

УДК 578.2:577:576.5:622.244

Противовирусная активность *in vitro* нового производного индол-3-карбоновой кислоты в отношении SARS-CoV-2

А. Н. Наровлянский^{1*}, М. В. Филимонова², Н. Г. Цышкова², А. В. Пронин¹, Т. В. Гребенникова¹, Э. В. Карамов¹, В. Ф. Ларичев¹, Г. В. Корнилаева¹, И. Т. Федякина¹, И. В. Должикова¹, М. В. Мезенцева¹, Е. И. Исаева¹, В. В. Полосков¹, Л. С. Коваль², В. П. Маринченко², В. И. Суринова², А. С. Филимонов², А. А. Шитова², О. В. Солдатова², А. В. Санин¹, И. К. Зубашев¹, А. В. Пономарев¹, В. В. Веселовский³, В. В. Козлов^{1,4}, А. В. Степанов³, А. В. Хомич⁴, В. С. Козлов¹, С. А. Иванов², П. В. Шегай², А. Д. Каприн², Ф. И. Ершов¹, А. Л. Гинцбург¹

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России), Москва, 123098 Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России), Обнинск, 249036 Россия

³Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, 119991 Россия

⁴ООО «Гамасинтез», Москва, 123098 Россия

*E-mail: narovl@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.10.2023

Принята к печати 26.10.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.26623

РЕФЕРАТ Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19 позволила по-новому оценить угрозу, исходящую от коронавирусов, и перейти к фундаментальному анализу этого семейства и поиску эффективных противоковидных препаратов. Идут работы по актуализации вакцин против COVID-19 и продолжается поиск низкомолекулярных противоковидных препаратов-кандидатов на лекарство для амбулаторного назначения. Обсуждаются возможности и способы ускорения разработки противовирусных препаратов против других патогенов в рамках подготовки к следующей пандемии. В 2012–2015 гг. Н.Г. Цышкова и соавт. синтезировали группу близких по химической структуре к арбидолу водорастворимых низкомолекулярных соединений, обладающих противовирусной активностью. Среди них ряд соединений на основе аминокислотных эфиров 5-метоксииндол-3-карбоновой кислоты. Из этой довольно обширной группы соединений достоверным противовирусным эффектом в отношении SARS-CoV-2 в исследованиях *in vitro* обладал только один – дигидрохлорид 6-бром-1-метил-5-метокси-2-(1-пиперидинометил)-3-(2-диэтиламиноэтокси)карбониллиндола. В концентрации 52.0 мкМ данное соединение полностью ингибирует репродукцию вируса SARS-CoV-2 с инфекционной активностью 10^6 ТЦИД₅₀/мл. Концентрационные зависимости свидетельствуют о специфичности действия исследуемого соединения. Выявлена интерферон-индуцирующая активность; обнаружено подавление синцитиеобразования, индуцированного шиповидным белком (S-гликопротеином) SARS-CoV-2, на 89%. Указанное соединение с учетом его синтетической доступности, высокой активности ($IC_{50} = 1.06$ мкг/мл) и высокого индекса селективности ($SI = 78.6$) отвечает требованиям, необходимым для разработки противовирусного средства для профилактики и лечения COVID-19.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА SARS-CoV-2, производное индол-3-карбоновой кислоты, противовирусная активность, культура клеток.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; ВЭМК – вирус энцефаломиокардита; ИФН – интерферон; ИК – инфракрасный спектр; МС – масс-спектр; ТЦИД₅₀ – 50% тканевая цитопатогенная инфекционная доза; ЦПД – цитопатогенное действие; $T_{пл}$ – температура плавления;

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка; ЯМР ^1H – ядерный магнитный резонанс на ядрах ^1H ; CC_{50} – 50% цитотоксическая концентрация соединения; COVID-19 – COroNaVirus Disease 2019 – коронавирусная инфекция 2019 года; DMEM – питательная среда Dulbecco's Modified Eagle Medium; GFP – зеленый флуоресцентный белок, green fluorescent protein; IC_{50} – 50% ингибирующая концентрация; S-гликопротеин – шиповидный белок вируса SARS-CoV-2; SARS-CoV-2 – Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2, коронавирус 2 тяжелого острого респираторного синдрома – *Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*; SI – индекс селективности, рассчитывается как отношение CC_{50} к IC_{50} ($\text{SI} = \text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$).

ВВЕДЕНИЕ

5 мая 2023 года ВОЗ объявила «о прекращении чрезвычайной ситуации в области общественного здравоохранения в связи с распространением коронавируса» [1]. Таким образом, завершилась пандемия, которая продолжалась 3 года 1 месяц и 24 дня. По данным ВОЗ, по состоянию на 12 июля 2023 года в мире было зарегистрировано 767 972 961 подтвержденный случай COVID-19, включая 6 950 655 смертей. В России зарегистрировано 22 967 718 подтвержденных случаев COVID-19 и 399 715 смертей [2]. Однако даже по оценке ВОЗ число умерших от COVID-19 превышает 20 млн человек [3].

Несмотря на объявление о завершении пандемии и констатации снижения общего числа заражений, нельзя сказать, что эпидемия COVID-19 полностью прекратилась. Появились новые подварианты вируса (ХВВ.1.16 и ХВВ.2.3) и именно поэтому идут работы по актуализации вакцин против COVID-19 и продолжается поиск низкомолекулярных противовирусных препаратов-кандидатов на лекарство для амбулаторного назначения. Кроме того, примерно у 65 млн больных выявлены долгосрочные последствия инфекции SARS-CoV-2, обозначенные как «состояния после COVID-19», или «длительная COVID» [4].

Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19 позволила по-новому оценить угрозу, исходящую от коронавирусов, и перейти к фундаментальному анализу этого семейства и поиску эффективных противовирусных препаратов. Таким образом, по-прежнему необходимы эффективные стратегии лечения COVID-19. Во время пандемии был апробирован целый ряд противовирусных препаратов, таких, как Ремдесивир, нуклеозидные ингибиторы (АТ-527 и молнупиравир), ингибитор основной протеазы (Мрго) Нирматрелвир, комплекс Нирматрелвир-ритонавир и молнупиравир, и иммуномодуляторы – барицитиниб, тоцилизумаб и кортикостероиды и др. [5]. Однако практически не разработаны эффективные низкомолекулярные пероральные противовирусные препараты для амбулаторного лечения [6].

В 2012–2015 гг. Н.Г. Цышкова и соавт. синтезировали группу близких по химической структуре

к арбидолу водорастворимых низкомолекулярных соединений, обладающих противовирусной активностью. Среди них ряд соединений на основе аминокислотных эфиров 5-метоксииндол-3-карбоновой кислоты [7]. Из этой довольно обширной группы достоверным противовирусным эффектом в отношении SARS-CoV-2 в исследованиях *in vitro* обладало только одно соединение, которое и было исследовано в настоящей работе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследуемое соединение – дигидрохлорид 6-бром-1-метил-5-метокси-2-(1-пиперидинометил)-3-(2-диэтиламиноэтокси)карбонилиндола (**1**) (рис. 1) – получено [7] в ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

Синтез соединения **1** проводили по многостадийной схеме, представленной на рис. 2.

В работе использовали растворители и реактивы, включая этил-5-гидрокси-1,2-диметил-1*H*-индол-3-карбоксилат, фирмы Acros Organics. Температуры плавления измеряли на блоке Кофлера. ИК-спектры записывали на Фурье-спектрометре Bruker ALPHA T. Спектр ^1H -ЯМР раствора в $\text{DMSO}-d_6$ регистрировали на спектрометре Bruker AC-200 при 298 К. Масс-спектр (EI) получен на приборе SHIMADZU LCMS-8040 методом прямого ввода образца в режиме сканирования при положительной ионизации (Q3+Scan).

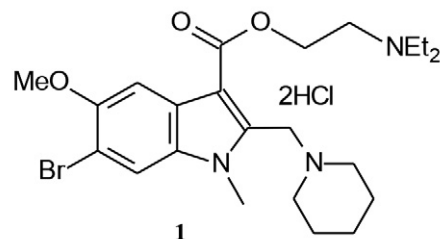


Рис. 1. Дигидрохлорид 6-бром-1-метил-5-метокси-2-(1-пиперидинометил)-3-(2-диэтиламиноэтокси)карбонилиндола (соединение **1**)

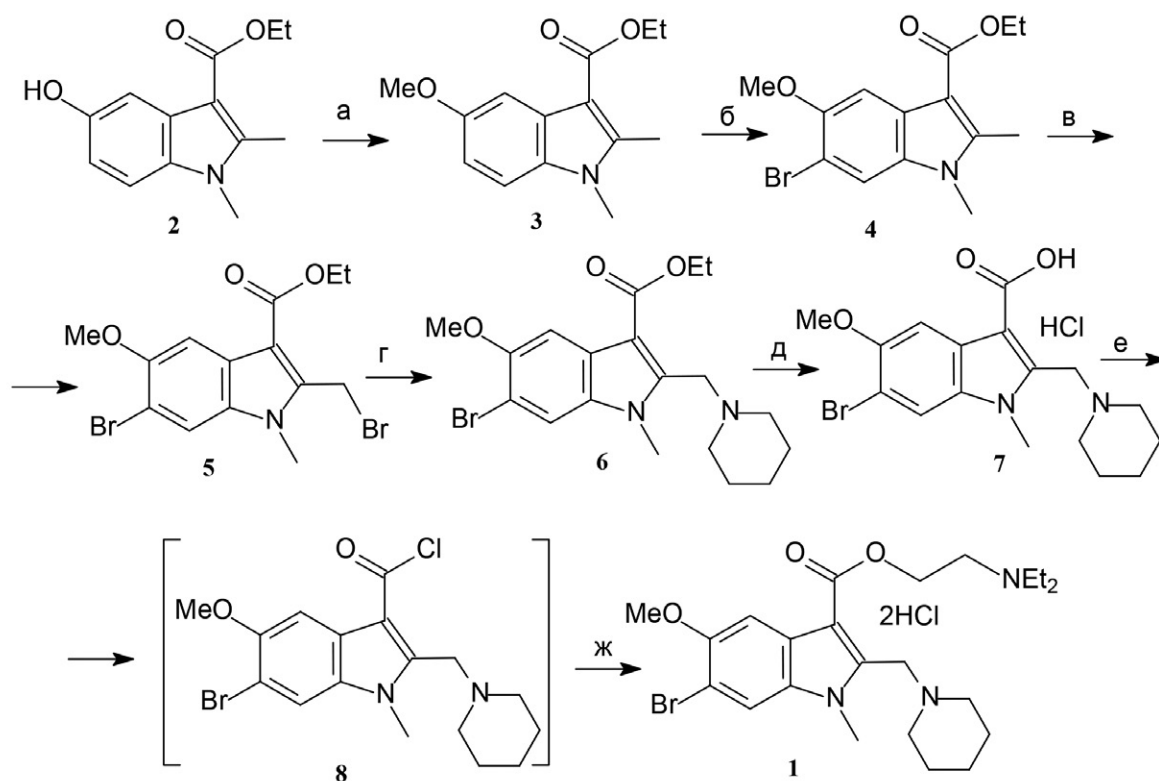


Рис. 2. Реагенты и условия: а. 1) водн. NaOH, диоксан, 2) Me_2SO_4 , 20°C; б. N-бромсукцинимид, CCl_4 , кип.; в. N-бромсукцинимид, $(\text{PhCOO})_2$, CCl_4 , облучение (лампа 100 Вт), кип.; г. пиперидин, PhH, 20°C; д. 1) водн. NaOH, EtOH, кип., 2) HCl (конц.); е. SOCl_2 , диоксан, ДМФА (кат.), 60°C; ж. 1) $\text{Et}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, Et_3N , PhH, кип., 2) HCl, Et_2O , ацетон, 20°C

