

УДК 577.113.3

Оценка противовирусного потенциала модифицированных гетероциклических оснований и 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов в отношении SARS-CoV-2

Е. С. Матюгина¹, М. С. Новиков², Л. И. Козловская^{3,4}, В. П. Волок³, Е. Ю. Шустова³,
А. А. Ишмухаметов^{3,4}, С. Н. Кочетков¹, А. Л. Хандажинская^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

²Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, 400131 Россия

³Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, 108819 Россия

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

*E-mail: khandzhinskaya@bk.ru

Поступила в редакцию 25.10.2021

Принята к печати 10.12.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11479

РЕФЕРАТ Пандемия, вызванная новым бетакоронавирусом SARS-CoV-2, унесла уже почти 5 млн жизней. Несмотря на разработку и широкое применение вакцин против COVID-19, это заболевание остается главной проблемой мирового здравоохранения. В рамках перепрофилирования существующих лекарственных средств ведутся интенсивные исследования препаратов, созданных для терапии других вирусных, бактериальных и паразитарных инфекций, аутоиммунных, онкологических и других заболеваний с целью создания эффективного терапевтического средства. В данной работе в результате фенотипического скрининга библиотек модифицированных гетероциклических оснований и 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов, синтезированных нами ранее, выявлены два соединения-лидера, способные ингибировать размножение вируса SARS-CoV-2 со значениями EC_{50} в диапазоне 20–70 мкМ. Структуры этих соединений могут быть использованы для дальнейшей оптимизации с целью создания противовирусного препарата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА SARS-CoV-2, противовирусные препараты, нуклеозиды, аналоги нуклеозидов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ EC_{50} – 50% эффективная концентрация, т.е. концентрация соединения, подавляющая репродукцию вируса в 50% тест-объектов; ННС – N-гидроксицитидин; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ДМСО – диметилсульфоксид; TCD_{50} – 50% тканевая цитотоксическая доза, т.е. доза вируса, вызывающая появление признаков цитопатического действия в 50% тест-объектов.

ВВЕДЕНИЕ

Coronaviridae – семейство вирусов, включающее два подсемейства: Orthocoronavirinae и Letovirinae. Опасные для здоровья человека патогены относятся к подсемейству Orthocoronavirinae. В 60-х годах XX века впервые были идентифицированы коронавирусы человека (HCoV) – HCoV-OC43 (OC43) и HCoV-229E (229E) [1]. Позднее обнаружили и другие коронавирусы человека: HCoV-NL63 (NL63) в 2004 году и HCoV-NKU1 (NKU1) в 2005 году [1]. Эти четыре вируса обычно вызывают острые заболевания верхних, реже нижних дыхательных путей, но тяжелые слу-

чай коронавирусной инфекции регистрировали редко и связывали, как правило, с сопутствующей патологией и/или иммунологическим старением. Два более опасных коронавируса человека – SARS-CoV (2003 г.) и MERS-CoV (2012 г.) вызывают атипичные поражения верхних и нижних дыхательных путей, которые особенно тяжело протекают у людей старше 65 лет и пациентов с сопутствующими заболеваниями [1].

Седьмым в группе коронавирусов человека стал SARS-CoV-2, идентифицированный в декабре 2019 года в городе Ухань (Китай). Инфекция, вызываемая этим вирусом, получила название COVID-19 и бы-

