

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
НОВОСИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. Н.Н. ВОРОЖЦОВА
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

Мордвинова Екатерина Денисовна

ПСЕВДОВИРУСНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ПОИСКА ИНГИБИТОРОВ
КОРОНАВИРУСОВ

1.5.3 – Молекулярная биология

1.5.10 – Вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
д.х.н. Яровая Ольга Ивановна
к.б.н. Щербаков Дмитрий Николаевич

Кольцово – 2025

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
1.1 Общие сведения о коронавирусах	12
1.1.1. Характеристика коронавирусов	12
1.1.2. Структура коронавирусной частицы	13
1.2. Строение поверхностного белка коронавирусов	15
1.2.1. Общая структура поверхностного S белка	15
1.2.2. Рецептор-связывающий домен	16
1.2.3. N-концевой домен	19
1.2.4. С-концевой домен	21
1.2.5. S2 субъединица	22
1.2.6. Конформационная перестройка поверхностного белка при проникновении вируса в клетку	23
1.3. Мишени для разработки противовирусных препаратов против коронавирусов	26
1.3.1. Клеточные факторы хозяина, необходимые для репликации вируса	27
1.3.2. Вирусные протеазы	27
1.3.3. РНК-зависимая РНК-полимераза и вспомогательные ферменты	28
1.3.4. Структурные белки М, Е и N	28
1.3.5. Поверхностный белок S	29
1.4. Подходы к поиску ингибиторов поверхностных белков вирусов	29
1.4.1. Вычислительный метод	29
1.4.2. Иммунохимические методы	31
1.4.3. Суррогатные системы	31
1.4.4. Вирусологические методы	34
1.4.5. Методы, подтверждающие взаимодействие лиганд-белок	36
1.5. Низкомолекулярные ингибиторы проникновения коронавирусов	38
1.5.1. Ингибиторы поверхностного белка SARS-CoV-2	39
1.5.2. Ингибиторы клеточных протеаз	44
Заключение	48
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	50
2.1. Материалы	50
2.1.1. Коммерческие наборы, ферменты и реактивы	50

2.1.2. Клеточные линии, штаммы бактерий и вирусов	51
2.1.3. Олигонуклеотиды	52
2.1.4. Питательные среды	53
2.1.5. Растворы и буферы.....	53
2.1.6. Программное обеспечение.....	53
2.2. Методы	53
2.2.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	53
2.2.2. Выделение ДНК из агарозного геля	54
2.2.3. Ферментативный гидролиз ДНК.....	54
2.2.4. Лигирование.....	54
2.2.5 Трансформация компетентных клеток E.coli NEB Stable методом heat-shock.....	55
2.2.6. Отбор положительных клонов	55
2.2.7. Определение нуклеотидной последовательности ДНК.....	55
2.2.8. Выделение плазмидной ДНК	56
2.2.9. Трансфекция клеточной культуры с использованием Lipofectamine 3000	56
2.2.10. Получение псевдовиральных частиц на основе рекомбинантного вируса везикулярного стоматита	56
2.2.11. Получение псевдовиральных частиц на лентивирусной основе	57
2.2.12. Функциональный анализ псевдовиральных частиц.....	57
2.2.13. Очистка псевдовиральных частиц на сахарозной подушке	57
2.2.14. Определение цитотоксичности соединений на культуре клеток HEK 293T методом МТТ-теста	58
2.2.15. Определение ингибирующей активности соединений и нейтрализующей активности антител.....	58
2.2.16. Получение стабильного клеточного продуцента на основе HEK293T	59
2.2.17. Твердофазный иммуноферментный анализ.....	59
2.2.18. Анализ уровня экспрессии гена, кодирующего TMPRSS2	59
2.2.19. Анализ экспрессии рецепторов ACE2 и DPP4 методом проточной цитофлуориметрии	60
2.2.20. Оценка противовирусной активности соединений против вирусов SARS-CoV-2	60
2.2.21. Молекулярный докинг	61
2.2.22. Ферментативная кинетика	62
2.2.23. Статистический анализ	62
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	63
3.1. Разработка псевдовиральной системы SARS-CoV-2	63

3.1.1. Конструирование плазмид, содержащих ген S вируса SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1	63
3.1.2. Выбор системы сборки	67
3.1.3. Конструирование плазмид, содержащих ген S коронавируса SARS-CoV, MERS-CoV и наиболее эпидемиологически значимых вариантов SARS-CoV-2	69
3.1.4. Получение клеточных линий HEK293T-ACE2, HEK293T-ACE2-TMPRSS2 и HEK293T-DPP4.....	69
3.1.5. Изучение антигенных свойств псевдовирусов SARS-CoV-2.....	76
3.2. Тестирование библиотек соединений.....	77
3.2.1. Тестирование производных терпеноидов	78
3.2.2. Тестирование производных усниновой кислоты	85
3.2.3. Тестирование библиотеки конъюгатов адамантана и монотерпена.....	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	101
ВЫВОДЫ	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	105
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Фрагменты секвенограмм конструкций ph-S, ph-SΔ18, ph-lid-SΔ18, ph-SΔ18_Delta, ph-SΔ18_Omicron, ph-SΔ18_XBB.1.5, ph-SARS и ph-MERS	115
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Фрагменты секвенограмм конструкций pVEAL3-ACE2, pVEAL4-ACE2-TMPRSS2 и pVEAL3-DPP4	119
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Результаты скрининга библиотеки соединений: структура, цитотоксичность (CC ₅₀); ингибирующая активность (IC ₅₀) в отношении псевдовирусных частиц SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1; соответствие правилу Липинского	121

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

a.o. – Аминокислотные остатки;

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;

ДМСО – Диметилсульфоксид;

ACE2 – Angiotensin-Converting Enzyme 2/ Ангиотензин-превращающий фермент 2;

BLI – Biolayer interferometry/ Бислойная интерферометрия;

BSL – Biosafety Level/ Уровень биологической безопасности;

CoV – коронавирусы;

CatB/L – Cathepsin/ Катепсины B/L;

CC₅₀ – 50% cytotoxic concentration/ 50% цитотоксическая концентрация;

CTD – C-terminal domain / C-концевой домен;

ERGIC – Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment/ Промежуточный компартмент эндоплазматического ретикула и аппарата Гольджи;

DPP4 – Dipeptidyl-peptidase 4/ Дипептидилпептидаза-4;

FDA – Food and Drug Administration/ Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в США;

Gal-3 – Galectin-3/ Галектин-3;

GFP – Green Fluorescent Protein/ Зелёный флуоресцентный белок;

FPPR – Fusion-peptide proximal region/ Проксимальная область пептида слияния;

Nsp – Non-structural protein/ Неструктурный белок;

NTD – N-terminal domain/ N-концевой домен;

HIV-1 – Human immunodeficiency virus 1/ Вирус иммунодефицита человека;

HR – Heptad repeat/ Гептадные повторы;

IC₅₀ – Half maximal inhibitory concentration/ Полумаксимальная ингибирующая концентрация;

RBD – Receptor-Binding Domain/ Рецептор-связывающий домен;

RBM – Receptor-Binding Motif/ Рецептор-связывающий мотив;

RdRp – RNA-dependent RNA polymerase/ РНК-зависимая РНК-полимераза;

RLU – Relative Light Unit/ Относительная единица света;

SI – Selectivity index/ Индекс селективности;

SPR – Surface plasmon resonance/ Поверхностный плазмонный резонанс;

TMPRSS2 – Transmembrane protease, serine 2/ Трансмембранная-связанная сериновая протеаза 2;

TPA – Tissue Plasminogen Activator/ Тканевый активатор плазминогена;

VSV – Vesicular stomatitis virus/ Вирус везикулярного стоматита.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусные заболевания представляют собой не только серьезную глобальную проблему здравоохранения, но и экономическую угрозу для страны, вызывая значительные социальные и финансовые последствия. За последние двадцать лет человечество столкнулось с несколькими вспышками вирусных инфекций, эпидемиями и пандемиями, вызванными коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) в 2002–2003 гг., коронавирусом ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) в 2012 г. и последующие годы, эболавирусом в Западной Африке в 2014-2015 гг., вирусом Ласса в Нигерии в 2018 г. и коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) в 2020-2023 гг. [1]. Эти события продемонстрировали уязвимость современных систем здравоохранения перед новыми и возвращающимися вирусами, а также выявили недостаточную готовность к быстрому реагированию на подобные угрозы.

Особую угрозу представляют коронавирусы, способные вызывать тяжелые заболевания человека и быстро распространяться в популяции. Их высокая генетическая изменчивость, способность к межвидовой передаче от животных к человеку, а также потенциал адаптации к новым хозяевам указывают на высокую вероятность появления новых вспышек в будущем [2]. Это подчеркивает необходимость разработки универсальных противовирусных препаратов, эффективных против различных штаммов и видов коронавирусов, а также создания суррогатных систем, которые позволят быстро адаптировать исследовательские платформы к новым вирусным угрозам. Такие системы должны обеспечивать безопасность, воспроизводимость и высокую скорость проведения исследований, что особенно важно в условиях ограниченного времени при возникновении пандемий [3].

Поиск противовирусных препаратов является сложной задачей, требующей комплексного подхода. Она значительно усложняется в случае высокопатогенных вирусов, работа с которыми возможна только в специализированных лабораториях с высоким уровнем биобезопасности (BSL-3 и BSL-4). Это ограничивает доступность исследований и замедляет разработку новых терапевтических средств. Решением данной проблемы является разработка суррогатных тест-систем, которые позволяют безопасно и быстро проводить необходимые исследования без использования патогенных вирусов. Одной из таких систем являются псевдовирусные частицы, которые могут имитировать процесс заражения живым вирусом, экспонируя на своей оболочке поверхностный белок патогенного вируса, например, поверхностный белок S SARS-CoV-2 [4]. Такие системы обеспечивают возможность изучения механизмов проникновения вируса в клетки,

тестирования потенциальных ингибиторов и разработки новых противовирусных стратегий в стандартных лабораторных условиях уровня биологической безопасности BSL-2. Кроме того, псевдовиральные системы позволяют проводить высокопроизводительный скрининг библиотек соединений, что значительно ускоряет процесс поиска перспективных кандидатов в противовирусные препараты.

Дополнительным преимуществом использования псевдовиральных систем является их универсальность. Они могут быть адаптированы для изучения различных вирусов путем замены поверхностных белков, что делает их ценным инструментом для подготовки к будущим вирусным угрозам. В условиях глобальной эпидемиологической нестабильности разработка таких систем становится стратегически важной задачей, направленной на минимизацию последствий новых пандемий и обеспечение быстрого ответа на возникающие вызовы.

Цель и задачи исследования:

Целью настоящей работы является разработка псевдовиральной системы и ее использование для поиска ингибиторов проникновения коронавирусов в клетки-мишени.

Задачами данной работы являлись:

1. Конструирование рекомбинантных плазмид, обеспечивающих сборку коронавирусных псевдовирусов;
2. Разработка клеточных линий, чувствительных к коронавирусам;
3. Анализ функциональных свойств псевдовирусов;
4. Анализ ингибирующей активности библиотек низкомолекулярных органических соединений с использованием разработанной суррогатной системы.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

В работе получены плазмиды, содержащие гены поверхностного S белка коронавирусов: SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1, Delta, Omicron и XBB.1.5), SARS-CoV, MERS-CoV, обеспечивающие синтез и сборку функциональных псевдовиральных частиц.

Впервые были сконструированы оригинальные плазмидные векторы pVEAL3-ACE2, pVEAL4-ACE2-TMPRSS2, pVEAL3-DPP4, содержащие в своем составе гены рецепторов входа коронавирусов ACE2 и TMPRSS2 (SARS подобные), а также DPP4 (MERS подобные), обеспечивающие интеграцию в геном клеток млекопитающих.

С использованием полученных плазмидных конструкций разработаны трансгенные клеточные культуры, содержащие на своей поверхности рецепторы ACE2, TMPRSS2 (SARS подобные) и DPP4 (MERS подобные).

Разработан протокол получения и функционального анализа псевдовиральных частиц с использованием лентивирусной системы и трансгенных клеточных культур, содержащих на своей поверхности ACE2, TMPRSS2 (SARS подобные) и DPP4 (MERS подобные).

Впервые с использованием разработанной суррогатной системы отработана методика скрининга и проведен анализ активности 109 соединений: производных различных терпеноидных и стероидных скелетов, производных усниновой кислоты, а также производных адамантана, содержащих монотерпеновые фрагменты. Были идентифицированы соединения (**11**, **21**, **2a**, **4b**, **5a**), которые проявляли ингибирующую активность в отношении коронавирусов со значениями IC₅₀ в низкомикромолярном диапазоне (от 2.6 до 10 мкМ).

Для производных усниновой кислоты установлен мультитаргетный характер ингибирования SARS-CoV-2. Показана активность в отношении псевдовиральных частиц и основной протеазы 3CL.

Методология и методы диссертационного исследования

Исследование выполнено с применением комплекса общенаучных и специальных методов, включая методы генетической инженерии, молекулярной биологии, иммунохимии, методы работы с культурами клеток, вирусологии, а также компьютерные методы. Применение данного методологического подхода позволило комплексно решить поставленные задачи и обеспечить достоверность полученных результатов.

Положения, выносимые на защиту

1. Плазмидная конструкция, содержащая ген S белка SARS-CoV-2 с делецией участка, кодирующего последние восемнадцать аминокислот С-конца, обеспечивает сборку лентивирусных псевдовиральных частиц, обладающих наибольшей функциональной активностью.
2. Трансфекция клеточной линии HEK293T плазмидами pVEAL3-ACE2, pVEAL4-ACE2-TMPRSS2 и pVEAL3-DPP4 обеспечивает получение трансгенных клеточных линий, стабильно экспонирующих на своей поверхности рецепторы ACE2, TMPRSS2 и DPP4.
3. Клеточная линия HEK293T-ACE2-TMPRSS2 обладает большей чувствительностью к псевдовиральным частицам SARS-CoV-2 по сравнению с линией, экспрессирующей только ACE2 (HEK293T-ACE2).

4. Сложноэфирные производные борнеола (соединения **11** и **21**) и конъюгаты адамантана и монотерпенов (соединения **2a**, **4b**, **5a**), проявляют противовирусную активность в отношении широкого спектра псевдотипированных частиц и патогенных штаммов SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1, Delta, Omicron) с IC_{50} в низкомикромолярном диапазоне (3,5 – 10 мкМ) и высоким индексом селективности ($SI > 10$).

Степень достоверности и апробация результатов

Основные положения и выводы диссертационной работы являются научно обоснованными. Достоверность полученных результатов подтверждается экспериментальными данными и согласуется с литературными источниками. Результаты диссертационной работы были представлены на Всероссийской молодежной научной школе-конференции «Актуальные проблемы органической химии» (Шерегеш, 2024 г.), Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 65-летию со дня основания НИОХ СО РАН «Современные проблемы органической химии» (Новосибирск, 2023 г.), Всероссийской конференции с международным участием «Идеи и наследие А.Е. Фаворского в органической химии» (Санкт-Петербург, 2023 г.), I междисциплинарной всероссийской молодежной научной школы-конференции с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты» (Казань, 2023 г.), международной конференции OpenBio (Кольцово, 2022 г.), международной научной студенческой конференции (Новосибирск, 2021 г.).

Результаты работы отражены в 11 публикациях в отечественных и зарубежных изданиях, из них 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций, 6 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка используемой литературы и приложений. Работа изложена на 128 страницах, включает 44 рисунка, 11 таблиц и 3 приложения. Список литературы включает 141 источника.