1,2-Диметил-5-метокси-3-этоксикарбонилиндол (3)

К раствору 4.66 г (0.02 моль) соединения 2 в 40.0 мл диоксана при 20°C прибавили 40.0 мл 10% раствора NaOH, затем по каплям 4.0 мл диметилсульфата (0.042 моль). Реакционную смесь перемешивали 2 ч, затем разбавляли водой и охлаждали (4°C). Выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали в вакууме (2 Торр) над P_2O_5 . Получено 4.65 г (94%) соединения 3 в виде кристаллов с $T_{\text{пл}}$ 113°C (лит. $T_{\text{пл}}$ 117.5–118°C [8]).

6-Бром-1,2-диметил-5-метокси-3-этоксикарбонилиндол (4)

Смесь 4.65 г (0.0188 моль) соединения 3 и 3.36 г (0.0188 моль) N-бромсукцинимид в 75.0 мл CCl_4 нагревали при кипячении в течение 5 ч. Осадок (сукцинимид) отфильтровывали из горячей реакционной смеси. Фильтрат упарили (на 1/3) и охладили. Выпавший осадок отфильтровывали, промыли CCl_4 на фильтре и сушили в вакууме (2 Торр). Получено 3.3 г (54%) соединения 4 в виде кристаллов с $T_{\text{пл}}$ 156°C (лит. $T_{\text{пл}}$ 164–165°C [8]).

6-Бром-2-бромметил-5-метокси-1-метил-3-этоксикарбонилиндол (5)

Смесь 3.3 г (0.0101 моль) соединения 4, 1.81 г (0.0101 моль) N-бромсукцинимид и 0.1 г перекиси бензоила в 30.0 мл CCl_4 кипятили при освещении (лампа 100 Вт) в течение 5 ч. После отделения осадка сукцинимид фильтрованием из горячей смеси и охлаждения фильтрата (20°C), выпавший осадок отфильтровывали, промыли CCl_4 на фильтре и сушили в вакууме (2 Торр). Получено 3.16 г (78%) соединения 5 в виде кристаллов с $T_{\text{пл}}$ 142°C (лит. $T_{\text{пл}}$ 141–142°C [8]).

6-Бром-1-метил-5-метокси-2-(1-пиперидинометил)-3-этоксикарбонилиндол (6)

Раствор 4.0 г (0.01 моль) соединения 5 и 1.7 г (0.02 моль) пиперидина в 50.0 мл бензола выдерживали 12 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок (бромгидрат пиперидина) отфильтровывали, фильтрат сконцентрировали в вакууме до суха. Кристаллизацией остатка из этанола получено 1.7 г (82.9%) соединения 6 в виде кристаллов

с $T_{пл}$ 124–125°C (лит. $T_{пл}$ 124–125°C [8]). Найдено: % С 55.72, Н 6.20, N 7.02. $C_{19}H_{25}BrN_2O_3$. Вычислено: % С 55.75, Н 6.16, N 6.84.

Гидрохлорид 6-бром-1-метил-5-метокси-2-(1-пиперидинометил)-индол-3-карбоновой кислоты (7)

Раствор 6.0 г (0.15 моль) NaOH и 4.1 г (0.01 моль) соединения **6** в 60.0 мл этанола и 3.0 мл воды кипятили в течение 3 ч. Реакционную смесь охладили, разбавили водой (10 мл) и подкислили концентрированной соляной кислотой. Выпавший осадок отфильтровали, промыли на фильтре водой, сушили в вакууме (2 Торр) над P_2O_5 . Получено 4.10 г (98%) соединения **7** в виде кристаллов с $T_{пл}$ 236–238°C. Найдено: % С 48.68, Н 5.32, N 6.65. $C_{17}H_{22}BrClN_2O_3$. Вычислено: % С 48.88, Н 5.31, N 6.71.

Дигидрохлорид 6-бром-1-метил-5-метокси-2-(1-пиперидинометил)-3-(2-диэтиламиноэтокси)-карбонилиндола (1)

К перемешиваемому раствору 1.67 г (0.004 моль) гидрохлорида **7** в 30.0 мл диоксана прибавили 3.0 мл (0.041 моль) хлористого тионила и 2 капли диметилформамида. Реакционную смесь нагревали при 60°C в течение 3 ч, затем сконцентрировали в вакууме досуха и остаток промыли эфиром. Полученный порошкообразный хлорангидрид **8** без дополнительной очистки растворили в 25 мл бензола и обработали смесью 1.2 мл (0.008 моль) N-диэтиламиноэтанола и 1.12 мл (0.008 моль) триэтиламина. Реакционную смесь нагревали при 80°C в течение 2 ч, затем охлаждали. Выпавший осадок (гидрохлорид триэтиламина) отфильтровали и промыли горячим бензолом. Объединенный фильтрат сконцентрировали в вакууме досуха, остаток промыли гексаном и сушили в вакууме. К раствору полученного продукта в 10 мл ацетона прибавили 2 мл (~30%) эфирного раствора хлористого водорода. Реакционную смесь сконцентрировали в вакууме досуха, остаток кристаллизовали из 2-пропанола. Получено 1.9 г (85.2%) соединения **1** с $T_{пл}$ 237–240°C и следующими физико-химическими характеристиками.

