suzuki, R. Saito, H. Masuda [et al.] // *J Infect Chemother.* – 2003. – V.9, №3. – P.195-200.

198. Emergence and possible transmission of amantadine-resistant viruses during nursing home outbreaks of influenza A (H3N2) / E. E. Mast, M. W. Harmon, S. Gravenstein [et al.] // *Am J Epidemiol.* – 1991. – Vol.134, №9. – P.988-97.

199. Hurt, A. C. The epidemiology and spread of drug resistant human influenza viruses / A. C. Hurt // *Curr Opin Virol.* – 2014 – Vol.8. – P.22-9.

200. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States / R. A. Bright, D. K. Shay, B. Shu [et al.] // *JAMA.* – 2006. – Vol.295, №8. – P.891-4.

201. Ma, C. Pharmacological Characterization of the Spectrum of Antiviral Activity and Genetic Barrier to Drug Resistance of M2-S31N Channel Blockers / C. Ma, J. Zhang, J. Wang // *Mol Pharmacol.* – 2016. – Vol.90, №3. – P.188-98.

202. Musharrafieh, R. Discovery of M2 channel blockers targeting the drug-resistant double mutants M2-S31N/L26I and M2-S31N/V27A from the influenza A viruses / R. Musharrafieh, C. Ma, J. Wang // *Eur J Pharm Sci.* – 2020 – Vol.141. – P.105124.

203. New adamantane derivatives can overcome resistance of influenza A(H1N1)pdm2009 and A(H3N2) viruses to rimantadine / V. A. Shibnev, T. M. Garaev, M. P. Finogenova [et al.] // *Bull Exp Biol Med.* – 2012 – Vol.153, №2. – P.233-5.

204. Производные адамантана, способные ингибировать репродукцию резистентного к римантадину штамма вируса гриппа A(H1N1)pdm09 (*Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae*) / Т. М. Гараев, А. И. Одноров, Е. С. Кириллова [и др.] // *Вопросы вирусологии.* – 2020. – Т.65, №1. – С. 16-20.

205. Functional studies and modeling of pore-lining residue mutants of the influenza A virus M2 ion channel / V. Balannik, V. Carnevale, G. Fiorin [et al.] // *Biochemistry*. – 2010. – Vol.49, №4. – P.696-708.

206. The interplay of functional tuning, drug resistance, and thermodynamic stability in the evolution of the M2 proton channel from the influenza A virus / A. L. Stouffer, C. Ma, L. Cristian [et al.] // *Structure*. – 2008. – Vol.16, №7. – P.1067-76.

207. A bacteria-based search for drugs against avian and swine flu yields a potent and resistance-resilient channel blocker / H. Lahiri, E. Israeli, M. Krugliak [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2025. – V.122, 31. – P.e2502240122.

208. Жданов, К.В. Грипп и острые респираторные заболевания: диагностика и выбор этиотропной терапии / К. В. Жданов, С. М. Захаренко, Н. И. Львов, О. В. Мальцев // *Военно-медицинский журн.* – 2016. – Т.337, № 2. – С.3.

209. Clinical effectiveness of oseltamivir and zanamivir for treatment of influenza A virus subtype H1N1 with the H274Y mutation: a Japanese, multicenter study of the 2007-2008 and 2008-2009 influenza seasons / N. Kawai, H. Ikematsu, N. Hirotsu [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* – 2009. – Vol.49, № 12. – P.1828–1835.

210. Изучение эффективности препаратов (умифеновира, триазаверина) в отношении острых респираторных вирусных инфекций / Е. П. Тихонова, Т. Ю. Кузьмина, Н. В. Андропова [и др.] // *Казанский мед.ж.* – 2018. – Т.99, №2. – С.215-223.

211. Шамшева, О. В. Спектр применения отечественного противовирусного препарата в педиатрии / О. В. Шамшева, О. В. Молочкова // *Детские инфекции.* – 2015. – №4. – С.26-30.

212. Ленева, И. А. Чувствительность различных штаммов вируса гриппа к арбидолу. Изучение эффекта арбидола на репродукцию вируса гриппа А в комбинации с различными противовирусными препаратами / И. А. Ленева, И. Т. Федякина, Т. А. Гуськова, Р. Г. Глушков // *Терапевтический архив.* – 2005. – № 8. – С.84–88.

213. Изучение чувствительности вирусов гриппа А(H1N1), вызвавших заболевания в апреле-мае 2009 года, к противовирусным препаратам в культуре клеток MDCK / А. А. Романовская, А. М. Дурыманов, К. А. Шаршов, [и др.] // Антибиотики и Химиотерапия. – 2009. – Т.54, №5-6. – С.41-47.

214. Применение различных схем противовирусной терапии ОРВИ у детей / А. Л. Заплатников, Е. Г. Кондюрина, Т. Н. Елкина [и др.] // Детские инфекции. – 2015. – №3. – С.34-42.