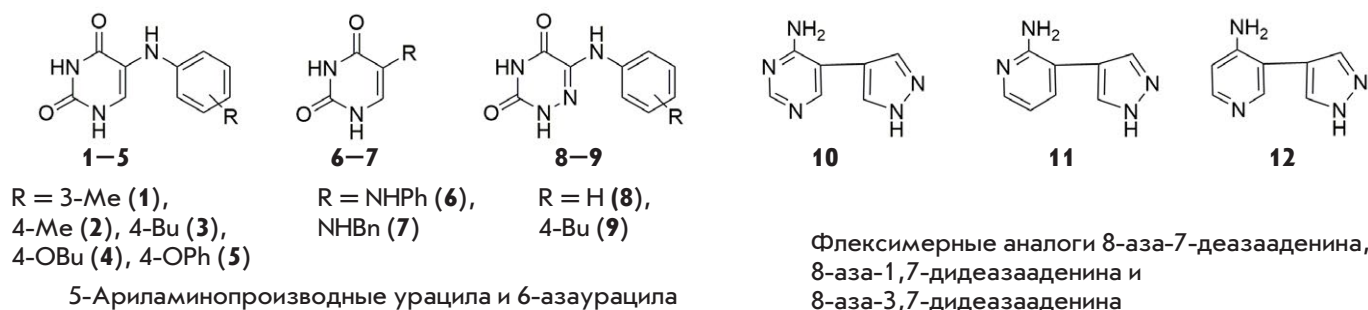


Рис. 1. Аналоги гетероциклических оснований

стро распространилась по всему миру. Всемирная организация здравоохранения объявила 11 марта 2020 года о пандемии COVID-19 [2]. Объединенные усилия ученых всего мира, позволившие быстро выявить этиологический агент, получить информацию о структуре и жизненном цикле вируса, а также опыт разработки вакцин против «атипичной пневмонии», вызванной SARS-CoV, привели к появлению вакцин, некоторые из которых успешно прошли доклинические и клинические испытания и используются для массовой вакцинации [2].

Тем не менее, на 27 октября 2021 диагноз COVID-19 подтвержден более чем у 274 млн пациентов в мире, из которых 4.96 млн умерли [2]. К настоящему моменту не существует общепринятых эффективных методов терапии COVID-19, в связи с чем создание специфических препаратов для лечения этого заболевания остается весьма актуальной задачей. Разрабатывают препараты на основе антител, ингибиторов вирусных ферментов (РНК-зависимой РНК-полимеразы, протеаз и др.), ингибиторов проникновения вируса в клетку и др. [3]. В рамках перепрофилирования существующих лекарственных средств во всем мире ведутся интенсивные исследования препаратов, созданных для терапии других вирусных (грипп, ВИЧ-инфекция, гепатит С, лихорадка Эбола и др.), бактериальных и паразитарных инфекций, аутоиммунных, онкологических и других заболеваний [3].

В контексте данной стратегии мы провели скрининг библиотеки аналогов гетероциклических оснований и нуклеозидов, полученных нами ранее и показавших противовирусную [4–8], антибактериальную [7, 9–11], противопаразитарную [12, 13] или антипролиферативную активность [14, 15].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Стоковые растворы тестируемых соединений в концентрации 5 мкМ готовили в 100% ДМСО. Для оценки противовирусной активности использовали штамм ПИК35 вируса SARS-CoV-2 (GISAID ID EPI_ISL_428851) [16]. Вирус прошел пять пассажей

в клетках Vero и хранился в виде суспензии инфицированных клеток при температуре -70°C. Линия клеток почки зеленой мартышки Vero получена из Biologicals, ВОЗ, Швейцария (RCB 10-87). Клетки вели на культуральной среде ДМЕМ («ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия) с фетальной сывороткой крупного рогатого скота (Gibco, США, 5%), стрептомицином (0.1 мг/мл) и пенициллином (100 ед./мл) («ПанЭко», Россия).