Личный вклад

Основная часть экспериментальной работы (клонирование, работа с клеточными культурами, иммуноферментный анализ, тестирование соединений) была выполнена лично автором. Секвенирование нуклеотидных последовательностей было проведено в ЦКП «Геномика» (ИХБФМ, Новосибирск). Анализ образцов методом электронной микроскопии был выполнен заведующим отделом микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора Тарановым О.С. и в.н.с. Зайцевым Б.Н. Проточную цитофлуориметрию клеточных культур проводила научный сотрудник отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора к.б.н. Старостина Е.В. Синтез библиотек соединений был выполнен сотрудниками лаборатории физиологически активных веществ к.х.н. Соколовой А.С., д.х.н. Яровой О.И., к.х.н. Ковалевой К.С. и др., и лаборатории направленных трансформаций природных соединений к.х.н. Можайцевым Е.С., к.х.н. Суловым Е.С., к.х.н. Понамаревым К.Ю. НИОХ им. Н.Н. Ворожцова СО РАН. Тестирование соединений на вирусе SARS-CoV-2 проведено к.б.н. Зайковской А.В. (отдел «Коллекции микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Определение ингибирующей активности соединений в отношении ферментов выполнено совместно с сотрудниками лаборатории ингибиторов вирусных протеаз НИОХ им. Н.Н. Ворожцова СО РАН к.х.н. Мешковой Ю.В., к.б.н. Марениной М.К. Молекулярное моделирование выполнено совместно с д.х.н. Борисевич С.С. и Мустаевым Е.А. (ЦКП «Скиф»).

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Общие сведения о коронавирусах

1.1.1. Характеристика коронавирусов

Коронавирусы (лат. *Coronaviridae*) представляют собой семейство оболочечных одноцепочечных (+)-РНК-вирусов. Они характеризуются высокой частотой генетической рекомбинации и мутаций, что приводит к их экологическому разнообразию и адаптивному потенциалу. Коронавирусы способны инфицировать широкий круг хозяев и легко к ним адаптироваться — от птиц до китов [5].

Семейство *Coronaviridae* включает три подсемейства: *Letovirinae*, *Pitovirinae* и *Orthocoronavirinae*. Подсемейство *Orthocoronavirinae* содержит 4 рода: альфа-, бета-, гамма- и дельтакоронавирусы. Альфакоронавирусы (HCoV-229E и HCoV-NL63) и бетакоронавирусы (HCoV-OC43 и HCoV-NKU1) циркулируют среди населения и вызывают сезонные инфекции дыхательных путей с легким течением, сопровождающиеся общими симптомами простуды [6].

К патогенным вирусам для человека относятся SARS-CoV и SARS-CoV-2 (коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 1 и 2), MERS-CoV (коронавирус ближневосточного респираторного синдрома), способные вызывать тяжелые респираторные заболевания, потенциально приводящие к летальному исходу. Эти вирусы обладают высокой способностью к передаче и могут распространяться воздушно-капельным и контактным путями.

В 2002–2003 гг. в Китае была зарегистрирована вспышка атипичной пневмонии, вызванной SARS-CoV. За время эпидемии было зарегистрировано 8096 подтвержденных случаев заболевания и 774 летальных исхода.

В 2012 году впервые был выделен MERS-CoV у пациента из Саудовской Аравии. К 2019 году было зарегистрировано около 2500 случаев заражения MERS-CoV, при этом уровень смертности составил около 30%.

В конце декабря 2019 года в городе Ухань, Китай, были зарегистрированы групповые случаи тяжелой пневмонии. Этиологический агент был выделен и идентифицирован как новый бетакоронавирус, названный SARS-CoV-2. Геном SARS-CoV-2 имеет ~80% сходство с геномом SARS-CoV. SARS-CoV-2 вызывает заболевание COVID-19, основными симптомами которого являются: лихорадка, сухой кашель, усталость, одышка и, в некоторых случаях, тошнота. У большинства пациентов наблюдалась двусторонняя пневмония, что требовало госпитализации и интенсивной терапии в тяжелых

случаях. По последним данным ВОЗ на 2024 год в мире зарегистрировано более 775 миллионов подтвержденных случаев COVID-19 и более 7 миллионов смертей, связанных с этим заболеванием.

1.1.2. Структура коронавируса частицы

Вирионы SARS-CoV-2 имеют приблизительно сферическую или эллипсоидальную форму со средним диаметром 108 ± 8 нм. Геном SARS-CoV-2 имеет размер около 30 тыс. нуклеотидов, содержит 10 открытых рамок считывания (ORF) и кодирует 29 вирусных белков (4 структурных белка (S, E, M и N), 16 неструктурных белков (nsp1–16) и 9 вспомогательных белков) [7]. Неструктурные белки участвуют в репликации вируса и подавлении иммунного ответа хозяина, тогда как функции вспомогательных белков изучены недостаточно, но предполагается их роль в регуляции вирусной инфекции и взаимодействии с клеткой-хозяином.

Внешняя поверхность вириона покрыта шиповидными белками (S), которые формируют характерную "корону" и отвечают за связывание с рецепторами клетки-хозяина. Помимо белка S, в состав вирусной оболочки входят мембранный белок (M) и оболочечный белок (E), участвующие в сборке и морфогенезе вириона. Нуклеокапсидный белок (N), единственный структурный белок внутри вириона, защищает геномную РНК и упаковывает ее в рибонуклеопротеиновый комплекс [8] (рис. 1.1).

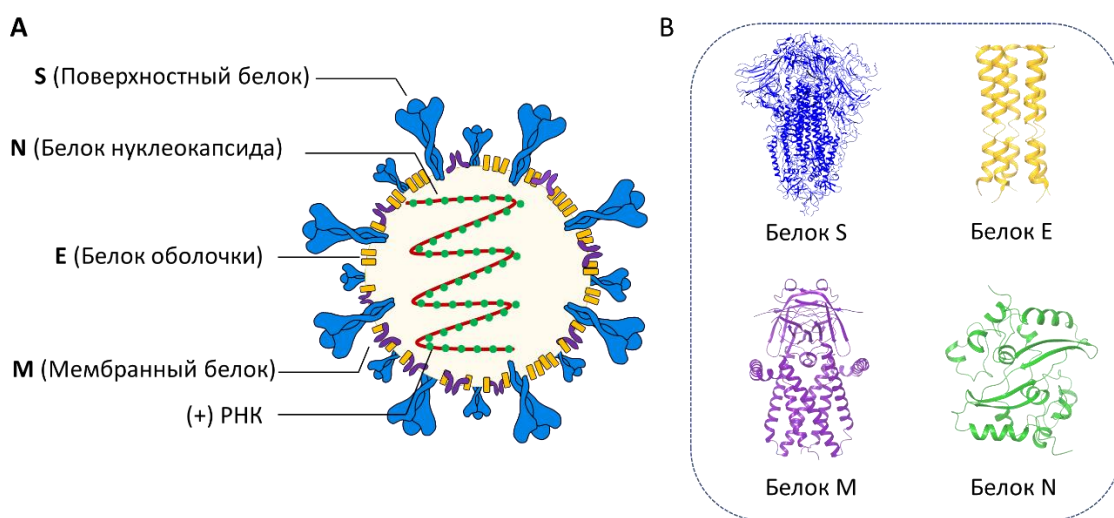


Рисунок 1.1. А. Структура вириона SARS-CoV-2. В. Структурные белки SARS-CoV-2.

Белок М (~25–30 кДа) является наиболее распространенным вирусным структурным белком, играющим центральную роль в управлении сборкой вируса и почкованием посредством взаимодействия со структурными белками Е, S и N. Белок М состоит из трех структурных сегментов: N-концевого гликозилированного эктодомена (содержащего три трансмембранные спирали, встроенные в вирусную оболочку), околосмембранной

шарнирной области и внутривиреонного С-концевого домена [9]. Белок М существует в виде димера и собирается в олигомеры более высокого порядка в промежуточном компартменте эндоплазматического ретикулума (ERGIC) - комплекса Гольджи. Олигомеризация белка М индуцирует искривление мембраны и координирует упаковку комплекса N-РНК совместно с белками Е и S в ERGIC. Вместе белки М и Е составляют основу вирусной оболочки и их взаимодействие является достаточным для производства и высвобождения вирусоподобных частиц.

Белок Е (8–12 кДа) – высококонсервативный структурный белок, присутствующий во всех коронавирусах. Во время инфекции он локализуется преимущественно в мембранах ERGIC, функционирует как катион-селективный виropорин, формируя ионные каналы, и встраивается в зарождающуюся вирусную оболочку [10],[11]. Виropорин состоит из трех доменов: короткого гидрофильного N-концевого домена, гидрофобного трансмембранного домена и длинного гидрофильного С-концевого домена [12]. Роль белка Е в вирусной инвазии, репликации и высвобождении до конца не изучена. Однако исследования показали, что рекомбинантные коронавирусы с делецией гена белка Е характеризуются значительным снижением вирусных титров, нарушением процессов вирусного созревания или образованием нежизнеспособного потомства [13]. Эти данные подчеркивают важность белка Е для эффективного производства и созревания вируса.

Белок N (~46–48 кДа) SARS-CoV-2 содержит два отдельных РНК-связывающих домена (N- и С-концевой домен), связанных слабоструктурированной областью, богатой остатками серина и аргинина [14]. Основная функция белка N заключается в упаковке вирусной геномной РНК в длинный спиральный рибонуклеокапсидный комплекс и участии в сборке вириона посредством его взаимодействия с вирусным геномом и мембранным белком М [15]. Помимо структурной роли, белок N обладает выраженной иммунорегуляторной активностью: подавляет индукцию интерферонов I типа, в частности, блокирует фосфорилирование и ядерную транслокацию IRF3 и IRF7, а также активацию NF-κB; нарушает процессинг первичных miRNA; препятствует ранней индукции апоптоза и нарушает клеточный цикл хозяина за счет ингибирования активности комплекса циклин-CDK [16], [17].

Белок S (протомер ~180–200 кДа, гомотример ~480–600 кДа) играет ключевую роль во взаимодействиях вируса и клетки-хозяина, обеспечивая прикрепление вирусной частицы к поверхности клетки, слияние мембран и последующее проникновение вируса внутрь клетки. В связи с этим белок S является основной мишенью для нейтрализующих антител, разработки вакцин и терапевтических средств против COVID-19.

1.2. Строение поверхностного белка коронавирусов

1.2.1. Общая структура поверхностного S белка

Поверхностный гликопротеин S SARS-CoV-2 относится к белкам слияния I класса, в нативном состоянии существует в виде гомотримера, состоящего из трёх идентичных протомеров. Каждый протомер S белка состоит из 1273 аминокислот, содержит 22 N-связанных сайта гликозилирования и ряд участков O-гликозилирования и включает две субъединицы – S1 и S2 [18]. Поверхностная субъединица S₁ состоит из 672 аминокислот (а.о. 14-685) и организована в четыре домена: N-концевой домен (NTD), С-концевые домены (CTD1 и CTD2), рецептор-связывающий домен (RBD). Трансмембранная S2 субъединица (а.о.686-1273) включает N-концевой гидрофобный пептид слияния (FP), проксимальную область пептида слияния (FPPR), два гептадных повтора (HR1 и HR2), трансмембранный домен (TM) и цитоплазматический участок (CT) (рис. 1.2) [19]. Структура S-белка SARS-CoV-2 была определена методом криоэлектронной микроскопии с атомарным разрешением [20]. Тримеры S-белка формируют характерный выпуклый коронообразный ореол, окружающий вирусную частицу.

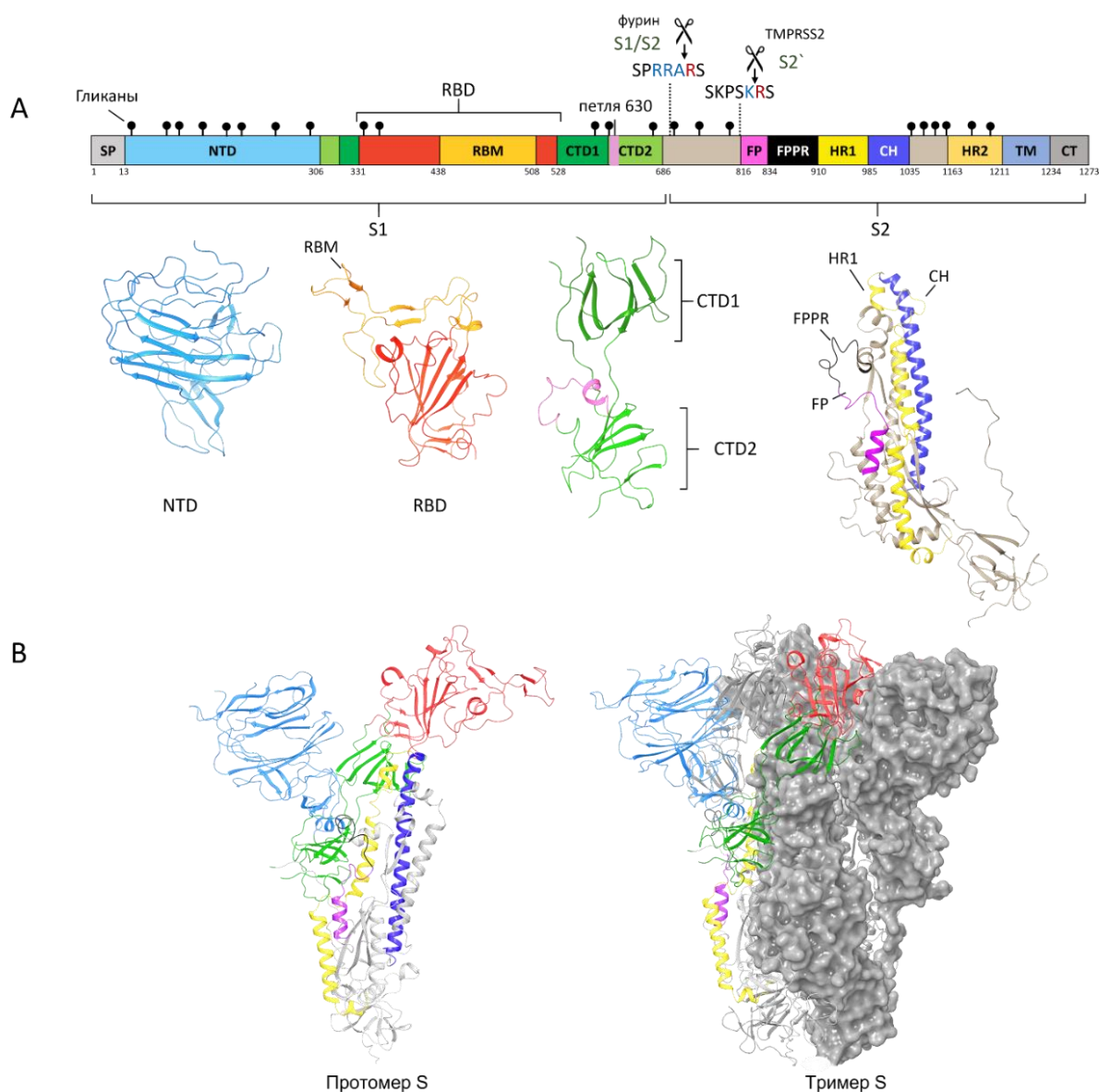


Рисунок 1.2. А. Структура доменов поверхностного белка S SARS-CoV-2; **В.** Структура протомера и тримера S SARS-CoV-2.