ИК (KBr, ν , cm^{-1})

859, 1041, 1114, 1148, 1197, 1303, 1393, 1426, 1449, 1483, 1650, 1694 (C=O), 2354–2700, 2942, 3397, 3588 (рис. 3).

Спектр 1H -ЯМР (200 МГц, ДМСО)

δ 10.76 (уш. с, 1H), 10.23 (уш. с, 1H), 8.03 (с, 1H), 7.65 (с, 1H), 4.87 (д, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.76 (т, $J = 5.1$ Hz, 2H), 3.95 (с, 3H), 3.93 (с, 3H), 3.61 (м, 2H), 3.50–3.06 (м, 8H), 2.15–1.33 (м, 6H), 1.26 (т, $J = 7.2$ Hz, 6H) (рис. 4).

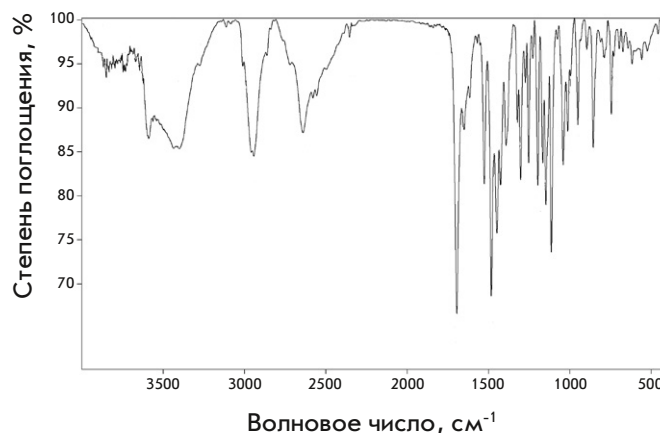


Рис. 3. ИК-спектр соединения **1**

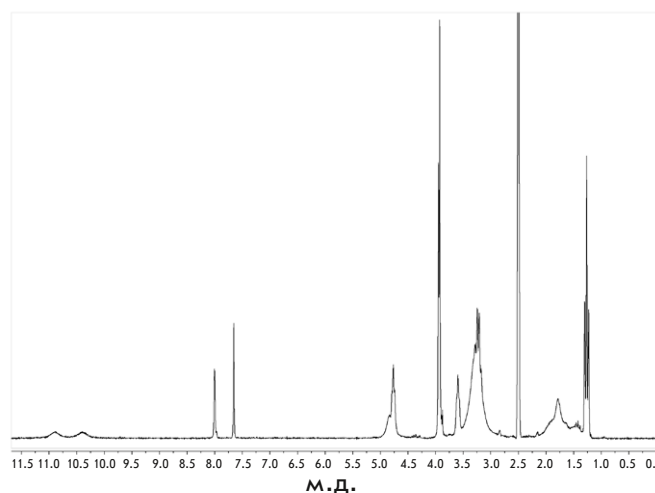


Рис. 4. 1H -ЯМР-спектр соединения **1**

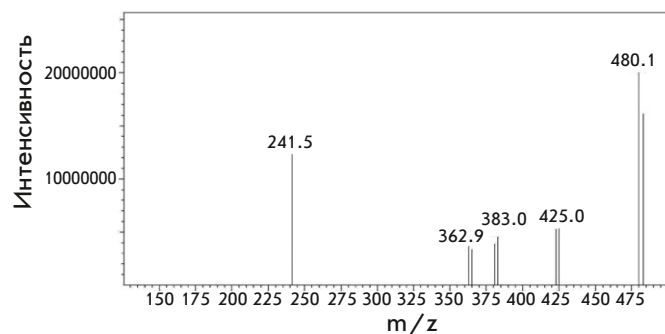


Рис. 5. Масс-спектр соединения **1**

Масс-спектр

HRMS (ESI): найдено m/z 480.1860 [M+H]; вычислено для $C_{23}H_{35}BrN_3O_3 + 480.1862$ (рис. 5).

Элементный анализ

Найдено: % С 49.89, Н 6.76, N 7.48; Вычислено: % С 49.92, Н 6.56, N 7.59; $C_{23}H_{36}BrCl_2N_3O_3$.

Растворимость соединения **1** определяли в соответствии с Общей фармакопейной статьей (ОФС.1.2.1.0005.15) [9] и заключили, что дигидрохлорид 6-бром-1-метил-5-метокси-2-(1-пиперидинометил)-3-(2-диэтиламиноэтокси)карбонилдола **1** относится к легко растворимым.

Клетки

В эксперименте использовали перевиваемую линию клеток почки африканской зеленой мартышки (*Chlorocebus aethiops*) Vero E6, клеточную линию 293T (субклон трансформированной эмбриональной линии клеток почки человека, НЕК 293, которая хорошо подвергается трансфекции и поддерживает высокие уровни экспрессии вирусного белка), а также клеточную линию мышинных фибробластов L-929. Все линии клеток предоставлены Всероссийской коллекцией клеточных культур при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Животные

Беспородные белые мыши (самцы весом 12,0–14,0 г) получены из питомника ООО «НЭО Маркет» (вет. свидетельство 250 № 0679392). Эксперименты проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и иных научных целях [10].