215. Hong-bo, L. I. U. Multicenter randomized double blind parallel clinical trial of arbidol hydrochloride tablet / L. I. U. Hong-bo, Q.U. Wen-xiu, L. I. Sheng-qi // The Chinese Journal of Clinical Pharmacology. – 2006. – Vol.6. – P.403-405.

216. Слепушкин Чувствительность к римантадину и Арбидолу вирусов гриппа, вызвавших эпидемические подъемы заболеваемости в России в сезоне 2004–2005 г. / Е. И. Бурцева, Шевченко Е. С., Ленева И. А. [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2007. – Т.52, № 2. – С.24-29.

217. Грипп у взрослых [Электронный ресурс]. — URL: [https://cr.minzdrav.gov.ru/preview-cr/749\\_1](https://cr.minzdrav.gov.ru/preview-cr/749_1) (дата обращения: 27.02.2024) – Текст: электронный.

218. Ленева, И. А. Арбидол-эффективный препарат для лечения и профилактики гриппа и ОРВИ: обзор результатов клинических исследований / И. А. Ленева, Т. А. Гуськова // РМЖ. – 2008. – Т.16, №29. – С.3-7

219. Чешик, С.Г. Эффективность терапии Арбидолом при ОРВИ у детей раннего возраста / С. Г. Чешик, Р. В. Вартанян // Новые лекарственные препараты. – 2005. – Т.11.– С.37-44.

220. Применение Арбидола и амиксина в качестве этиотропной терапии гриппа и ОРВИ у детей / В. Ф. Учайкин, С. Г. Харламова, С. Г. Чешик [и др.] // Педиатрия. – 2004. – Т.5. – С.73-77.

221. Эффективность Арбидола при профилактике и лечении острых респираторных инфекций / В. И. Шумилов, Б. Л. Медников, С. А. Пиявский [и др.] // Военно-медицинский журнал. – 2002 – Т.9. – С.51-53.

222. Крамарев, С.А. Опыт применения Арбидола при лечении и профилактики гриппа и ОРВИ у детей на Украине / С. А. Крамарев, Л. А. Палатная, В. И. Литус // РМЖ. – 2003. – Т.21. – С.1050-1051.

223. Противовирусная терапия орви у детей / Ф. И. Ершов, С. С. Григорян, Т. Г. Орлова [и др.] // Детские инфекции. – 2006. – №3. – С.56-61.

224. Ленева, И. А. Вирусспецифическая терапия гриппа история и современное развитие / И. А. Ленева // МС. – 2017. – №18. – С.116-119.

225. Фармакоэпидемиологическое исследование течения гриппа и других ОРВИ в группах риска / В. А. Булгакова, А. А. Поромов, А. И. Грекова [и др.] // Терапевтический архив. – 2017. – №1. – С.61-71.

226. Отечественный противовирусный препарат широкого спектра действия - Умифеновир как средство этиотропной терапии гриппа / Л. В. Осидак, О. И. Афанасьева, Е. Г. Головачева [и др.] // Детские инфекции. – 2016. – №3. – С.25-29.

227. Противовирусная терапия ОРВИ у детей в современной клинической практике / Е. А. Дондурей, Е. В. Образцова, Ю. С. Семилетко [и др.] // МС. – 2019. – №2. – С.183-187.

228. Попов, А. Ф. Сравнительная эффективность применения препаратов Риамиловир и Умифеновир в лечении гриппа / А. Ф. Попов, Е. В. Маркелова, И. А. Комарова, С. Н. Бениова // Антибиотики и химиотерапия. – 2021. – №3-4. – С.35-39.

229. Kang, Y. Arbidol: The current demand, strategies, and antiviral mechanisms / Y. Kang, Y. Shi, S. Xu // Immun Inflamm Dis. – 2023. – Vol.11, №8. – P.e984.

230. Boriskin, Y. S. Arbidol: a broad-spectrum antiviral compound that blocks viral fusion / Y. S. Boriskin, I. A. Leneva, E. I. Pécheur, S. J. Polyak // Curr Med Chem. – 2008. – Vol.15, №10. – P.997-1005.

231. Structure-based optimization and synthesis of antiviral drug Arbidol analogues with significantly improved affinity to influenza hemagglutinin / Z. V. F. Wright, N. C. Wu, R. U. Kadam [et al.] // Bioorg Med Chem Lett. – 2017. – Vol.27, №16. – P.3744-3748.

232. Design of inhibitors of influenza virus membrane fusion: synthesis, structure-activity relationship and in vitro antiviral activity of a novel indole series / V. Brancato, A. Peduto, S. Wharton [et al.] // *Antiviral Res.* – 2013. – Vol.99, №2. – P.125-35.