Белки S CoVs обладают уникальными особенностями - содержат несколько сайтов протеолитического расщепления и функциональных мотивов. Это позволяет им выступать в качестве субстрата для широкого спектра протеаз клеток-хозяев, включая катепсины, трипсиноподобные сериновые протеазы (например, члены семейства TMPRSS2) и фуриноподобные пропротеиновые конвертазы. Такое разнообразие ферментов, участвующих в расщеплении S белка, обеспечивает коронавирусам гибкость, необходимую для проникновения в новые типы клеток, ткани и виды хозяев [21].

1.2.2. Рецептор-связывающий домен

Рецептор-связывающий домен (RBD) играет ключевую роль в проникновении вируса в клетку-хозяина и является важной мишенью большинства нейтрализующих

антител. Данный домен представляет интерес в качестве платформы для разработки вакцин и терапевтических агентов.

Рецептор-связывающий домен расположен в субъединице S1 и состоит из двух мотивов: ядра и расширенной петли – рецептор-связывающего мотива (RBM) (рис. 1.3 А).

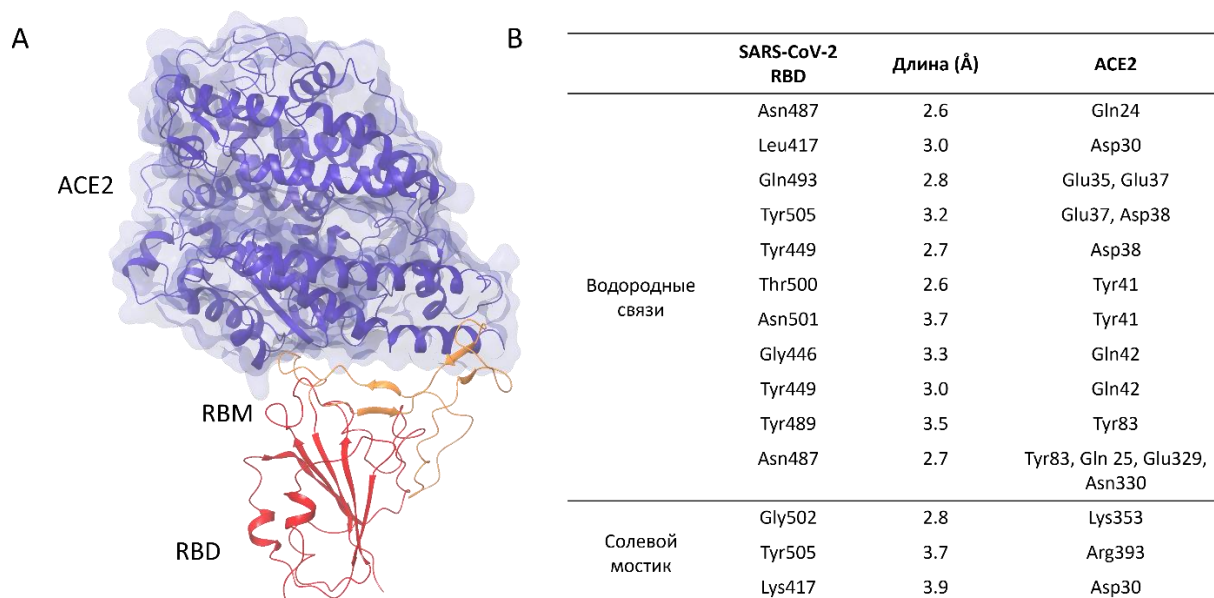


Рисунок 1.3. А. Структура комплекса RBD-ACE2. В. Взаимодействия между аминокислотными остатками RBD и ACE2.

Ядро представляет собой скрученный пятиницевой антипараллельный β -лист ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$ и $\beta 7$) с тремя короткими спиралями ($\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$). Между антипараллельными нитями $\beta 4$ и $\beta 7$ находится RBM, состоящий из петель и α -спиралей, а также коротких нитей $\beta 5$ и $\beta 6$. RBD стабилизируется четырьмя дисульфидными связями, три из которых расположены в ядре (Cys336–Cys361, Cys379–Cys432, Cys391–Cys525), а последняя находится в стабилизирующей петле на дистальном конце RBM (Cys480–Cys488) [22].

RBD связывается с клеточным рецептором ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) в N-концевом пептидазном домене. Рецепторы ACE2 распространены повсеместно и широко экспрессируются на поверхности клеток сердца, сосудов, кишечника, легкого (особенно в пневмоцитах и макрофагах 2-го типа), почек, яичников и мозга [23]. ACE2 в основном связан с клеточными мембранами и лишь в незначительной степени присутствует в кровотоке в растворимой форме [24]. Кроме SARS-CoV-2, рецептор ACE2 используют для входа в клетку коронавирусы SARS-CoV и HCoV-NL63.

Рецептор-связывающий домен SARS-CoV-2 демонстрирует значительную структурную гомологию с RBD SARS-CoV, что согласуется с высокой степенью идентичности их аминокислотных последовательностей, которая составляет 73–76% для

всего домена и около 50% для RBM. Однако, несмотря на структурное сходство, RBD SARS-CoV-2 обладает значительно более высокой аффинностью к рецептору ACE2.

Экспериментальные данные, полученные методом биослойной интерферометрии, показывают, что константа диссоциации (K_d) для связывания белка S вируса SARS-CoV-2 с ACE2 составляет 1,2 нМ, что почти в 4 раза ниже, чем у SARS-CoV ($K_d = 5$ нМ) [20]. В другом исследовании были получены схожие значения K_d , например, K_d ACE2 и RBD SARS-CoV-2 составила 4,7 нМ, а ACE2 и RBD SARS-CoV – 31 нМ [25]. Кроме того, методом молекулярной динамики были получены значения свободной энергии связывания (ΔG) для комплекса RBD SARS-CoV-2 с ACE2, которые находятся в диапазоне от -106 до -140 ккал/моль. Эти значения значительно ниже, чем для SARS-CoV (ΔG от -50 до -71 ккал/моль), что указывает на термодинамически более выгодное взаимодействие RBD SARS-CoV-2 с ACE2 [26].

Структурный анализ взаимодействия между RBD SARS-CoV и ACE2 выявил в общей сложности 16 аминокислотных остатков (а.о.) RBD SARS-CoV, контактирующих с 20 а.о. ACE2 (рис.1.3 В) [27].

Заметным структурным различием между RBM SARS-CoV-2 и SARS-CoV является конформация петель в области, связывающейся с ACE2. SARS-CoV содержит мотив из трех остатков Pro-Pro-Ala, который позволяет петле делать резкий поворот, тогда как SARS-CoV-2 содержит мотив Gly-Val/Gln-Glu/Thr-Gly. Наличие двух гибких глицинов и двух более крупных остатков позволяет петле SARS-CoV-2 принимать более компактную конформацию, формировать дополнительные водородные связи внутри RBM и сближать петлю с ACE2 (рис. 1.4).

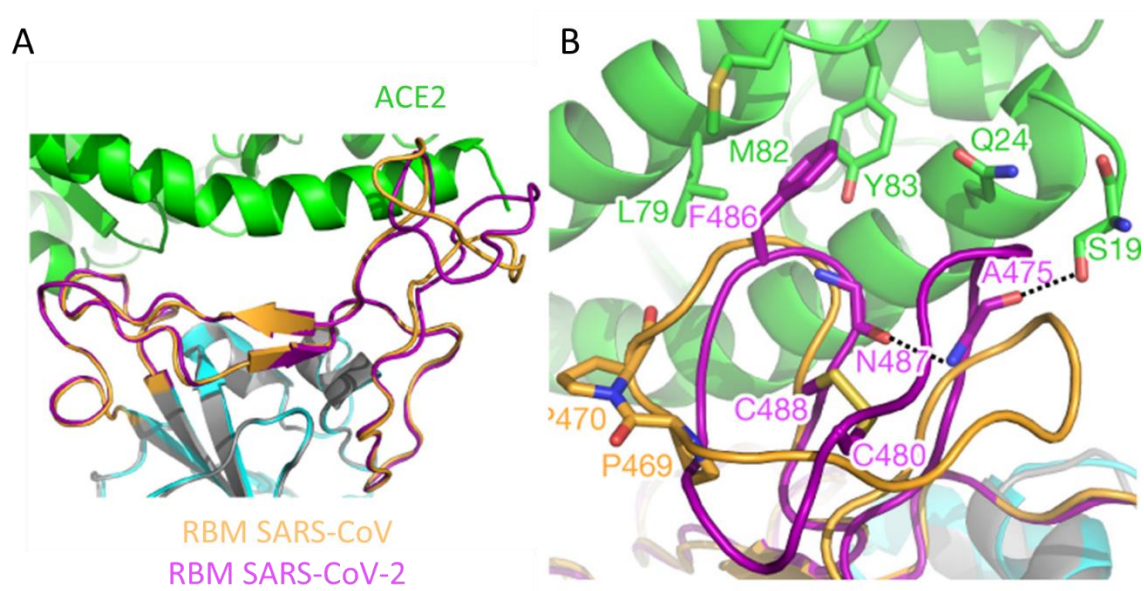


Рисунок 1.4. А. Сравнение конформаций гребня в RBM SARS-CoV-2 (пурпурный) и RBM SARS-CoV (оранжевый). В. Сравнение конформаций гребня под другим углом зрения. Изображение адаптировано из публикации [22].

Одной из ключевых аминокислотных замен в RBD является Lys417 в SARS-CoV-2 (Val404 SARS-CoV), которая образует стабильный солевой мостик с Asp30 ACE2. Этот остаток создает положительно заряженный участок на RBD SARS-CoV-2, который отсутствует в SARS-CoV, где вместо лизина находится валин. Это различие может способствовать более сильному взаимодействию SARS-CoV-2 с ACE2 [22].

Другой важной заменой в SARS-CoV-2 является Phe486 (Leu472 в SARS-CoV), который образует дополнительные взаимодействия с различными аминокислотными остатками ACE2.

1.2.3. N-концевой домен

Структуру NTD гликопротеина S SARS-CoV-2 можно разделить на верхнюю, основную и нижнюю области. Основная структура представлена антипараллельной β -сэндвичевой складкой, состоящей из шестицепочечного и семицепочечного β -слоев. Верхняя область включает две антипараллельные β -нити, соединенные короткой петлей, тогда как нижняя область в основном образована двумя короткими β -слоями и одной α -спиралью. Структура NTD содержит восемь сайтов N-гликозилирования и демонстрирует высокую степень сходства с NTD белка S MERS-CoV [18].

Структура NTD S белка SARS-CoV-2 (и других β -коронавирусов) имеет область, получившую название «галектиновая складка» из-за её высокой структурной гомологии с галектином-3 (Gal-3) человека (рис. 1.5).

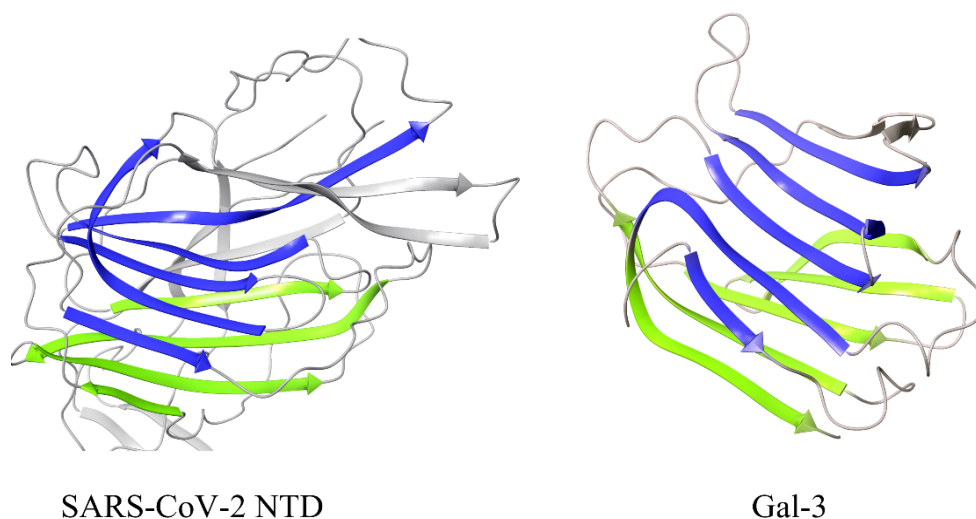


Рисунок 1.5. Структура NTD-домена поверхностного белка S SARS-CoV-2 и Gal-3 человека.

Gal-3 является сахар-связывающим белком, способным активировать провоспалительный транскрипционный фактор NF- κ B, что приводит к усиленной продукции провоспалительных цитокинов, таких как IL-6 и TNF- α [28]. На этом основании предполагается, что NTD S белка SARS-CoV-2 может действовать как Gal-3, что может частично объяснить неконтролируемое гипервоспаление или синдром высвобождения цитокинов, наблюдаемые при COVID-19.

Плоская поверхность NTD способна связывать сиаловые кислоты, а также взаимодействовать с сиалопротеинами, гликопротеинами и ганглиозидами, содержащими домены сиаловой кислоты, покрытые преимущественно остатками N-ацетилнейраминовой кислоты (Neu5Ac). Сиаловые кислоты, связанные с гликопротеинами и ганглиозидами, имеют высокую представленность на эпителиальных клетках, в том числе в легких и в полости рта, и часто используются в качестве рецепторов и/или факторов прикрепления для вирусных патогенов, инфицирующих легкие. Ключевые аминокислотные остатки в NTD S белка, участвующие в связывании сиаловых кислот, включают D111, S112, K113, Q134, F135, C136, N137, F140, G142, E156, F157, R158, Y160, S161 и S162. Особое значение имеет "триада QFN" (Q134, F135, N137), непосредственно взаимодействующая с сиаловокислыми доменами ганглиозидов [29].

Эволюционной особенностью SARS-CoV-2 стало «приобретение» NTD специфического мотива 72-GTNGTKR-78, участвующего в распознавании сахаросодержащих рецепторов. Подобный мотив был обнаружен в структурных белках других вирусов и бактерий, включая VP1 вируса Менго, S вируса гепатита мышей, TSP бактериофага CB120A, фолилполиглютаматсинтетазы *Lactobacillus casei* и др. [30].

Способность NTD связывать сиаловые кислоты лежит в основе широко обсуждаемой модели двухэтапного прикрепления SARS-CoV-2 к клетке-хозяину: на первом этапе NTD обеспечивает быстрое, но низкоаффинное начальное прикрепление за счёт взаимодействия с обильно представленными сиалосодержащими гликановыми структурами на поверхности эпителиальных клеток (в том числе дыхательных путей и полости рта); на втором этапе происходит высокоаффинное связывание RBD с ACE2. Такая последовательность значительно повышает эффективность поиска рецептора и общее сродство вируса к клетке. Кроме того, взаимодействие с сиаловыми кислотами может способствовать так называемому «вирусному сёрфингу» — перемещению вириона по поверхности клетки к месту, где плотность ACE2 выше [29]. Наконец, С-типовые лектины DC-SIGN и L-SIGN, экспрессируемые на дендритных клетках и макрофагах, также способны связываться именно с NTD и выступать в качестве альтернативных или вспомогательных рецепторов проникновения [31].

По сравнению с RBD, NTD является менее иммуногенным и реже индуцирует выработку высокоаффинных моноклональных антител (mAb), имеющих нейтрализующую активность. Однако кристаллические структуры комплексов NTD с нейтрализующими антителами (4-18, 5-24, 2-17, 4-8) были успешно получены. Связывание mAb с NTD предотвращает конформационные изменения в S белке, блокируя слияние мембран и проникновение вируса в клетку [32].