Животных распределяли на группы (интактную и четыре экспериментальных по три мыши в каждой) методом случайной выборки с учетом массы тела. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с Правилами лабораторной практики, принятыми в Российской Федерации [11]. Протокол исследования № 43 от 03.05.23 был рассмотрен и одобрен этическим комитетом Центра.

Вирусы

Пандемический штамм коронавируса человека SARS-CoV-2 с инфекционной активностью 10^6 ТЦИД₅₀/мл для клеток Vero E6 (клинический изолят: hCoV-19/Russia/Moscow-PMVL-12/2020 (EPI_ISL_572398)); вирус энцефаломиокардита мышей (ВЭМК), штамм «Колумбия SK-Col-SK» с титром 10^7 ТЦИД₅₀/мл. Вирусы получены из Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Определение цитотоксичности соединения (1)

Культуру клеток Vero E6 в питательной среде DMEM компании Gibco (Thermo FS) с добавлени-

ем 5% ЭТС (5 об. %), L-глутамин (2 мМ) и смеси антибиотиков (150 Ед/мл пенициллина и 150 Ед/мл стрептомицина) высевали в тест-планшеты в присутствии соединения **1** и без него и инкубировали в течение 96 ч при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в атмосфере 5% CO₂. Состояние монослоя и жизнеспособность клеток оценивали ежедневно. Затем удаляли культуральную среду из планшетов и в каждую лунку к монослою культуры клеток добавляли по 100 мкл среды РС (среда DMEM с 2% ЭТС Gibco (Thermo FS)) и 20 мкл раствора CellTiter 96@ Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, G3582) [12]. Инкубировали в течение 3 ч при $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, результаты учитывали на автоматическом ридере BIO-RAD при длине волны 490 нм, используя референс-фильтр 630 нм. Концентрацию раствора соединения **1**, вызывающую уменьшение значения оптической плотности при $\lambda = 490$ нм на 50% по сравнению с контролем, принимали за 50% цитотоксическую дозу (CC₅₀).

Проведение эксперимента по определению противовирусной активности

Использовали 24-часовой монослой культуры клеток, предварительно промытый средой РС, который обрабатывали нетоксичными для клеток концентрациями соединения **1** (т.е. ниже, чем величина CC₅₀). Клетки Vero E6 обрабатывали вирусом SARS-CoV-2 через 60 мин после внесения соединения **1**. Использовали следующие контроли: положительный контроль – культура клеток, инфицированная различными разведениями SARS-CoV-2 (от 10^{-1} до 10^{-7}), без соединения **1**; негативный контроль 1 – неинфицированная культура клеток без соединения **1**; негативный контроль 2 – неинфицированная культура клеток, в которую вносили по 100 мкл растворов соединения **1** в различных концентрациях. Каждую концентрацию соединения **1** исследовали в четырех параллелях. Тест-планшеты инкубировали в течение 96 ч при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в атмосфере 5% CO₂ до полного проявления ЦПД вируса в вирусном контроле в ожидаемом диапазоне. Противовирусную активность соединения **1** определяли визуально под микроскопом через 96 ч после инфицирования по ингибированию ЦПД вируса в культуре клеток Vero E6. За титр вируса принимали величину, обратную последнему разведению, в котором развивалось ЦПД. ТЦИД₅₀ рассчитывали по методу Рида–Менча для каждой концентрации исследуемого препарата и контрольного титрования вируса. Результат оценивали по $\Delta\lg_{\max}$ – максимальному снижению значения заражающей вирусной дозы в опыте по сравнению с контролем, выраженному в десятичных логарифмах. За ми-

нимально эффективную вирусингибирующую концентрацию принимали концентрацию соединения **1**, снижающую титр вируса не менее чем на 1.5 lg. Для получения статистически значимых результатов эксперименты проводили трижды.

Определение эффективности ингибирования синцитиеобразования

Клетки 293Т котрансфицировали в течение 48 ч плазмидой, содержащей полноразмерный S-гликопротеин (pVAX-1-S-glycoprotein; «Евроген», Россия), и плазмидой, кодирующей GFP (pUCHR-IRES-GFP), с помощью Transporter™ 5 transfection reagent. Далее к выращенному в 96-луночных планшетах монослою клеток Vero E6 добавляли различные концентрации соединения **1**, после чего в лунки вносили суспензию эффекторных клеток 293Т-S-GFP (соотношение клеток 3 : 1). Через 2 ч количество образовавшихся синцитиев оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии. Эффективность подавления слияния клеток, индуцированного S-гликопротеином SARS-CoV-2, оценивали по сравнению с контролем (без внесения соединения) с помощью программного обеспечения GraphPadPrism 5.0 и выражали в процентах.

Определение ИФН-индуцирующей активности

Забор крови у животных проводили методом декапитации в пробирки без антикоагулянта через 2, 24, 48, 72 ч после однократного внутривенного введения соединения **1** в дозе 121.2 мкмоль/мышь (70 мкг/мышь) или 0.2 мл дистиллированной воды (плацебо, контроль без препарата). Активность ИФН в сыворотке крови мышей определяли на клеточной линии мышинных фибробластов L-929. В работе использовали трехдневный монослой перевиваемой клеточной линии L-929, выращенный на среде 199 и DMEM (1 : 1) с добавлением 7% ЭТС, L-глутамина и антибиотиков: 150 Ед/мл пенициллина и 150 Ед/мл стрептомицина. ИФН в сыворотке крови определяли при титровании проб в культуре фибробластов L-929 мыши с использованием в качестве индикаторного вируса ВЭМК мыши, находя конечное разведение ИФН, которое защищало 50% клеток от цитопатогенного действия 100 ТЦИД₅₀ вируса.