Методика фенотипического скрининга апробирована ранее [16]. Готовили восемь двукратных разведений стоковых растворов соединений в среде ДМЕМ. Далее разведения соединений смешивали с равными объемами вирусной суспензии, содержащей 50–200 ТЦД₅₀ на лунку, инкубировали в течение 1 ч при 37°C, далее смеси вирус-соединение добавляли к конфлюэнтным монослоям клеток Vero в двух повторностях. После 5-дневной инкубации при 37°C цитопатический эффект (ЦПЭ) оценивали микроскопически. Значения ЕС₅₀ рассчитывали по методу Кербера как описано ранее [16]. Эксперимент повторяли не менее 2 раз для каждого соединения. В качестве положительного контроля использовали N-гидроксицитидин (ННС), в качестве отрицательного – ДМСО.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен фенотипический скрининг библиотеки аналогов гетероциклических оснований (рис. 1) и нуклеозидов (рис. 2), синтезированных нами ранее, на активность против SARS-CoV-2. Первая группа аналогов гетероциклических оснований представляет собой 5-ариламинопроизводные урацила и 6-азаурацила (рис. 1), проявившие себя как ненуклеозидные ингибиторы ВИЧ и ингибиторы роста *Mycobacterium tuberculosis* [7, 11]. Вторая группа представляет собой новые флексимерные аналоги аза/дезазапуриновых оснований (рис. 1) [17]. Известно, что аза/дезазапурины, как и соответствующие нуклеозиды, проявляют широкий спектр противопаразитарных, противоопухолевых и противовирусных свойств [18]. С другой стороны, флексимерные основания обладают высокой