1.2.4. С-концевой домен

С-концевые домены (CTD1 и CTD2) субъединицы S1 SARS-CoV-2 состоят преимущественно из β -структур. CTD1 содержит два антипараллельных β -листа, один из которых состоит из двух цепей, а другой — из четырёх. RBD топологически вставлен в CTD1 и располагается между его N- и С-концевыми β -нитеями. В свою очередь, CTD1 интегрирован в структуру CTD2, образуя непрерывную β -нить (остатки 306–330), которая соединяет NTD и RBD [18].

Домен CTD1, расположенный под RBD, играет ключевую роль в конформационных изменениях S белка. При переходе RBD в «открытое» состояние (доступное для связывания с рецептором ACE2) CTD1 вращается вместе с RBD. Этот процесс стабилизируется структурным элементом в субъединице S2, известным как «проксимальная область пептида слияния» (FPPR). FPPR примыкает к противоположной стороне CTD1 относительно RBD и взаимодействует с другими частями S2, помогая фиксировать RBD в закрытой конформации S. Таким образом, CTD1 действует как структурное реле, передавая изменения между RBD и FPPR, которые расположены по обе стороны от него [33].

Домен CTD2 образован двумя сложенными β -слоями, каждый из которых содержит четыре нити. Дополнительная β -нить в одном из слоев формируется за счёт соединительной петли между NTD и RBD. В другом слое межнитевая петля содержит сайт расщепления фурином на границе субъединиц S1 и S2, а также включает N-концевой сегмент S2. Важным структурным элементом CTD2 является «петля 630». В поверхностном белке S штамм Wuhan-Hu-1 эта петля остается в значительной степени неупорядоченной. Однако при наличии мутации D614G петля становится упорядоченной и играет ключевую роль в стабилизации тримера S. Мутация D614G в S, ставшая доминирующей в начале пандемии COVID-19, нарушает водородную связь между Asp614 и Thr859, что приводит к перестройке взаимодействий внутри CTD2 [34]. Дестабилизация взаимодействия S1–S2 вследствие мутации D614G запускает перемещение доменов S1 от оси S-тримера и переход RBD в открытую конформацию, что, вероятно, приводит к увеличению связывания ACE2 и повышению вирусной инфекционности [35], [36].

Домен CTD вместе с FPPR и «петлей 630» являются ключевыми компонентами механизма слияния мембран. FPPR и «петля 630» помогают удерживать RBD в конформации «вниз», но высвобождаются, когда соседний RBD переходит в конформацию «вверх». Таким образом, CTD1 и CTD2 модулируют фузогенные структурные перестройки S белка, необходимые для слияния вирусной и клеточной мембран.

1.2.5. S2 субъединица

В конформации до слияния три субъединицы S2 плотно упакованы вокруг центральной трёхцепочечной суперспирали длиной ~ 140 Å, образованной центральным доменом СН. Гептадный повтор 1 HR1 и прилегающий сегмент 758–784 формируют протяженные α -спирали, которые вместе с СН собираются в жёсткий девятиспиральный пучок — наиболее стабильную часть всего тримера S. Пептид слияния (FP) в этой конформации свернут в короткую спираль и спрятан в гидрофобном кармане, образованном двумя соседними протомерами.

В конформации после слияния происходит радикальная перестройка S2. Сегменты HR1 и СН формируют единую непрерывную α -спираль длиной ~ 180 Å; три такие спирали формируют длинную центральную трёхцепочечную суперспиральный пучок. Три HR2 сворачиваются в α -спирали и антипараллельно упаковываются в гидрофобные канавки между спиралями HR1–СН, образуя шестиспиральный пучок (6-НВ) - термодинамически наиболее стабильное состояние S2 [37] (рис. 1.6).

Общая конформация 6-НВ является важным и консервативным компонентом для коронавирусов. Гомология последовательности HR1 SARS-CoV и SARS-CoV-2 составляет

92,6%, а HR2 - 100%. Внутри области ядра слияния домена HR1 SARS-CoV-2 было обнаружено 8 уникальных аминокислот, которые могут способствовать усилению взаимодействий между HR1 и HR2 и стабилизировать конформацию 6-НВ SARS-CoV-2. Например, Ser929, Arg933, Asp936, Ser943 и Lys947 формируют новые водородные связи и солевые мостики [38].

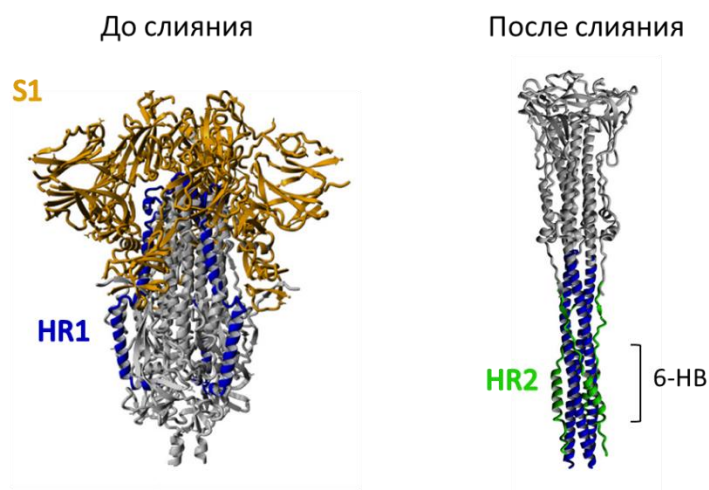


Рисунок 1.6. Структуры S белка в конформации до и после слияния.

Хотя области HR не являются основными антигенными мишенями, они содержат эпитопы, способные индуцировать выработку нейтрализующих антител. Эти антитела могут блокировать формирование 6-НВ, предотвращая слияние мембран. Структура HR является одной из привлекательных мишеней для разработки ингибиторов слияния/входа вируса.

1.2.6. Конформационная перестройка поверхностного белка при проникновении вируса в клетку

Проникновение коронавируса в клетки хозяина является важным фактором, влияющим на инфекционность вируса и патогенез вызываемого им заболевания. Поверхностный белок S коронавируса относится к I классу вирусных белков слияния мембран. Этот класс также включает белки вируса гриппа, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), Эболавирус и др. Характерной особенностью данного класса является то, что для слияния мембран необходимо изменение pH, связывание с рецептором или воздействие протеаз, которые запускают конформационные изменения гликопротеина [39].

Начальным этапом проникновения SARS-CoV-2 является связывание белка S с рецептором ACE2 на поверхности клетки хозяина. RBD может принимать различные конформационные состояния: «вниз» и «вверх» (рис. 1.7). При положении RBD «вниз» S принимает закрытую конформацию, в которой поверхность RBD субъединицы S1 скрыта на границе между протомерами и не доступна для рецептора. Тример белка S с одним RBD

в положении «вверх» принимает частично открытую конформацию и становится доступным для связывания с рецептором (рис. 1.7). Три RBD внутри белка S не синхронизированы, поэтому возможны асимметричные взаимодействия с рецептором. Недавнее исследование показало, что связывание ACE2 с открытым RBD может способствовать конформационному переходу других закрытых RBD, делая их доступными для связывания с рецептором. Таким образом, тример S может связываться с 1–3 копиями ACE2 в зависимости от конформации каждого отдельного RBD [40].

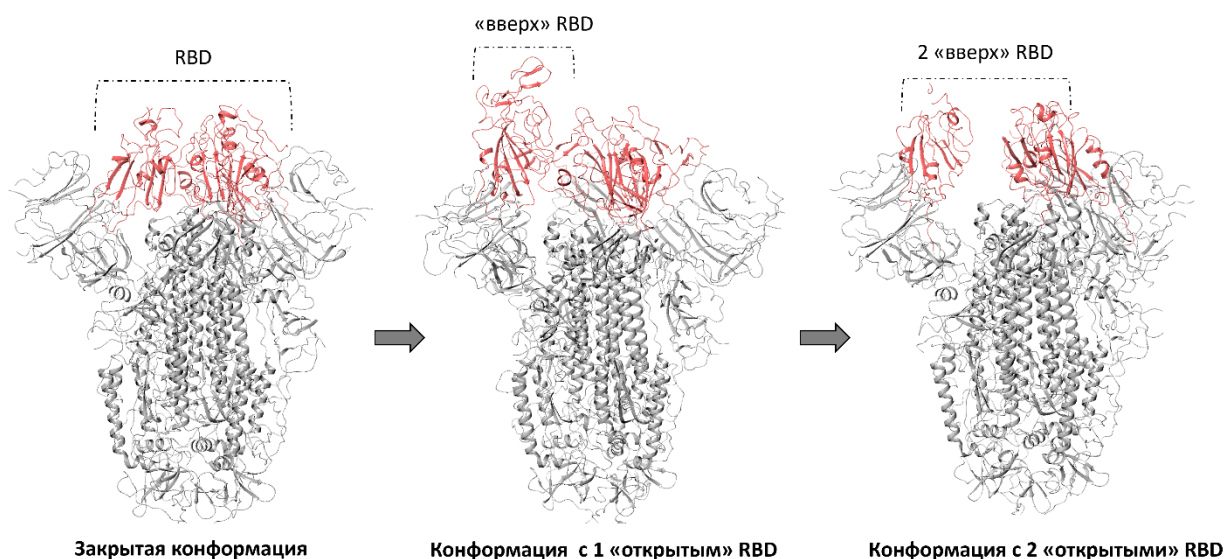


Рисунок 1.7. Открытая и закрытая конформация S SARS-CoV-2

Помимо ACE2, для проникновения SARS-CoV-2 в клетки хозяина были идентифицированы и другие рецепторы, включая CD147, гепарансульфат, рецепторы лектина С-типа (такие как DC-SIGN, L-SIGN, MR и MG), а также нейропилин-1. Нейропилин-1 относится к семейству сигнальных и каталитических белков, взаимодействует с остатками RRAR (а.о. 682–685) только после того, как С-конец белка S1 SARS-CoV-2 подвергается расщеплению протеазой. Поэтому нейропилин-1 служит «постпротеолитическим рецептором» для прикрепления вируса к поверхности клеток-хозяев [41]. В то время как CD147 действует как альтернативный рецептор для SARS-CoV-2 в клетках с дефицитом ACE2. Клеточный гепарансульфат необходим для эффективной ACE2-зависимой инфекции SARS-CoV-2, поскольку гепарин значительно усиливает открытую конформацию RBD SARS-CoV-2 для связывания ACE2 [42].

Связывание RBD с ACE2 инициирует аллостерические конформационные изменения в N-концевой области субъединицы S2, обнажая сайт расщепления S2' и делая его доступным для протеаз (рис. 1.8). Протеолитический процессинг SARS-CoV-2 в клетках человека связан с распознаванием фуринового сайта 682-RRAR-685, известного как сайт расщепления S1/S2. Фурин, трансмембранный белок I типа, принадлежит к семейству

межклеточных Ca^{2+} -зависимых сериновых эндопептидаз и также известен как пропротеиновая конвертаза. Фурин повсеместно экспрессируется в клетках различных органов и тканей человека, включая легкие, желудочно-кишечный тракт, центральную нервную систему и репродуктивные ткани. Сайт расщепления RRAR также был обнаружен в других коронавирусах, таких как MERS-CoV и OC43, но отсутствует в SARS-CoV. Протеолитическое расщепление белка S фурином приводит к отделению N-концевой субъединицы S1, которая взаимодействует с ACE2, от закрепленной на мембране С-концевой субъединицы S2, отвечающей за проникновение вируса в клетку-хозяина [43].

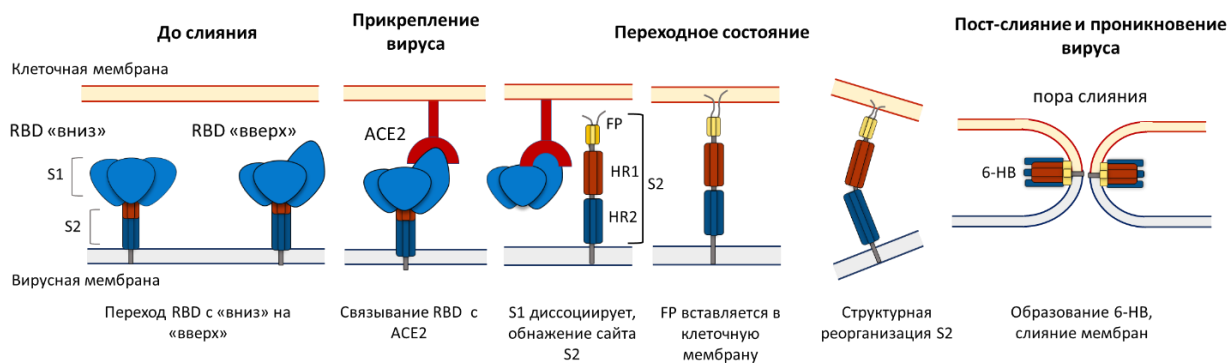


Рисунок 1.8. Схема проникновения SARS-CoV-2 в клетки хозяина. Конформационный переход RBD в «вверх» позволяет взаимодействовать с рецептором ACE2; белок S, расщепленный протеазами, образует субъединицы S1 и S2; субъединица S1 диссоциирует, сайт S2' обнажается и расщепляется TMPRSS2, после чего следует вставка FP в мембрану клетки-хозяина и образование шестиспирального пучка HR1-HR2 (6-НВ). Впоследствии происходит слияние мембран между вирусными частицами и клетками-хозяина.

После расщепления в области S1/S2 сайт S2' также должен быть расщеплен для полной активации процесса слияния. Это может происходить либо под действием TMPRSS2 на поверхности клетки, либо лизосомальных катепсинов в эндосомах. TMPRSS2 — это трансмембранный белок II типа с активностью сериновой протеазы, основная физиологическая роль которого до конца не изучена. Однако хорошо известно его значение в развитии респираторных вирусных инфекций, включая вирусы гриппа и коронавирусы. Хотя SARS-CoV-2 предпочтительно активируется TMPRSS2, расщепление сайта S2' также может быть опосредовано катепсинами, особенно катепсином L. Если клетки-мишени экспрессируют недостаточно TMPRSS2 или если комплекс вирус-ACE2 не сталкивается с TMPRSS2, вирус интернализуется посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза в поздние эндосомы/лизосомы, где сайт S2' расщепляется катепсинами [33].

Активация домена слияния запускает значительную конформационную перестройку субъединицы S2. Гептадные повторы HR1 и HR2, расположенные в S2, формируют 6-спиральный пучок (6-НВ). Формирование 6-НВ приводит к слиянию вирусной и клеточной мембран. Это происходит благодаря тому, что N-концевой пептид слияния (FP)

встраивается в клеточную мембрану, а домен слияния обеспечивает сближение мембран. В результате содержимое вирусной частицы высвобождается в цитоплазму клетки-хозяина.

Таким образом, процесс проникновения SARS-CoV-2 в клетки представляет собой сложную последовательность молекулярных взаимодействий, включающую связывание с рецепторами, конформационные изменения белка S, протеолитическое расщепление и слияние мембран. Понимание механизмов этих процессов создаёт основу для рационального дизайна противовирусных препаратов, направленных на блокирование ключевых этапов вирусной инфекции.

1.3. Мишени для разработки противовирусных препаратов против коронавирусов

Разработка противовирусных препаратов традиционно основывается на поиске уязвимых стадий жизненного цикла вируса и определении белковых мишеней, вовлечённых в ключевые процессы репликации (рис. 1.9). Для коронавирусов, включая SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2, стратегии создания лекарственных средств сфокусированы на нескольких ключевых направлениях [44].