Статистический анализ

Расчет значений 50% цитотоксической концентрации (CC₅₀) и 50% эффективной концентрации (IC₅₀) выполняли общепринятыми для биологических исследований методами при помощи пакета программ Microsoft Excel 5.0 и GraphPad Prism 6.01. За рабочую модель для анализа CC₅₀ принимали 4-параметрическое уравнение логистической кривой (пункты

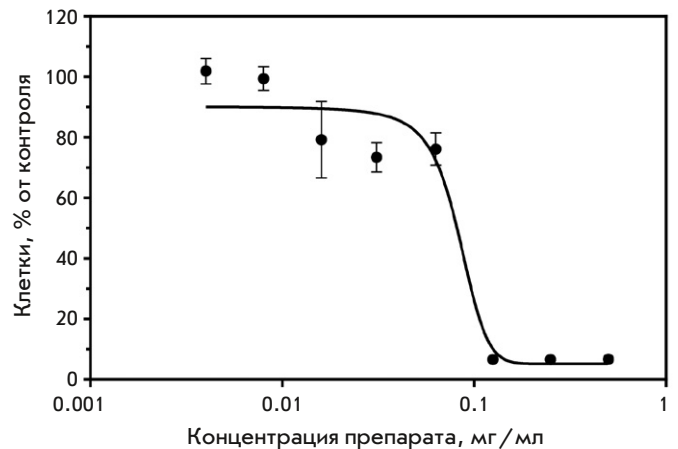


Рис. 6. Определение цитотоксического действия соединения **1** через 96 ч после добавления к культуре клеток Vero E6 (с использованием витального красителя MTS). CC₅₀ = 83.32 мкг/мл

меню «Нелинейная регрессия» – «Sigmoidal dose-response (variable slope)»). Для анализа IC₅₀ принимали 4-параметрическое уравнение логистической кривой (пункты меню «Нелинейная регрессия» – «log (inhibitor) vs. response (variable slope)»). На основании полученных данных рассчитывали индекс селективности (SI) по уравнению: SI = CC₅₀/IC₅₀.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение цитотоксичности соединения **1**

На основании данных, полученных при изучении цитотоксического действия соединения **1** на культуру клеток Vero E6 с использованием витального красителя MTS, построили аналитическую кривую, из которой определили значение CC₅₀ для соединения **1**. Концентрация, уменьшающая значение оптической плотности на 50% по сравнению с контролем, составила 83.32 мкг/мл (144.30 мкМ) (рис. 6).

Определение противовирусной активности соединения **1**

Противовирусную активность соединения **1** определяли по снижению инфекционного титра вируса (ТЦИД₅₀/мл) в культуре клеток Vero E6 (табл. 1).

Как видно из табл. 1, исследуемое соединение обладает достоверной дозозависимой антивирусной активностью *in vitro*, что указывает на специфический характер действия соединения, и полностью подавляет репродукцию вируса SARS-CoV-2 при концентрации 52.0 мкМ (30 мкг/мл), т.е. на 6 lg ТЦИД₅₀. В вирусологических исследованиях противовирусный эффект лекарственных средств

Таблица 1. Действие соединения 1 на репродукцию SARS-CoV-2

Концентрация соединения 1, мкМ (мкг/мл)	ТЦИД ₅₀	Контроль вируса	$\Delta \lg_{\max}$ максимальное снижение заражающей вирусной дозы в опыте по сравнению с контролем, выраженное в десятичных логарифмах
52.0 (30.0)	10 ⁰	10 ⁶	6
26.0 (15.0)	10 ¹	10 ⁶	5
13.0 (7.5)	10 ³	10 ⁶	3

Примечание: ТЦИД₅₀ – 50% тканевая цитопатогенная инфекционная доза.

Таблица 2. Активность ИФН в сыворотке крови мышей

Время после введения соединения 1 или плацебо мышам, ч	Титр ИФН (Ед/мл)	
	Соединение 1 (70 мкг/мышь)	Плацебо (контроль без препарата)
2	40	< 4
24	20	
48	20	
72	20	

принято считать удовлетворительным, если $\Delta \lg$ ТЦИД₅₀ ≥ 2.0 [13].

Значение IC₅₀ для изучаемого соединения, рассчитанное с помощью программного обеспечения GraphPadPrism 6.01, составило 1.84 мкМ (1.06 мкг/мл). Значение индекса селективности (SI), рассчитанное как отношение CC₅₀ к IC₅₀ ($SI = CC_{50}/IC_{50}$), составило 78.6.

Исследования эффективности ингибирования синцитиеобразования, индуцированного шиповидным белком (S-гликопротеином) вируса SARS-CoV-2

Проведены дополнительные исследования в системе синцитиеобразования, опосредованного шиповидным белком (S-гликопротеином) SARS-CoV-2. Обнаружено подавление синцитиеобразования, индуцированного шиповидным белком (S-гликопротеином) SARS-CoV-2, на 89%.

Определение интерферон (ИФН)-индуцирующего действия соединения 1

Результаты титрования представлены в табл. 2.

Показано, что соединение 1 обладало ИФН-индуцирующей активностью при его однократном внутрибрюшинном введении в дозе 121.2 мкмоль/мышь (70 мкг/мышь).