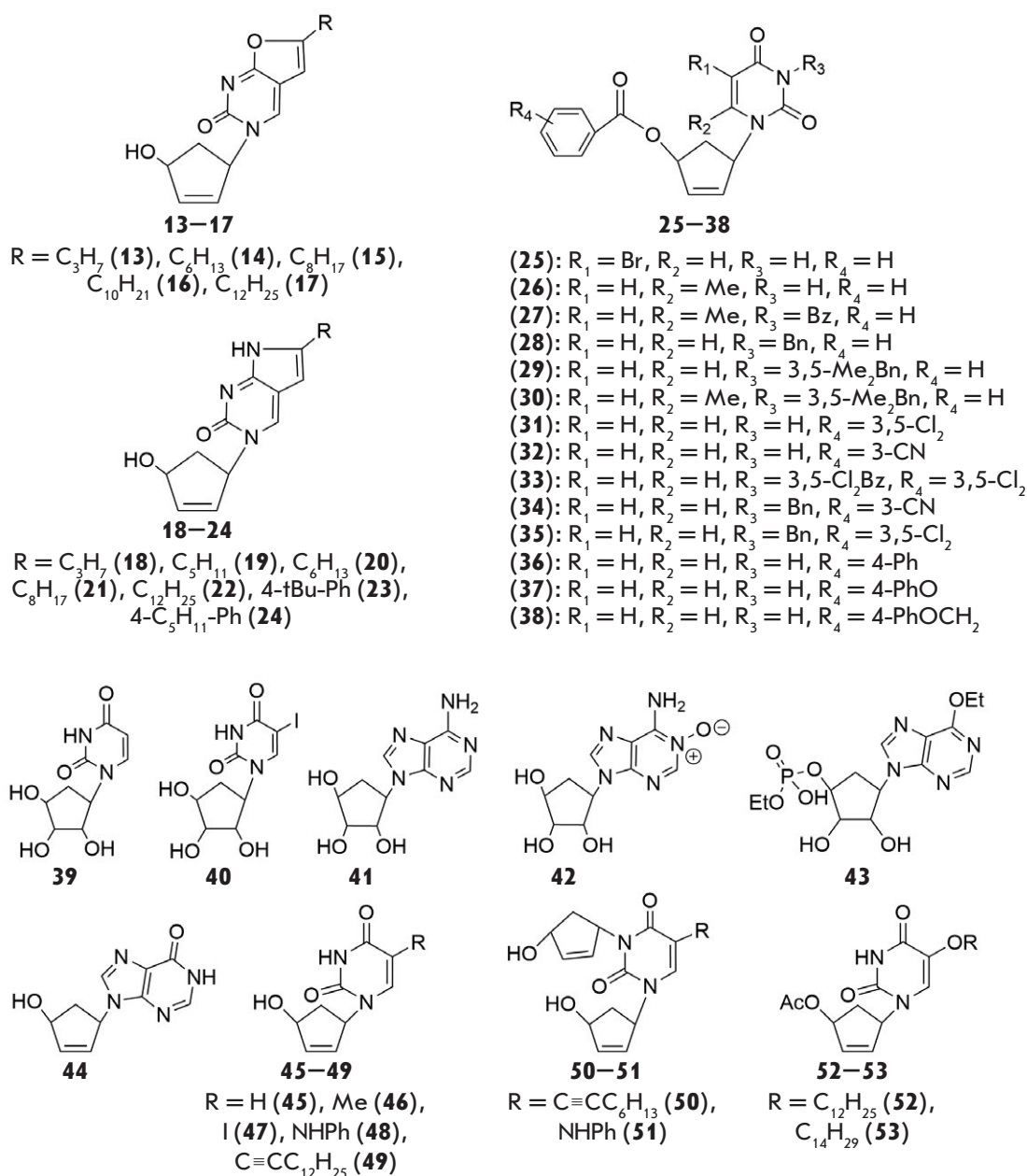


Рис. 2. 5'-Норкарбоциклические аналоги нуклеозидов

подвижностью (гибкостью) структуры, которая создается за счет размыкания пуринового кольца на отдельные гетероциклические фрагменты. Свободное вращение вокруг С–С-связи позволяет подобным соединениям наилучшим образом подстраиваться к пространственной структуре активного центра фермента-мишени, что в ряде случаев позволяет обходить возникающие в последнем точечные мутации, тем самым обеспечивая механизм преодоления лекарственной устойчивости [17].

Другая группа соединений включает 5'-норкарбоциклические аналоги пуриновых и пиримидиновых

нуклеозидов (рис. 2). Структурная особенность этих аналогов нуклеозидов – отсутствие 5'-метилового группы и, как следствие, невозможность превращаться в фосфорилированные формы под действием клеточных ферментов и проявлять биологическую активность по традиционным для обычных модифицированных нуклеозидов механизмам. Однако представители соединений данного класса способны выступать в качестве ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ) ВИЧ, а кроме того, обладают антибактериальной и противоопухолевой активностью [4–7, 9–11, 15].

Противовирусную активность определяли по способности исследуемых соединений ингибировать гибель клеток Vero, индуцированную заражением штаммом ПИК35 вируса SARS-CoV-2. В качестве положительного контроля использовали N-гидроксицитидин (NHC), известный ингибитор репродукции SARS-CoV-2, активность которого в данной серии экспериментов соответствовала ранее полученным данным [16]. Всего протестировано 53 соединения, большинство из которых не проявили активности в концентрации до 100 мкМ. Только два соединения, 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1-ил)-6-(4-третбутилфенил)-3H-пирроло[2,3-d]-пиримидин-2-он **23** и 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1-ил)-6-(4-пентилфенил)-3H-пирроло[2,3-d]-пиримидин-2-он **24**, показали дозозависимую способность ингибировать размножение SARS-CoV-2 со значениями $EC_{50} = 53$ и 21 мкМ соответственно (таблица). При этом наблюдалась довольно выраженная цитотоксичность, что соответствует ранее полученным данным [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе методами фенотипического скрининга выявлены два аналога нуклеозидов, 5'-нор-

Константы противовирусной активности и цитотоксичности активных соединений

Соединение	EC_{50} , мкМ (M ± SEM)	CC_{50} , мкМ (M ± SEM)	Индекс селективности (SI)
23	53 ± 18	75 ± 25	1.42
24	21 ± 6	53 ± 18	2.52
NHC	5.3 ± 0.9	>100	> 19