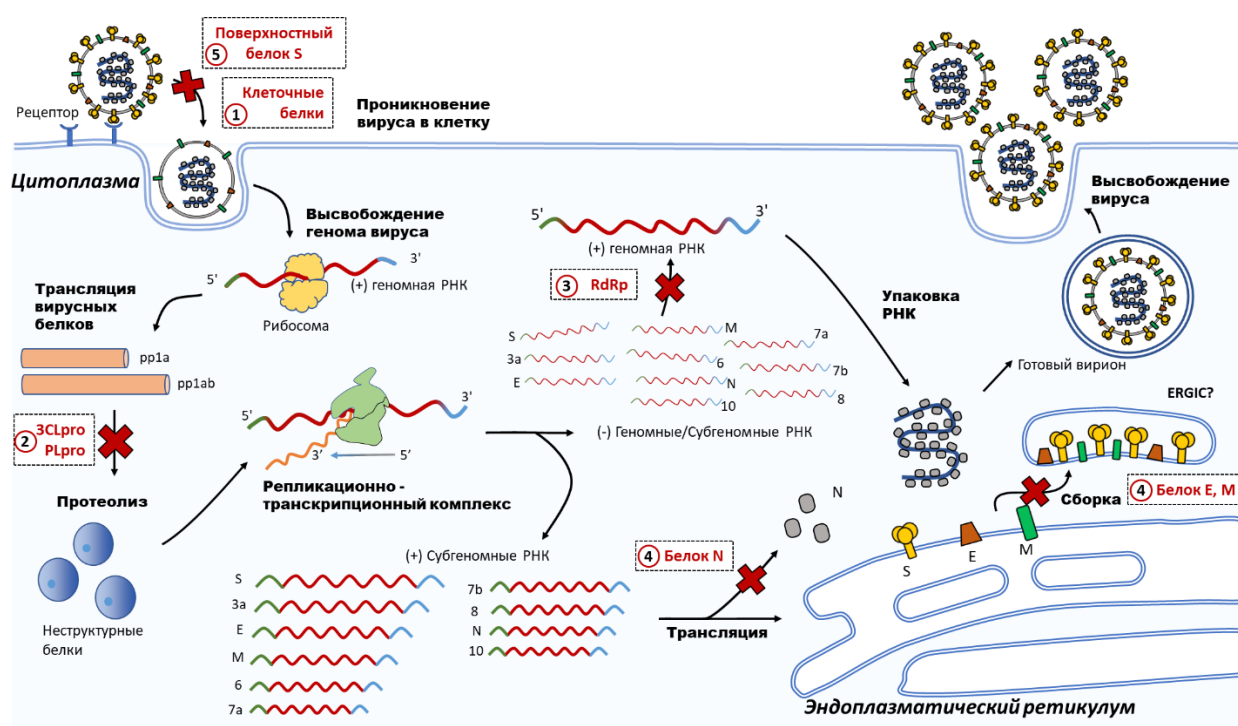


Рисунок 1.9. Жизненный цикл коронавируса. Частицы вируса связываются с рецептором ACE2. Клеточная сериновая протеаза TMPRSS2 участвует в протеолитической активации S-белка, что обеспечивает слияние вирусной и плазматической мембран. При эндосомальном пути проникновения слияние происходит с мембраной эндосомы после активации S-белка эндосомальными протеазами. После проникновения геномная (+)-РНК декапсидируется и сразу транслируется по ORF1a/b. Образующиеся полипротеины pp1a и pp1ab процессируются в 16 неструктурных белков (nsp), формирующих репликационно-транскрипционный комплекс. Этот комплекс синтезирует комплементарную антигеномную (-)-РНК, служащую матрицей для

репликации полноразмерной геномной (+)-РНК и транскрипции набора субгеномных (+)-РНК. Весь этот процесс происходит в цитоплазме клетки. Структурные белки синтезируются на рибосомах и поступают в эндоплазматический ретикулум, где начинается первоначальный этап сборки новых вирусных частиц. Оболочка будущего вируса формируется за счет мембраны эндоплазматического ретикулума. Вирусная частица перемещается на поверхность клетки через систему клеточного везикулярного транспорта, в которой участвует аппарат Гольджи. Вирусная частица покидает клетку путём экзоцитоза, заключенная в везикулу, не вызывая немедленной гибели клетки [6], [45]. Ключевые этапы, ингибируемые соединениями, которые в настоящее время проходят валидацию и представляют собой привлекательные противовирусные мишени, выделены красным цветом.

1.3.1. Клеточные факторы хозяина, необходимые для репликации вируса

Одной из стратегий для разработки терапевтических препаратов является ингибирование клеточных факторов (рис. 1.9(1)), которые вирус использует для своего жизненного цикла. К ним относятся протеазы хозяина (например, TMPRSS2), обеспечивающие активацию S-белка, эндоцитарные механизмы проникновения, липидный метаболизм и сигнальные пути клетки [46]. Такой подход снижает риск быстрой резистентности и может обеспечивать более широкий спектр противовирусного действия, однако его ограничивает потенциальная токсичность вследствие вмешательства в ключевые процессы хозяина. Например, препарат «Маравирок» является антагонистом рецепторов CCR5 и препятствует проникновению ВИЧ в клетку, демонстрируя успешное применение стратегии ингибирования факторов хозяина.

1.3.2. Вирусные протеазы

Ключевыми ферментами коронавирусов являются две вирус-специфичные протеазы: папаиноподобная (PLpro, неструктурный белок nsр3) и химотрипсиноподобная основная (3CLpro или Mpro, nsр5) [47]. Они осуществляют критически важный процессинг полипротеинов pp1a и pp1ab, высвобождая функциональные неструктурные белки (nsр4-nsр16), необходимые для формирования репликационно-транскрипционного комплекса [48]. Ингибирование вирусных протеаз (рис. 1.9 (2)) является проверенной терапевтической стратегией: успешное применение ингибиторов протеаз при ВИЧ (ритонавир и саквинавир) и при вирусе гепатита С (телапревир, боцепревир и др.) продемонстрировало их клиническую эффективность [49], [50]. Наиболее известным ингибитором Mpro является нирматрелвир (компонент препарата «Паксловид»), одобренный FDA для лечения COVID-19 в 2021 году [51]. Для протеазы PLpro был найден перспективный ингибитор GRL-0617, однако он пока не прошел клинические испытания [52].

1.3.3. РНК-зависимая РНК-полимераза и вспомогательные ферменты

РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp) представляет собой перспективную мишень (рис. 1.9(3)) для разработки противовирусных препаратов благодаря ключевой роли в репликации вируса и отсутствию аналогичного фермента в клетках хозяина. RdRp отличается высокой консервативностью структуры и функций даже среди различных РНК-вирусов. Нуклеозидные аналоги (ремдесивир, фавипиравир, молнупиравир) являются основными ингибиторами RdRp и широко применяются в противовирусной терапии [53].

Вирусу SARS-CoV-2 для активности RdRp (nsp12) необходим комплекс с кофакторами nsp7 и nsp8, обеспечивающий процессивное удлинение цепи РНК. В состав репликационно-транскрипционного комплекса также входят экзонуклеаза (nsp4–nsp10), хеликаза (nsp13), уридилат-специфичная эндорибонуклеаза (nsp15) и метилтрансферазы (nsp14, nsp12–nsp16), участвующие в копировании вирусной РНК [54]. Взаимодействие RdRp с этими вспомогательными белками повышает точность и процессивность репликации SARS-CoV-2 и одновременно обеспечивает устойчивость вируса к некоторым нуклеозидным аналогам, включая рибавирин [55]. Ремдесивир стал первым препаратом, одобренным FDA для лечения пациентов с COVID-19, затем были одобрены молнупиравир и фавипиравир [56]. Кроме того, вспомогательные белки репликационного комплекса (nsp13, nsp14, nsp15, nsp16 и другие) рассматриваются как потенциальные мишени для разработки новых противовирусных препаратов, однако пока не найдено эффективных ингибиторов или одобренных препаратов для этих ферментов [57].

1.3.4. Структурные белки М, Е и N

Нарушение сборки и выхода вирионов через воздействие на структурные белки (М, Е, N) представляет собой менее изученную, но перспективную стратегию (рис. 1.9(4)). Белок Е, выступающий в роли ионного канала (виropорина), структурно и функционально схож с белком М2 вируса гриппа. Это открывает возможность для разработки ингибиторов по аналогии с амантадином, где подавление активности или нарушение правильной укладки белка Е способно блокировать формирование зрелых вирусных частиц. Другой ключевой мишенью является белок М, играющий центральную роль в сборке вириона. В ходе недавних исследований были идентифицированы низкомолекулярные соединения JNJ-9676 и CIM-834, специфически связывающиеся с белком М и блокирующие его функцию в сборке вирусных частиц [58], [59].

1.3.5. Поверхностный белок S

Одним из ключевых направлений разработки противовирусных препаратов является воздействие на поверхностный белок вируса, ответственный за взаимодействие с клеткой хозяина (рис.1.9(5)). Ингибирование S белка препятствует прикреплению вирусной частицы к клетке, слиянию мембран и проникновению вирусной РНК, блокируя инфекцию на ранних этапах. Такой подход обладает рядом преимуществ: снижает риск быстрого развития резистентности вируса, дает возможность профилактического вмешательства и может эффективно сочетаться с другими терапевтическими стратегиями, усиливая общий противовирусный эффект [46].

1.4. Подходы к поиску ингибиторов поверхностных белков вирусов

Поиск ингибиторов проникновения вируса представляет собой сложную методологическую задачу, обусловленную целым рядом факторов: недостаточной изученностью молекулярных взаимодействий вирусных белков с клеточными рецепторами, ограниченностью структурной информации и трудностями детекции процессов проникновения. В связи с этим активно развиваются и совершенствуются различные методы, включая биофизические, биохимические, клеточные и вычислительные. Сочетание этих методов позволяет более эффективно выявлять перспективные соединения, способные блокировать раннюю стадию вирусной инфекции, что особенно важно для разработки новых противовирусных препаратов.

1.4.1. Вычислительный метод

С развитием информационных технологий и вычислительных ресурсов появились новые возможности для поиска и разработки лекарственных агентов. Виртуальный скрининг представляет собой удобный и быстрый метод предсказания свойств соединений. Он всё чаще применяется для поиска новых свойств у химических структур в обширных химических библиотеках [60].

В настоящее время выделяют два основных подхода виртуального скрининга (рис.1.10):

Структурно-ориентированный дизайн — основан на экспериментально определённой 3D-структуре макромолекулярной биологической мишени;

Лиганд-ориентированный скрининг — использует набор лигандов, предположительно связывающихся с одной и той же мишенью.

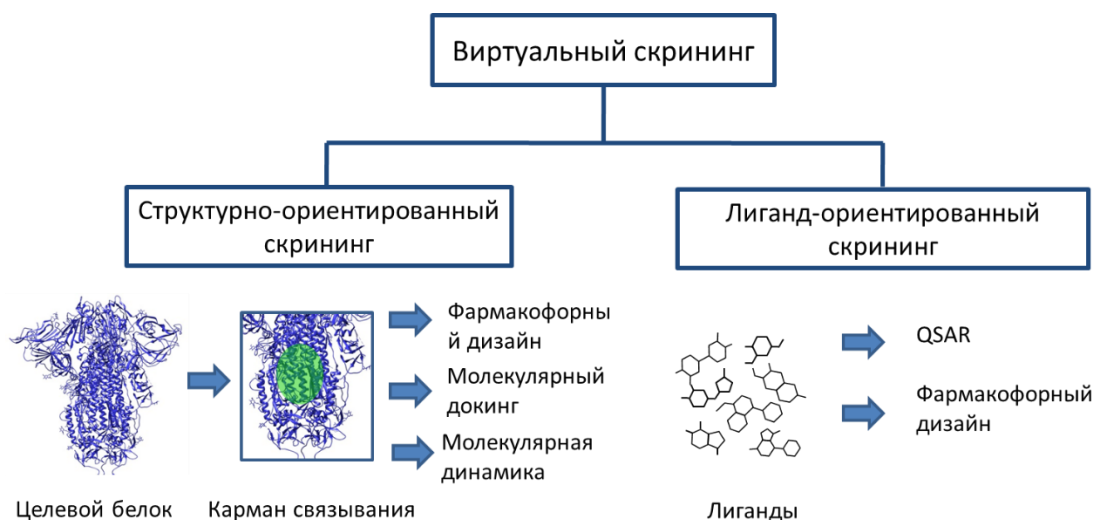


Рисунок 1.10. Схема виртуального скрининга: структурно- и лигандо- ориентированный подходы

Структурно-ориентированный скрининг является предпочтительным методом, когда трехмерная структура биологической мишени получена с помощью биофизических методов (рентгеновская кристаллография, ЯМР-спектроскопия, крио-ЭМ) или предсказанных моделей (например, AlphaFold). На основе этих данных определяются потенциальные сайты связывания, после чего с применением методов молекулярного докинга и последующей молекулярной динамики проводится виртуальный отбор соединений с высокой аффинностью к целевому белку. [61]. К основным преимуществам скрининга относятся сокращение времени, стоимости скрининга больших библиотек и широкий набор инструментов и алгоритмов для его реализации. Основные ограничения связаны с трудностями точного предсказания конформации связывания и возможностью ложных результатов из-за несовершенства современных силовых полей и алгоритмов [62].

Лиганд-ориентированный скрининг применяется при ограниченной информации о структуре мишени или при наличии большого объема экспериментальных данных о лигандах. Метод основан на принципе того, что структурно сходные лиганды могут проявлять аналогичную биологическую активность. Использование виртуальных библиотек соединений повышает вероятность выявления новых биологически активных молекул. Для реализации подхода применяются фармакофорное моделирование, количественный анализ «структура–активность» (QSAR), алгоритмы машинного обучения и другие методы [63].

Оба подхода дополняют друг друга и часто используются совместно в стратегиях компьютерного дизайна лекарств, позволяя не только идентифицировать новые активные соединения, но и оптимизировать их фармакологические свойства. Развитие вычислительных методов и увеличение доступных структурных данных продолжают

расширять возможности виртуального скрининга, делая его неотъемлемой частью современной фармакологии [64].

1.4.2. Иммунохимические методы

Иммунохимические методы *in vitro* позволяют изучать взаимодействие потенциальных ингибиторов с изолированными вирусными белками или их фрагментами без использования живых клеток или вирусов. Эти подходы часто применяются на ранних этапах скрининга для быстрой оценки большого количества соединений. Ключевыми методами являются ферментные анализы, такие как ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) для выявления взаимодействия белок-лиганд, и флуоресцентные методы, включая FRET (Förster resonance energy transfer) для мониторинга конформационных изменений белков при связывании ингибиторов.

Например, в ELISA вирусный поверхностный белок (например, S белок SARS-CoV-2) иммобилизуют на поверхности планшета, добавляют потенциальный ингибитор и затем клеточный рецептор (например, ACE2). Связывание детектируется с помощью меченых антител, что позволяет количественно оценить ингибирующую активность [78]. FRET-анализы используют флуоресцентные метки на белке и лиганде для измерения расстояния между ними, что помогает выявлять ингибиторы, нарушающие ключевые взаимодействия [79].

Преимущества этих методов — высокая пропускная способность, отсутствие необходимости в соблюдении требований биобезопасности при проведении этих работ в лаборатории. Однако они не учитывают клеточное окружение, поэтому требуют дальнейшей валидации результата в более сложных системах. Эти подходы часто комбинируют с *in silico* методами для предварительного отбора кандидатов.