ОБСУЖДЕНИЕ

Коронавирус, открытый и описанный в 60-х гг. прошлого столетия, не привлекал к себе значительного

внимания, поскольку вызывал легко протекающие острые респираторные инфекции [14, 15]. Однако пандемия коронавирусной инфекции COVID-19 изменила отношение к коронавирусам и привела к поиску противовирусных средств, эффективных в отношении SARS-CoV-2. Поиск и разработка лекарственных средств для применения при пандемической коронавирусной инфекции тесно связаны с точкой приложения к вирусной репродукции и эффектам его действия при лечении больных. Исходя из последних опубликованных данных, инфекцию SARS-CoV-2 разделяют на четыре стадии, связанные с различными требованиями к лекарственным препаратам [16–18]. Так, стадия до контакта с SARS-CoV-2 предпочтительна для профилактической вакцинации, нейтрализующих антител и профилактических противовирусных препаратов. На следующей стадии, когда произошло заражение и идет репликация вируса, эффективно применение антител и противовирусных внутривенных и/или пероральных препаратов. К настоящему времени установлено, что эффект от лечения наблюдается, если антитела против SARS-CoV-2 вводить в течение 10 дней после появления симптомов [19, 20]; а пероральные противовирусные препараты могут оказывать эффект в течение 3–5 дней после появления симптомов [17, 21]. Известно, что репродукция вируса SARS-CoV-2 возрастает примерно в течение 3–5 дней после появления клинических симптомов, а затем снижается в течение двух-трех дней. Последующие клинические события связаны с на-

рушением регуляции иммунного ответа на SARS-CoV-2 [22]. Однако у некоторых больных рецидивы симптомов COVID-19 и наличие вируса выявляли значительно позже, что свидетельствовало о сохранности и репродукции вируса в отдельных компартментах на поздних сроках [23]. Таким образом, стало понятно, что для подавления реактивации вируса на поздних сроках заболевания также необходим доступный пероральный противовирусный и иммуномодулирующий низкомолекулярный препарат, который можно использовать при реактивации инфекции.

Обширный поиск позволил выявить значительное число соединений с анти-SARS-CoV-2-активностью в доклинических и клинических исследованиях (низкомолекулярные соединения, моноклональные антитела, ингибиторы пептидов, макромолекулярные ингибиторы, а также использование РНК-терапии и клеточной терапии) [24–26].

Имеющиеся противовирусные химиотерапевтические препараты, подавляющие вирусную репродукцию, в том числе аномальные нуклеозиды, ингибиторы вирусспецифических белков и ферментов, в отличие от вакцин, как правило, эффективны в отношении большего круга патогенных вирусов. Однако в ходе их применения нередко развиваются побочные эффекты и также формируются резистентные штаммы вируса, что приводит к рецидиву и обострению заболевания [27, 28].

Одним из широко используемых отечественных противовирусных препаратов является умифеновир (Арбидол, международное наименование Umifenovirum) [29], который включен в методические рекомендации по профилактике и лечению COVID-19 [18]. По данным Leneva и соавт. [30], умифеновир обладает противовирусным действием и ингибирует слияние вирусной оболочки с клеточными мембранами. Это приводит к невозможности проникновения вируса в клетку и подавлению его репродукции. Показано, что умифеновир ингибирует репликацию SARS-CoV-2 в клетках Vero E6 [31, 32]. Однако низкая биодоступность и нерастворимость в воде ограничили терапевтическую эффективность Арбидола и не позволили ему занять лидирующие позиции среди противоковидных лекарственных препаратов [33, 34].

Лекарственный препарат, который предполагается разработать на основе дигидрохлорид 6-бром-

1-метил-5-метокси-2-(1-пиперидинометил)-3-(2-диэтиламиноэтокси)карбонилндола, по-видимому, будет направлен предпочтительно на профилактику заражения и подавление репродукции SARS-CoV-2. Именно на этой стадии необходимо подавить репликацию и репродукцию вируса в соседних клетках и стимулировать реакции врожденного иммунитета путем активации рецепторов и индукции системы интерферона. По-видимому, этому может содействовать способность соединения в концентрации 52.0 мкМ полностью подавлять репродукцию вируса SARS-CoV-2 в клетках и обнаруженный эффективный механизм ингибирования синцитиеобразования, индуцированного шиповидным белком (S-гликопротеином) вируса SARS-CoV-2. Выявленная способность соединения индуцировать интерфероны, по-видимому, может свидетельствовать о его потенциале активировать систему интерферона и реакции врожденного иммунитета, что также позволяет использовать разрабатываемый препарат для подавления происходящих при COVID-19 следующих друг за другом этапов иммунной дисрегуляции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты демонстрируют противовирусный эффект синтезированного соединения **1** в отношении SARS-CoV-2 в исследованиях *in vitro*. В концентрации 52.0 мкМ данное соединение полностью ингибирует репродукцию вируса SARS-CoV-2 с инфекционной активностью 10^6 ТЦИД₅₀/мл. Концентрационные зависимости свидетельствуют о специфичности действия исследуемого соединения и указывают на перспективность разработанного соединения и возможность дальнейшего его изучения *in vivo* на экспериментальных животных. Соединение **1**, благодаря его синтетической доступности, высокой активности (IC₅₀ = 1.06 мкг/мл) и высокого индекса селективности (SI = 78.6), отвечает требованиям, необходимым для разработки противовирусного средства для профилактики и лечения COVID-19. ●

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (тема № 056-00119-21-00).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ВОЗ объявила об окончании пандемии коронавируса. <https://www.rbc.ru/society/05/05/2023/645503499a79477d05bf2bb4https://www.rbc.ru/society/05/05/2023/645503499a79477d05bf2bb4>
- WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard (WHO, accessed 12.06.2023); <https://covid19.who.int/>
- LIVE: Media briefing on COVID-19 and global health issues. World Health Organization (WHO). <https://www.youtube.com/watch?v=B0oBevft4bs>