233. 3-Indoleacetonitrile Is Highly Effective in Treating Influenza A Virus Infection In Vitro and In Vivo / X. Zhao, L. Zhao, Y. Zhao [et al.] // *Viruses.* – 2021. – Vol.13, №8. – P.1433.

234. Synthesis and biological activity of water-soluble polymer complexes of arbidol / M. Y. Erokin, M. V. Solovskii, M. Y. Smirnova [et al.] // *Pharm Chem J.* – 2009. – Vol.43, №10. – P.563-567.

235. Изучение противовирусной активности отечественных противогриппозных химиопрепаратов в культуре клеток и на модели животных / И. А. Ленева, И. Т. Федякина, М. Ю. Ерокин [и др.] // *Вопр. вирусологии.* – 2010. – Т.55, № 3. – С.19-27.

236. Antiviral activity of arbidol against influenza A virus, respiratory syncytial virus, rhinovirus, coxsackie virus and adenovirus in vitro and in vivo / L. Shi, H. Xiong, J. He [et al.] // *Arch Virol.* – 2007. – Vol.152, №8. P.1447-55.

237. Чувствительность вирусов гриппа А/Н5, изолированных от диких птиц на территории России, к арбидолу в культуре клеток MDCK / И. Т. Федякина, И. А. Ленева, С. С. Ямникова [и др.] // *Вопросы вирусологии.* – 2005. – № 6. – С. 22-25.

238. Изучение чувствительности пандемических вирусов гриппа А 2009 Н1N1 и высоковирулентных вирусов гриппа птиц А (Н5N1) к противогриппозным химиопрепаратам / И. Т. Федякина, М.Ю. Щелканов, П. Г. Дерябин [и др.] // *Антибиотики и Химиотерапия.* – 2011 – Vol.56, №3-4. – P.3-9.

239. Inhibitors of influenza virus polymerase acidic (PA) endonuclease: contemporary developments and perspectives / H. Ju, J. Zhang, B. Huang [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2017. – Vol.60. – P.3533-3551.

240. Inhibition of cap (M7gpppxm)-dependent endonuclease of influenza virus by 4-substituted 2,4-dioxobutanoic acid compounds / J. Tomassini, H. Selnick, M. E. Davies [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1994. – Vol.38. – P.2827-2837.

241. Hastings, J. C. Antiinfluenza virus activities of 4-substituted 2,4-dioxobutanoic acid inhibitors / J. C. Hastings, H. Selnick, B. Wolanski, J. E. Tomassini // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1996. – Vol.40. – P.1304-1307.

242. Ju, H. Designing influenza polymerase acidic endonuclease inhibitors via 'privileged scaffold' re-evolution/refining strategy / H. Ju, P. Zhan, X. Liu // *Future Med. Chem.* – 2019. – Vol.11. – P.265-268.

243. Heo Y. A. Baloxavir: first global approval / Y. A. Heo // *Drugs.* – 2018. – Vol.78. – P.693-697.

244. Combining baloxavir marboxil with standard-of-care neuraminidase inhibitor in patients hospitalised with severe influenza (FLAGSTONE): a randomised, parallel-group, double-blind, placebo-controlled, superiority trial / D. Kumar, M. G. Ison, J. P. Mira [et al.] // *Lancet Infect Dis.* – 2022. – Vol.22, №5. – P.718-730.

245. Gubareva, L. V. Baloxavir and Treatment-Emergent Resistance: Public Health Insights and Next Steps / L. V. Gubareva, A. M. Fry // *J Infect Dis.* – 2020. – Vol.221, №3. – P.337-339.

246. Baloxavir Marboxil in Japanese Pediatric Patients With Influenza: Safety and Clinical and Virologic Outcomes / N. Hirotsu, H. Sakaguchi, C. Sato [et al.] // *Clin Infect Dis.* – 2020. – Vol.71, №4. – P.971-981.

247. Treatment-Emergent Influenza Variant Viruses With Reduced Baloxavir Susceptibility: Impact on Clinical and Virologic Outcomes in Uncomplicated Influenza / T. Uehara, F. G. Hayden, K. Kawaguchi [et al.] // *J Infect Dis.* – 2020. – Vol.221, №3. – P.346-355.

248. Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Detection of influenza A(H3N2) viruses exhibiting reduced susceptibility to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir in Japan, December 2018 / E. Takashita, C. Kawakami, H. Morita [et al.] // *Euro Surveill.* – 2019. – Vol.24, №3. – P.1800698.

249. Synthesis, inhibitory activity and oral dosing formulation of AV5124, the structural analogue of influenza virus endonuclease inhibitor baloxavir / A. A. Ivashchenko, O. D. Mitkin, J. C. Jones [et al.] // J Antimicrob Chemother. – 2021. – Vol.76, №4. – P.1010-1018.