1.4.3. Суррогатные системы

Одним из широко используемых эффективных и безопасных вирусологических инструментов являются псевдотипированные вирусы (псевдовирус, псевдовирусные частицы). Псевдовирусы представляют собой дефектные непатогенные вирусные частицы, экспонирующие на своей поверхности гомологичные и гетерологичные вирусные поверхностные белки, представляющие интерес для исследования. Такие частицы могут проникать в клетку и имитировать начальные стадии инфекции, но не могут завершить полный цикл репликации для производства новых инфекционных частиц [65].

Среди наиболее часто используемых платформ для псевдотипирования оболочки — вирус везикулярного стоматита (VSV), вирус иммунодефицита человека-1 (HIV-1) и вирус

лейкемии мышей (MLV) (рис 1.10) [66]. В состав псевдовирусных частиц часто включают репортёрный ген (например, GFP, люциферазу или β -галактозидазу) для количественной оценки уровня инфекции.

Наиболее широко используемой системой псевдотипирования является система на основе HIV-1 (рис. 1.11 А). В самом простом виде она включает плазмиду, кодирующую дефектный геном вируса. Для предотвращения возможной рекомбинации и восстановления инфекционного вируса его модифицируют, удаляя гены, кодирующие оболочечный белок. В зависимости от количества используемых ДНК-плазмидных конструкций существуют двух-, трех- и четырехплазмидные системы. Наиболее распространённой является трёхплазмидная система, состоящая из:

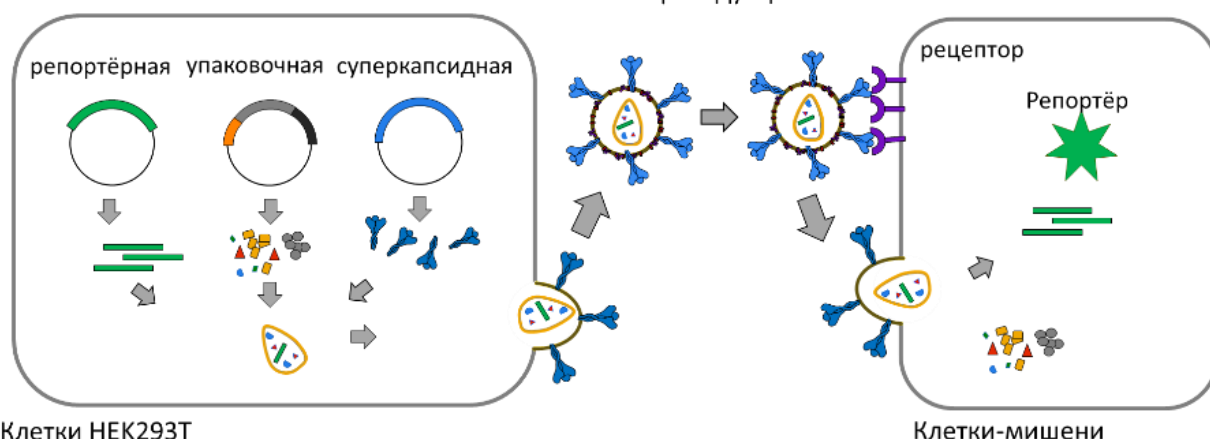
- упаковочной плазмиды (например, psPX2) содержит гены *Gag* и *Pol*;
- репортёрной плазмиды (например, pLenti-GFP) содержит цис-регуляторные элементы, необходимые для обратной транскрипции, интеграции и упаковки ВИЧ, а также ген репортера;
- суперкапсидной (экспрессионной) плазмиды с геном поверхностного белка интересующего вируса.

Такая архитектура обеспечивает высокую эффективность сборки псевдовирусов и их безопасность при работе в условиях BSL-2.

Система на основе вируса везикулярного стоматита (VSV) также получила широкое распространение (рис. 1.11 В). Оболочечный РНК-содержащий вирус, VSV обладает уникальной способностью включать в свою оболочку различные гетерологичные гликопротеины. Для получения псевдовирусов используют рекомбинантный VSV, в котором ген поверхностного белка заменен на репортёрный (rVSV-ΔG). Синтез целевого поверхностного белка в клетках происходит за счет плазмидного вектора, содержащего соответствующий ген, перед заражением рекомбинантным вирусом rVSV-ΔG.

А Лентивирусная

Трансфекция



В Рабдовирусная

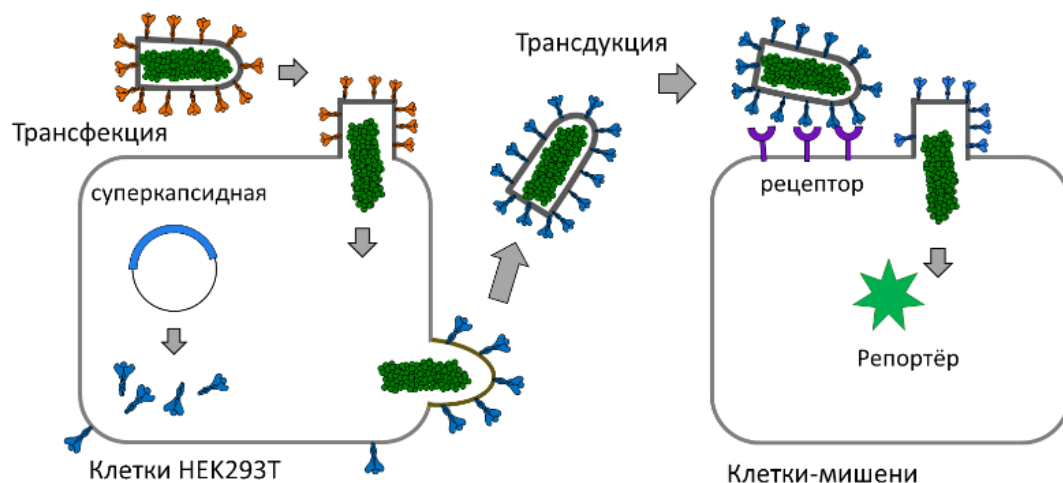


Рисунок 1.11. Схема получения псевдовиральных частиц. **А:** Лентивирусная система (ВИЧ-1). Клетки HEK293T котрансфицируют упаковочной (серо-оранжевая), репортёрной (зелёная) и суперкапсидной (синяя) плазмидами. Образуются вирусные коровые частицы с репортерным геном. В процессе почкования коровые частицы приобретают липидную оболочку с гетерологичными гликопротеинами и секретируются в культуральную среду в виде псевдовиральных частиц. **В:** Рабдовирусная система. Клетки HEK293T трансфицированы суперкапсидной плазмидой. Через 20-24 часа клетки добавляют рекомбинантный вирус rVSV-ΔG, кодирующий люциферазу светлячка или GFP. В процессе почкования коровые частицы приобретают липидную оболочку с гетерологичными гликопротеинами и секретируются в культуральную среду в виде псевдовиральных частиц.

Псевдовиральные частицы могут быть использованы для трансдукции клеток-мишеней. Для этого к клеткам-мишеням добавляют псевдовиральные частицы, если частица проникает в клетку, то происходит синтез люциферазы.

Особую ценность псевдовиралы представляют для работы с высокопатогенными агентами (SARS-CoV-2, Эболавир, Марбургвирус, вирус Ласса и др.), позволяя проводить исследования в условиях лабораторий BSL-2. Псевдовиральные системы нашли широкое применение для решения различных вирусологических задач, таких как, поиск ингибиторов проникновения путем скрининга библиотек соединений, оценки

нейтрализующей активности антител, вызванных вакцинацией или вирусной инфекцией и др.

1.4.4. Вирусологические методы

Среди различных методологических подходов, применяемых для идентификации ингибиторов проникновения вирусов, особое значение представляют исследования с использованием патогенного (живого, репликативно-компетентного) вируса. Такие анализы обеспечивают высокую биологическую релевантность и позволяют наиболее достоверно оценивать эффективность потенциальных противовирусных соединений в условиях, максимально приближенных к реальной вирусной инфекции.

Работа с высокопатогенными вирусами требует соблюдения строгих мер биобезопасности. В зависимости от степени патогенности и трансмиссивности, вирусы относят к разным группам патогенности: так, коронавирусы относятся к патогенам II группы, а вирусы из семейств *Filoviridae* (например, Эболавирус) и *Arenaviridae* (например, вирус Ласса) - к I группе [67], [68]. Соответственно, эксперименты с использованием таких агентов могут проводиться исключительно в лабораториях с уровнем биологической безопасности BSL-3 или BSL-4.

Дополнительным ограничением является то, что не все вирусы могут эффективно реплицироваться в клеточных культурах. Так, например, вирус гепатита С (HCV) долгое время не удавалось культивировать *in vitro* до разработки штамма JFH-1 и применения клеточной линии Huh-7 [69]. Трудности при размножении встречаются при культивировании норовирусов, хантавирусов и некоторых арбовирусов, которые требуют либо использования первичных клеток, либо специальных клеточных культур (BJAB, ПТ-1 и др), либо остаются некультивируемыми, что делает невозможным проведение прямых функциональных анализов.

SARS-CoV-2 использует рецептор ACE2 и протеазу TMPRSS2 для входа в клетку. Для размножения вируса наиболее часто применяются клеточные линии Vero E6, Vero CCL-81, Calu-3, Caco-2 и их генетически модифицированные производные, экспрессирующие человеческие ACE2 и TMPRSS2.

Для оценки нейтрализующей активности соединений, включая ингибиторы проникновения, используются несколько типов анализов с использованием патогенного вируса [70]:

- метод нейтрализации с ингибированием бляшкообразования (PRNT, plaque reduction neutralization test);

- метод снижения числа фокусов нейтрализации (FRNT, focus reduction neutralization test);
- метод микронейтрализации (MN, microneutralization assay).

Анализ PRNT представляет собой классический метод количественной оценки инфекционности вируса, основанный на подсчете зон цитопатического эффекта (бляшек), формирующихся в монослое клеточной культуры [71]. Данный подход, широко применяемый в вирусологических исследованиях, характеризуется высокой воспроизводимостью результатов и не требует использования сложного оборудования или специализированных реагентов [72]. Однако метод обладает рядом существенных ограничений: результаты оценки зависят от субъективного восприятия исследователя при использовании ручного (неавтоматизированного) подсчета «бляшек», пропускная способность метода относительно невысока (традиционно используется 6-24-луночные планшеты), а время получения результатов может достигать 14 суток [73].

Анализ FRNT основан на схожем принципе PRNT, но визуализация инфицированных клеток осуществляется с использованием вирус-специфических антител. Основным его ограничением является необходимость наличия валидированных антител для конкретного вируса, однако метод может быть выполнен в формате 96-луночных планшетов, что повышает его масштабируемость [74].

В анализе MN инфекция количественно определяется с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания выбранного вирусного белка. Окрашенные планшеты визуализируются с помощью высококонтентного микроскопа, а изображения анализируются для расчёта уровня инфицирования по сравнению с контрольными образцами.

Эксперименты с патогенным вирусом позволяют учитывать вклад всех вирусных белков в процесс инфицирования, адекватно оценивать действие ингибиторов на начальных стадиях жизненного цикла вируса, а также выявлять побочные, синергетические эффекты на более поздних этапах репликации. В то же время проведение таких экспериментов сопряжено с рядом серьёзных ограничений: необходимость наличия специализированных лабораторий (боксы микробиологической безопасности II и III класса, системы фильтрации воздуха, автоклавы, шлюзовые системы и другого оборудования), участие высококвалифицированного персонала, прошедшего соответствующую подготовку. Эти требования существенно повышают стоимость и трудоёмкость исследований, а также ограничивают количество лабораторий, способных выполнять работу с живыми высокопатогенными вирусами.

1.4.5. Методы, подтверждающие взаимодействие лиганд-белок

Подтверждение прямого связывания низкомолекулярных соединений с вирусными поверхностными белками является ключевым этапом валидации потенциальных ингибиторов проникновения. В отличие от *in silico* моделирования и клеточных тест-систем, биофизические методы позволяют напрямую оценить наличие взаимодействия, его прочность и кинетические параметры. Среди них наибольшее распространение получили поверхностный плазмонный резонанс (SPR), биослойная интерферометрия (BLI), анализ теплового сдвига (DSF), а также методы флуоресцентной анизотропии и микрокалориметрии.

Поверхностный плазмонный резонанс

Поверхностный плазмонный резонанс (англ. Surface plasmon resonance (SPR)) представляет собой современный биофизический метод, позволяющий в режиме реального времени исследовать кинетику и аффинность молекулярных взаимодействий без необходимости использования меченых соединений [75] (рис. 1.12).

Метод основан на регистрации изменений показателя преломления света на поверхности сенсорного чипа, вызванных образованием комплексов между иммобилизованным лигандом и аналитом в растворе. Эти изменения модулируют параметры поверхностного плазмонного резонанса, что фиксируется высокочувствительным детектором, работающим по принципу рефрактометра [76], [77].

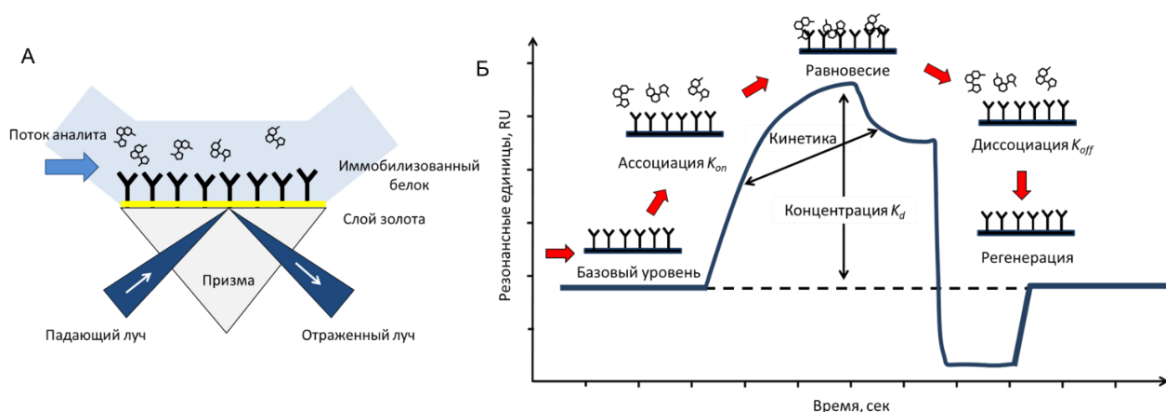


Рисунок 1.12. А Принципы SPR. Поляризованный свет направляется на датчик, где иммобилизованный лиганд захватывает аналит, который находится в свободном растворе. Связывание аналита приводит к изменению показателя преломления вблизи поверхности датчика, что позволяет отслеживать молекулярные взаимодействия в режиме реального времени. Б Сенсограмма. 1) базовая линия, 2) ассоциация, 3) равновесие, 4) диссоциация, 5) регенерация.

Основным преимуществом SPR является возможность определения констант ассоциации K_{on} и диссоциации K_{dis} , а также расчета константы равновесия K_d , что критически важно для полного кинетического и термодинамического анализа

молекулярных взаимодействий. SPR применим для анализа широкого спектра биологических молекул - от низкомолекулярных соединений до сложных белковых комплексов и вирусных частиц [78].

Биослойная интерферометрия

Биослойная интерферометрия (англ. biolayer interferometry, BLI) — это оптический биосенсорный метод, позволяющий анализировать молекулярные взаимодействия (например, белок–белок, белок–нуклеиновая кислота) в реальном времени без использования меток (рис. 1.13). Метод широко применяется для кинетического анализа, детекции аналитов и количественного измерения с использованием платформ средней и высокой пропускной способности [79].