4. Crook H., Raza S., Nowell J., Young M., Edison P. // *BMJ*. 2021. V. 374. № 1648. P. 1–18.
5. Coopersmith C.M., Antonelli M., Bauer S.R., Deutschman C.S., Evans L.E., Ferrer R., Hellman J., Jog S., Kesecioglu J., Kissoon N., et al. // *Crit. Care Med.* 2021. V. 49. № 4. P. 598–622.
6. Good S.S., Westover J., Jung K.H., Zhou X.J., Moussa A., La Colla P., Collu G., Canard B., Sommadossi J.P. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2021. V. 65. № 4. P. e02479–20.
7. Филимонова М.В., Цышкова Н.Г., Наровлянский А.Н., Маринченко В.П., Коваль Л.С., Парфенова Т.М., Измestьева А.В., Ершов Ф.И. Патент RU 2552422 С2. Российская Федерация. МПК C07D209/42(2006.01); A61K31/404(2006.01); A61P31/12(2006.01). 2015.
8. Trofimov F.A., Tsyshkova N.G., Grinev A.N. // *Chem. Heterocycl. Compd.* 1973. V. 9. P. 282–285.
9. Общая фармакопейная статья (ОФС.1.2.1.0005.15). Государственная фармакопея Российской Федерации. 14 изд. Т. 1. М., 2015. <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-1-0005-15-rastvorimost/>
10. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). // Strasbourg, 1986. 11 p.
11. ГОСТ. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур; Guidelines for accommodation and care of animals. Environment, housing and management. МКС 13.020.01. Дата введения 2016-07-01. <https://docs.cntd.ru/document/1200127789>
12. CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) («Promega», G3582). Instructions for use of products G3580, G3581 and G3582. Technical Bulletin.
13. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств // под ред. Миронова А.Н. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012. С. 527–551.
14. Tyrrell D.A.J., Bynoe M.L. // *Br. Med. J.* 1965. V. 1. P. 1467–1470.
15. Almeida J.D., Berry D., Cunningham C., Hamre D., Hofstad M.S., Mallucci L., McIntosh K., Tyrrell D.A.J. // *Nature*. 1968. V. 220. № 16. P. 650.
16. Cascella M., Rajnik M., Aleem A., Dulebohn S.C., Di Napoli R. Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). // *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publ., 2023.
17. Toussi S.S., Hammond J.L., Gerstenberger B.S., Andersen A.S. // *Nat. Microbiol.* 2023. V. 8. P. 771–786.
18. Временные методические рекомендации. «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 17 (09.12.2022)».
19. Fact Sheet for Health Care Providers Emergency Use Authorization (EUA) of Bamlanivimab and Etesevimab. Eli Lilly and Company, 2022.
20. Fact Sheet for Health Care Providers Emergency Use Authorization (EUA) of REGEN-COV (Casirivimab and Imdevimab). Regeneron, 2022.
21. Petty L.A., Malani P.N. // *JAMA*. 2022. V. 327. № 24. P. 2464.
22. Vetter P., Eberhardt C.S., Meyer B., Murillo M., Torriani G., Pigny F., Lemeille S., Cordey S., Laubscher F., Vu D.L. et al. // *mSphere*. 2020. V. 5. № 6. P. e00827–20.
23. Deo R., Choudhary M.C., Moser C., Ritz J., Daar E.S., Wohl D.A., Greninger A.L., Eron J.J., Currier J.S., Hughes M.D., et al. // *Ann. Intern. Med.* 2023. V. 176. № 3. P. 348–354.
24. Li G., Hilgenfeld R., Whitley R., De Clercq E. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2023. V. 22. № 6. P. 449–475.
25. Zaki M.M., Lesha E., Said K., Kiaee K., Robinson-McCarthy L., George H., Hanna A., Appleton E., Liu S., Ng A.H.M., et al. // *Sci. Adv.* 2021. V. 7. № 33. P. eabg5995.
26. Meganck R.M., Baric R.S. // *Nat. Med.* 2021. V. 27. № 3. P. 401–410.
27. Samson M., Pizzorno A., Abed Y., Boivin G. // *Antiviral Res.* 2013. V. 98. № 2. P. 174–185.
28. Wyles D.L. // *J. Infect. Dis.* 2013. V. 207. № 1. P. 33–39.
29. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. J05 Antivirals for systemic use. J05AX Other antivirals. https://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=J05AX.
30. Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S., Hay A.J. // *Antiviral Res.* 2009. V. 81. № 2. P. 132–140.
31. Leneva I., Kartashova N., Poromov A., Gracheva A., Korchevaya E., Glubokova E., Borisova O., Shtro A., Loginova S., Shchukina V., et al. // *Viruses*. 2021. V. 13. № 8. P. 1665.
32. Ge Y., Tian T., Huang S., Wan F., Li J., Li S., Wang X., Yang H., Hong L., Wu N., et al. // *Signal Transduct. Target Ther.* 2021. V. 6. № 1. P. 165.
33. Chen C., Zhang Y., Huang J., Yin P., Cheng Z., Wu J., Chen S., Zhang Y., Chen B., Lu M., et al. // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 12. P. 683296.
34. Арчаков А.И., Гусева М.К., Учайкин В.Ф., Ипатова О.М., Доцицин Ю.Ф., Тихонова Е.Г., Медведева Н.В., Прозоровский В.Н., Стрекалова О.С., Широинин А.В. Патент РСТ/WO2010128889A1, РФ. МПК А61К9/19. 2010.