карбоциклические производные бициклических фурано[2,3-d]пиримидинов **23** и **24**, способных ингибировать репродукцию вируса SARS-CoV-2 *in vitro*. Структуры этих соединений могут быть использованы для дальнейшей оптимизации с целью создания противовирусного препарата. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60414. Синтез флексимерных аналогов гетероциклических оснований был осуществлен при поддержке РФФИ № 19-74-10048.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shi Z., Brugere-Picoux J. // Bull. Acad. Natl. Med. 2021. V. 205. P. 732–736.
- <https://covid19.who.int/>.
- https://covid-nma.com/living_data/index.php.
- Matyugina E.S., Valuev-Elliston V.T., Babkov D.A., Novikov M.S., Ivanov A.V., Kochetkov S.N., Balzarini J., Seley-Radtke K.L., Khandazhinskaya A.L. // Medchemcomm. 2013. V. 4. P. 741–748.
- Matyugina E.S., Valuev-Elliston V.T., Geisman A.N., Novikov M.S., Chizhov A.O., Kochetkov S.N., Seley-Radtke K.L., Khandazhinskaya A.L. // Medchemcomm. 2013. V. 4. P. 1443–1451.
- Matyugina E., Valyev-Elliston V.T., Novikov M.S., Alexandrova L.A., Chernoysova L.N., Kochetkov S.N., Khandazhinskaya A.L. // FEBS J. 2013. V. 280. P. 358–359.
- Matyugina E.S., Novikov M.S., Babkov D.A., Valuev-Elliston V.T., Vanpouille C., Zicari S., Corona A., Tramontano E., Margolis L.B., Khandazhinskaya A.L., Kochetkov S.N. // Acta Naturae. 2015. V. 7. P. 113–115.
- Matyugina E.S., Seley-Radtke K.L., Andronova V.L., Galegov G.A., Kochetkov S.N., Khandazhinskaya A.L. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2010. V. 36. P. 730–733.
- Matyugina E., Khandazhinskaya A., Chernousova L., Andreevskaya S., Smirnova T., Chizhov A., Karpenko I., Kochetkov S., Alexandrova L. // Bioorgan. Med. Chem. 2012. V. 20. P. 6680–6686.
- Matyugina E.S., Andreevskaya S.N., Smirnova T.G., Khandazhinskaya A.L. // Acta Naturae. 2012. V. 4. P. 73–77.
- Matyugina E., Novikov M., Babkov D., Ozerov A., Chernousova L., Andreevskaya S., Smirnova T., Karpenko I., Chizhov A., Murthu P., et al. // Chem. Biol. Drug Des. 2015. V. 86. P. 1387–1396.
- Alzahrani K.J., Matyugina E.S., Khandazhinskaya A.L., Kochetkov S.N., Seley-Radtke K.L., de Koning H.P. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017. V. 27. P. 3081–3086.
- Khandazhinskaya A.L., Matyugina E.S., Solyev P.N., Wilkinson M., Buckheit K.W., Buckheit R.W., Chernousova L.N., Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Alzahrani K.J., Natto M.J., Kochetkov S.N., de Koning H.P., Seley-Radtke K.L. // Molecules. 2019. V. 24. P. 19E3433.
- Klimenko A.A., Matyugina E.S., Logashenko E.B., Solyev P.N., Zenkova M.A., Kochetkov S.N., Khandazhinskaya A.L. // Molecules. 2018. V. 23. P. 2654.
- Matyugina E.S., Logashenko E.B., Zenkova M.A., Kochetkov S.N., Khandazhinskaya A.L. // Heterocycl. Commun. 2015. V. 21. P. 259–262.
- Kozlovskaya L.I., Volok V.P., Shtro A.A., Nikolaeva Y.V., Chistov A.A., Matyugina E.S., Belyaev E.S., Jegorov A.V., Snoeck R., Korshun V.A., et al. // Eur. J. Med. Chem. 2021. V. 220. P. 113467.
- Khandazhinskaya A., Eletskaia B., Fateev I., Kharitonova M., Konstantinova I., Barai V., Azhaye A., Hyvonen M., Keinanen T., Kochetkov S., et al. // Organic. Biomol. Chem. 2021. V. 19. P. 7379–7389.
- Matyugina E.S., Kochetkov S.N., Khandazhinskaya A.L. // Russ. Chem. Rev. 2021. V. 90. P. 1454–1491.