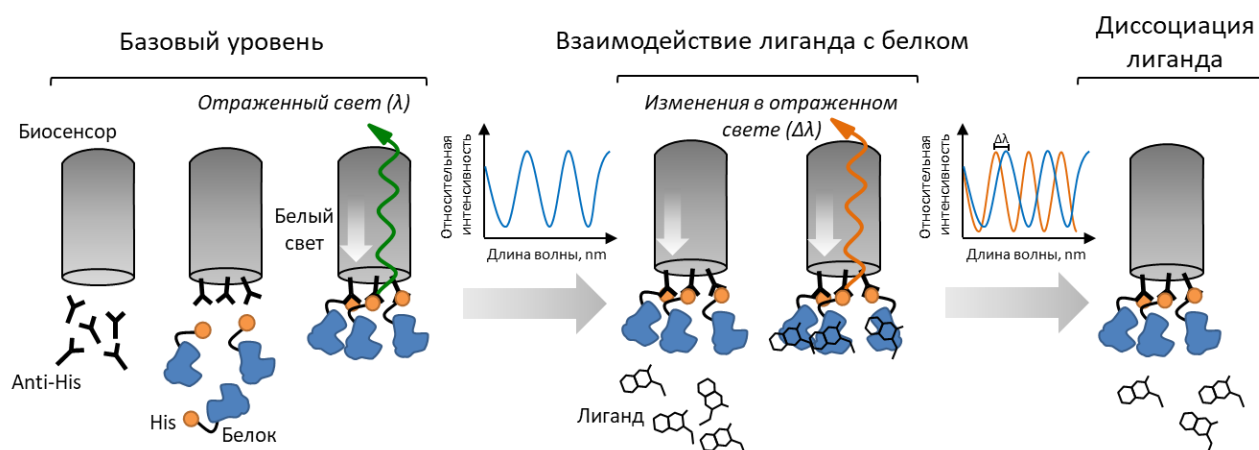


Рисунок 1.13. Принцип BLI. Эксперимент включает последовательные этапы: уравнивание — погружение кончика биосенсора в буфер для установления базовой линии; загрузка — иммобилизация лиганда (биотинилированного или His-меченого) на поверхности сенсора; ассоциация — погружение в раствор аналита с регистрацией увеличения толщины биослоя за счёт связывания; диссоциация — перенос в буфер без аналита с уменьшением сигнала. Интерференция отраженного белого света пропорциональна изменению толщины биослоя.

Принцип действия BLI аналогичен SPR и основан на измерении изменений интерференционной картины отражённого белого света при образовании молекулярных комплексов на поверхности сенсора. Свет отражается от двух границ: внутреннего опорного слоя и слоя биомолекул, иммобилизованных на наконечнике биосенсора. Связывание аналита увеличивает толщину биослоя, вызывая сдвиг длины волны отражённого света, который регистрируется в реальном времени. На основе сенсограмм рассчитываются кинетические параметры: K_{on} , K_{dis} и K_d [80]. Ключевым преимуществом BLI является высокая чувствительность метода, позволяющая регистрировать связывание даже низкомолекулярных соединений [81].

Методы для изучения структуры белков

Структурная информация о взаимодействиях биологических макромолекул с лигандами является ключевым шагом к раскрытию биологических событий на молекулярном уровне и представляет собой предпосылку в процессах структурного дизайна лекарств, направленных на разработку новых терапевтических подходов и стратегий.

Рентгеновская кристаллография остаётся эталонным методом структурной биологии благодаря способности обеспечивать высокое разрешение (до 0,5–4 Å) и возможность точного позиционирования атомов в активных центрах белков. Метод применяется для изучения как индивидуальных белков, так и белок–лигандных комплексов [82]. Например, рентгеновская кристаллография позволила определить структуру поверхностного белка GP Эболавirusа Заир в комплексе с низкомолекулярными ингибиторами [83]. Для SARS-CoV-2 был получен комплекс NTD домена S белка с биливердином [84].

ЯМР-спектроскопия является уникальным инструментом для исследования белков в растворе, что позволяет наблюдать их в условиях, приближённых к физиологическим. Метод незаменим для анализа динамики конформационных состояний и слабых взаимодействий, которые трудно уловить другими методами [85]. Основное ограничение ЯМР заключается в размерности объектов: молекулярная масса исследуемых белков обычно не должна превышать 40 кДа, что ограничивает его применение для крупных белковых комплексов [86]. Однако метод активно используется для исследования отдельных доменов S-белка и взаимодействия малых молекул с ними.

Криоэлектронная микроскопия (крио-ЭМ) за последнее десятилетие радикально изменила подходы в структурной биологии благодаря возможности получения структур крупных белковых комплексов и вирусных частиц с разрешением 1,2–4,5 Å без необходимости кристаллизации белка [87]. Метод позволяет фиксировать белки в различных конформационных состояниях, что особенно важно для подвижных гликопротеинов вирусов. В случае SARS-CoV-2 именно крио-ЭМ позволила детально охарактеризовать тримерную структуру S-белка в открытой и закрытой конформациях [88]. Также была получена структура поверхностного белка в комплексе с низкомолекулярным ингибитором SP-14 [89].

1.5. Низкомолекулярные ингибиторы проникновения коронавирусов

Поверхностный белок S является основным объектом при разработке иммунопрофилактических препаратов против коронавирусов, однако он может также служить мишенью терапевтических препаратов, блокаторов входа вируса в клетку-мишень.

Существует две основные стратегии блокирования этапа проникновения: нацеливание на определённые участки белка S и ингибирование протеаз клетки-хозяина, необходимых для его активации и расщепления.

В структуре белка S можно выделить несколько ключевых сайтов, подходящих для разработки низкомолекулярных ингибиторов. Одним из наиболее перспективных, является домен RBD, нацеливание на который позволяет предотвратить связывание вируса с рецептором ACE2 на поверхности клетки хозяина, блокируя начальный этап инфицирования организма. Другим важным сайтом связывания могут выступать гептадные повторы, необходимые для слияния вирусной и клеточной мембран. Эти участки являются высококонсервативными у коронавирусов, что делает их привлекательными для разработки препаратов широкого спектра действия. Другими потенциальными сайтами также могут выступать сайт расщепления S1/S2, пептид слияния, N – концевой домен.

Второй стратегией является ингибирование протеаз хозяина, участвующих в активации белка S. Основными мишенями в этом случае выступают сериновая протеаза TMPRSS2, эндосомальные цистеиновые протеазы – катепсин В и L, а также фурин. Ингибирование этих ферментов предотвращает необходимое протеолитическое расщепление белка S и, соответственно, блокирует последующее проникновение вируса в клетку.

1.5.1. Ингибиторы поверхностного белка SARS-CoV-2

Одним из первых стратегических подходов к быстрому поиску средств терапевтического противодействия вспышке COVID-19 стал поиск ингибиторов проникновения среди библиотек низкомолекулярных соединений, включающих препараты, уже одобренные FDA. В подобных исследованиях широко применялись различные методы высокопроизводительного скрининга, позволяющие оперативно идентифицировать потенциальные противовирусные агенты.

Сайт связывания в RBD

Высокопроизводительный скрининг на основе конкурентного иммуноферментного анализа с биотинилированным RBD и ACE2 позволил выявить 5 ингибиторов взаимодействия RBD/ACE2: N-ацетилцистеин, тиопронин, вертепорфин, кальцитриол и рацекадотрил [90]. **Вертепорфин**, производное бензопорфирина, является лекарственным средством, применяемым в качестве фотосенсибилизатора для устранения патологических кровеносных сосудов, а также используемым для лечения центральной серозной ретинопатии. Данный препарат ингибирует взаимодействие RBD с ACE2 с $IC_{50} = 400,3$ нМ.

Фотоактивированный **вертепорфин** инактивирует инфекционные частицы SARS-CoV-2 с $IC_{50} = 3,0 \pm 0,5$ нМ [91] (рис. 1.14).

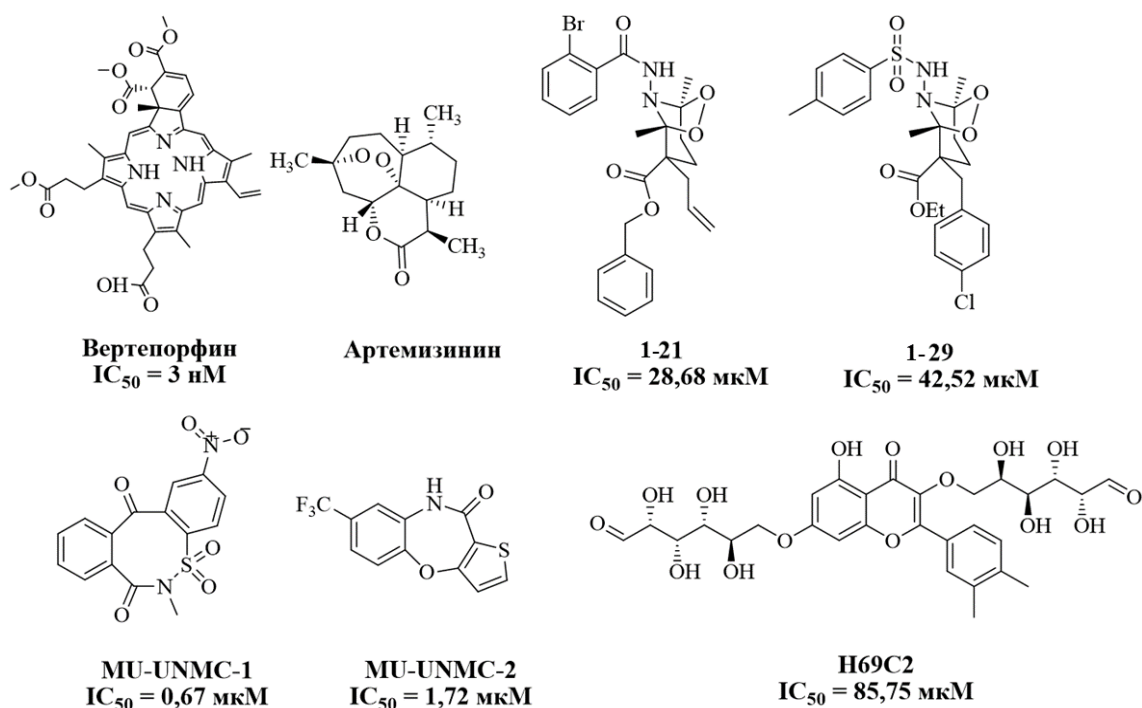


Рисунок 1.14. Ингибиторы поверхностного белка, связывающиеся в RBD.

Соединения, содержащие пероксидный мостик, рассматриваются как перспективные противоинфекционные средства. Например, **артемизинин** и его производные являются эффективными противомаларийными препаратами, а также демонстрируют высокую активность в отношении SARS-CoV-2 [92]. Библиотека пероксидных производных, содержащая 52 соединения, была исследована на способность связываться с RBD методом биослойной интерферометрии. Соединения **1-21** и **1-29** продемонстрировали высокую аффинность связывания с RBD (K_d 58-213 мкМ), а также ингибировали псевдовirusы и патогенный вирус SARS-CoV-2 штамма Omicron BA.1 (21: $IC_{50} = 28,68$ мкМ; 29: $IC_{50} = 42,52$ мкМ). При этом соединение **1-29** проявляло сниженную активности в отношении штамма Delta [93].

С использованием методов молекулярного моделирования были идентифицированы 5 потенциальных ингибиторов взаимодействия RBD и ACE2, два из которых **MU-UNMC-1** и **MU-UNMC-2** проявили активность как в экспериментах с псевдовirusными частицами, так и в экспериментах с патогенным вирусом (**MU-UNMC-1**: $IC_{50} = 0,67$ мкМ, **MU-UNMC-2**: $IC_{50} = 1,72$ мкМ) [94]. Анализ молекулярного моделирования выявил, что **MU-UNMC-2** связывается в специфическом кармане, образованном остатками Tyr505, Arg403 и Tyr453 RBD S белка, а также Asn33, His34, Glu37, Pro389, Phe390, Gln388 и Ala387 рецептора ACE2 [94].

Скрининг соединений природного происхождения выявил пять потенциальных ингибиторов, четыре из которых содержали углеводные фрагменты. Все соединения демонстрировали способность связываться с поверхностью RBD S SARS-CoV-2. Наиболее активное соединение **H69C2** показало ингибирующую активность в отношении патогенного вируса с $IC_{50} = 85,75$ мкМ. Методами молекулярного моделирования был идентифицирован сайт связывания с RBD, в котором H69C2 образует водородные связи с ключевыми аминокислотными остатками Arg403, Asp405, Glu406, Gln493 и Ser494. Важную роль в стабилизации комплекса играет флавоноидный скелет молекулы, участвующий в гидрофобных взаимодействиях с остатками Leu455, Tyr495 и Tyr 505 [95].

Сайт связывания в гептадных повторах

Гидрофильное соединение сальвианоловая кислота **C (Sal-C)**, выделенное из даньшэнь (*Salvia miltiorrhiza*) — растения, используемого в традиционной китайской медицине, эффективно подавляет инфекцию SARS-CoV-2 (рис. 1.15). Механизм действия связан со связыванием **Sal-C** с консервативным гидрофобным карманом в области HR1 S белка в промежуточной конформации при слиянии мембран. **Sal-C** ингибирует проникновение псевдовirusа SARS-CoV-2 с $IC_{50} = 3,85$ мкМ, а патогенного вируса с $IC_{50} = 3,41$ мкМ [96]. В другом исследовании с применением биослойной интерферометрии и иммуноферментного анализа **Sal-C** продемонстрировала высокое сродство к RBD SARS-CoV-2 с $K_D = 6,2$ мкМ [97]. Эти результаты указывают на то, что **Sal-C** может иметь несколько сайтов связывания в поверхностном белке S.

Кемпферол, флавонол, содержащийся в различных растениях и растительных лекарственных средствах, показал способность блокировать проникновение SARS-CoV-2. Он деформирует HR1 и напрямую реагирует с остатками лизина в области HR2 [98].

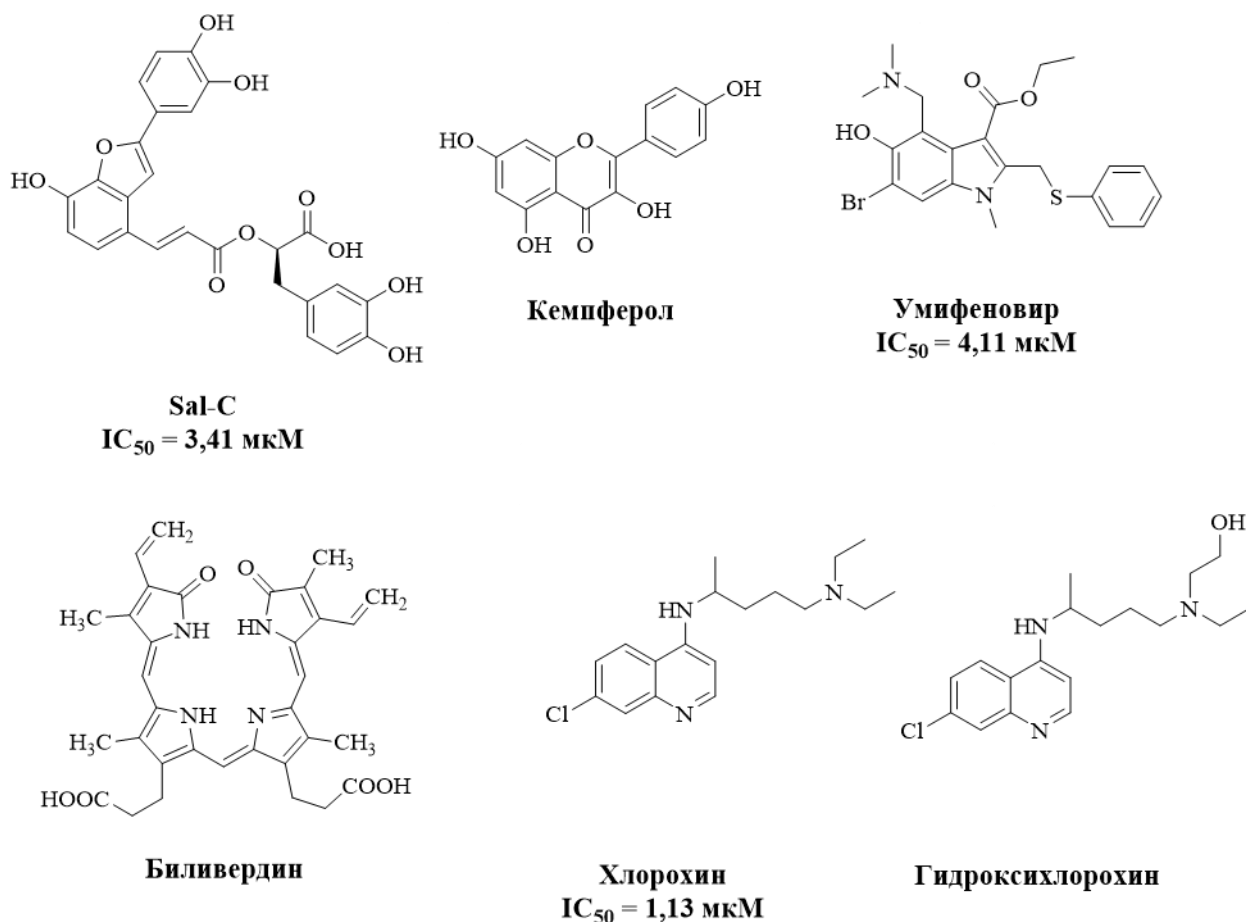


Рисунок 1.15. Ингибиторы поверхностного белка, связывающиеся в гептадных повторах, NTD.

Умифеновир («Арбидол») — противогриппозный препарат широкого спектра действия, одобренный в России и Китае. Он блокирует проникновение вируса гриппа в клетки хозяина, нарушая вирус-опосредуемое слияние мембран. В клеточных анализах арбидол показал активность против инфекции SARS-CoV-2 с IC₅₀ = 4,11 мкМ. Молекулярная динамика и структурный анализ показали, что **арбидол** взаимодействует с остатками в центральной спирали CH-HR1 посредством образования водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий [99] (рис. 1.15).

Сайт связывания в N-концевом домене

На основании данных криоэлектронной микроскопии и рентгеновской кристаллографии был определен сайт связывания биливердина в NTD. **Биливердин**, промежуточный метаболит катаболизма гемоглобина, образует стабильный комплекс с NTD с K_D = 10 нМ. Этот метаболит взаимодействует с ключевыми остатками в NTD: образует π-π-стэкинг с Arg190 (стабилизированный водородной связью с Asn99), координационные взаимодействия с His207 (~3.6 Å) и водородную связь между Asn121 и лактамной группой пиррольного кольца. Клинические наблюдения выявили корреляцию

между повышенными уровнями билирубина (продукта восстановления биливердина) и показателями летальности у пациентов с COVID-19, что может указывать на потенциальную роль системы метаболизма гемоглобина в патогенезе заболевания [84].

Хлорохин, широко используемый препарат для лечения малярии и аутоиммунных заболеваний, демонстрирует ингибирующую активность в отношении SARS-CoV-2 на стадии проникновения вируса в клетку с $IC_{50} = 1,13$ мкМ [100]. **Хлорохин** и **гидроксихлорохин** обладают высоким сродством к сиаловым кислотам, а также к ганглиозидам, содержащим сиаловую кислоту. Молекулярное моделирование показало, что эти соединения способны имитировать взаимодействия S белка с ганглиозидами. Ключевым аспектом механизма действия является стерическое блокирование остатков Glc и GalNAc ганглиозидов, которые необходимы для связывания с ключевыми аминокислотами S белка — Phe135 и Asn137, соответственно [101] (рис. 1.15).

Сайт связывания в области пептида слияния

Фрагмент FP расположен ниже сайта расщепления S2', состоит из короткой спирали и динамичной петлевой области. Эта петля отличается высокой гибкостью и, как правило, остаётся неупорядоченной в структуре белка перед слиянием. Структурные исследования выявили наличие гидрофобного кармана в области спирали FP и соседнего домена HR1, представляющего собой потенциальный сайт связывания для низкомолекулярных соединений. **Клобенхотропин**, антигистаминный препарат, проявил активность в анализе с псевдовирусными частицами SARS-CoV-2 и патогенным вирусом с IC_{50} 12,6 мкМ и 8,9 мкМ соответственно (рис. 1.16). Другое соединение, производное хиназолина **D3-βArr**, являющееся положительным аллостерическим модулятором рецептора тиреотропина, продемонстрировало ингибирование вируса с $IC_{50} = 10-15,8$ мкМ. Несмотря на различия в химической структуре, оба соединения обладают сходной трехмерной конформацией, что позволяет им занимать гидрофобный карман, образуя водородные связи и π - π -стекинг взаимодействия с остатком Phe833 через хлорфенильную (у клобенхотропина) и хиназолиновую (у D3-βArr) группы [102].

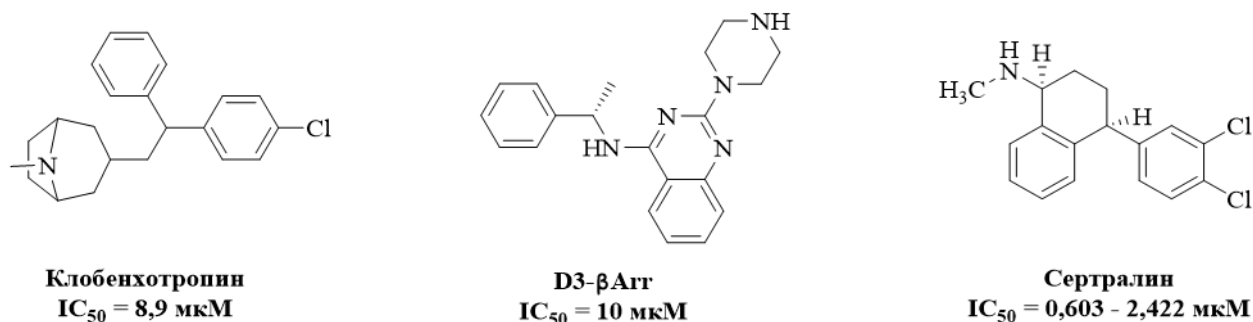


Рисунок 1.16. Ингибиторы поверхностного белка, связывающиеся в FP, CTD1-CTD2

Сайт связывания в CTD1-CTD2

В другом скрининге одобренных FDA препаратов была обнаружена противовирусная активность **сертралина**, ингибитора переносчика серотонина (рис.1.16). Препарат был активен против разных штаммов SARS-CoV-2, а также мутантных вариантов псевдовирюсов (например, E484K, A701V, N501Y, и др) со значением IC_{50} в диапазоне от 0,603 до 2,422 мкМ. Молекулярное моделирование показало, что **сертралин** связывается с остатками Leu546 и Phe565, расположенными между доменами CTD1 и CTD2. Полученные данные позволяют предположить, что **сертралин** стабилизирует S белок в закрытой конформации, блокируя связывание RBD с рецептором ACE2 и последующее протеолитическое расщепление белка, тем самым подавляя вирусную инфекцию [103].

1.5.2. Ингибиторы клеточных протеаз

Ингибиторы катепсина L

Катепсин L (CatL) — лизосомальная цистеиновая протеаза, играющая ключевую роль в процессинге белковых антигенов и патогенов, поступающих в клетку посредством эндоцитоза. Клинические исследования выявили значительное повышение уровня, циркулирующего CatL у пациентов с COVID-19, причем наблюдалась четкая корреляция между его концентрацией и степенью тяжести заболевания. Полученные данные подтверждают существенный вклад CatL в патогенез SARS-CoV-2-инфекции, что делает данный фермент перспективной мишенью для разработки терапевтических стратегий против COVID-19 [104].

Амантадин, противовирусный препарат, первоначально применявшийся для лечения гриппа, а затем при болезни Паркинсона, демонстрирует ингибирующую активность в отношении SARS-CoV-2 (рис. 1.17). **Амантадин** подавляет репликацию вируса в клетках Vero E6 с IC_{50} 83-119 мкМ [105]. Конкурентный иммуноферментный анализ выявил, что **амантадин** не ингибирует связывание гликопротеина S вируса SARS-

CoV-2 с ACE2. Предполагаемый механизм действия **амантадина** связан с его способностью накапливаться в лизосомах и повышать их pH, что приводит к инаktivации лизосомальных ферментов, включая катепсин L, оптимальная активность которого наблюдается при pH ниже 5. Важно отметить, что **амантадин** также вызывает значительное снижение экспрессии гена катепсина L, что также может объяснять его противовирусный эффект [106].

Галлинамид А (также известный как симпlostатин), модифицированный депсипептид природного происхождения, выделенный из морских цианобактерий родов *Schizothrix* и *Symploca*. Данное соединение обладает уникальными структурными особенностями, включая пирролиноновый фрагмент, производный от L-аланина, и α,β -ненасыщенную имидную группировку. **Галлинамид А** проявляет ингибирующую активность в отношении различных цистеиновых протеаз, включая ферменты паразитов и CatL человека, демонстрируя высокую активность против CatL с IC_{50} 17.6 нМ. Соединение также эффективно подавляет репликацию SARS-CoV-2 (IC_{90} = 88 нМ) [32].

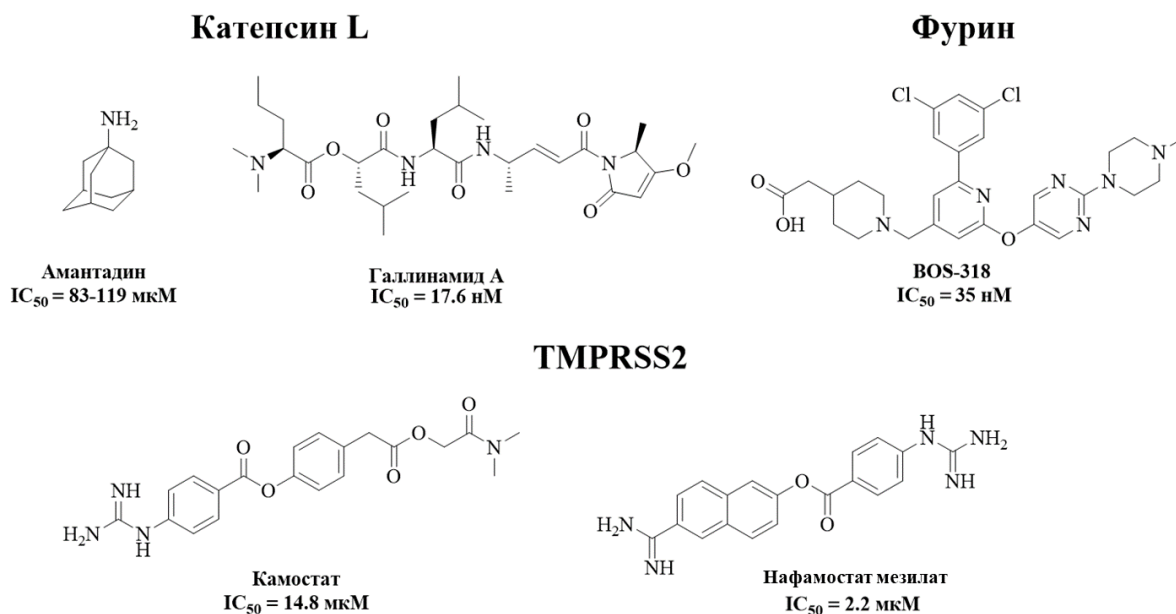


Рисунок 1.17. Ингибиторы клеточных протеаз, участвующих в проникновении SARS-CoV-2

Ингибиторы TMPRSS2

TMPRSS2 относится к семейству трансмембранных сериновых протеаз II типа и демонстрирует наиболее выраженную экспрессию в эпителиальных клетках предстательной железы, где ее уровень значительно возрастает при злокачественных новообразованиях [107]. TMPRSS2 играет ключевую роль в патогенезе вирусных инфекций, обеспечивая проникновение в клетки-мишени различных респираторных

вирусов, включая SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV и вирус гриппа А, посредством протеолитической активации их поверхностных гликопротеинов [108]. Физиологическая роль TMPRSS2 остается недостаточно изученной, что подтверждается исследованиями на мышях с нокаутом этого гена (TMPRSS2^{-/-}), у которых не наблюдалось существенных нарушений развития, роста или функционирования органов [109]. Однако, отмечалась изменённая восприимчивость у мышей к вирусным инфекциям, проявляющаяся в ослаблении воспалительной реакции при заражении вируса SARS-CoV-2 и сниженной вирулентности вируса гриппа А субтипа H3N2 [108]. Таким образом, TMPRSS2, по-видимому, не играет существенной роли в процессах развития и поддержания физиологического равновесия организма, что делает ее перспективной мишенью для разработки терапевтических препаратов.

Среди потенциальных ингибиторов TMPRSS2 особый интерес представляют синтетические производные гуанидинобензоата - **камостат** и **нафамостат мезилат**, демонстрирующие широкую активность против сериновых протеаз (рис. 1.17). Данные соединения показали выраженную противовирусную активность *in vitro*: значения IC₅₀ составили 14,8 нМ для **камостата** и 2,2 нМ для **нафамостата мезилата** в отношении SARS-CoV-2, при этом **нафамостат** также продемонстрировал активность против SARS-CoV (1,4 нМ) и MERS-CoV (5,9 нМ) [110]. Учитывая их известный профиль безопасности (оба препарата одобрены в Японии для лечения других заболеваний) и высокую противовирусную активность, **камостат** и **нафамостат мезилат** стали предметом многочисленных клинических исследований при COVID-19 [111]. Однако завершившиеся испытания не выявили значимого улучшения клинических исходов по сравнению с плацебо, что может быть связано с рядом факторов, включая недостаточную дозировку, позднее начало терапии или ограниченный объем исследований [112], [113].

Ингибиторы фурина

Фурин представляет собой кальций-зависимую сериновую эндопротеазу, относящуюся к семейству пропротеинконвертаз. Этот фермент играет центральную роль в посттрансляционном процессинге белков, распознавая и расщепляя белки-предшественники по консенсусной последовательности Arg-X-Lys/Arg-Arg↓ (RXXR), где аргинин в позициях P1 и P4 от сайта расщепления является критическим для субстратной специфичности [114]. Благодаря широкой тканевой экспрессии и способности циклически перемещаться между аппаратом Гольджи, клеточной поверхностью и эндосомами, фурин участвует в созревании разнообразных биологически активных молекул, включая регуляторные белки (факторы роста, пептидные гормоны), мембранные рецепторы,

металлопротеиназы, а также вирусные гликопротеины и бактериальные токсины. Фурин выполняет важнейшие физиологические функции в эмбриогенезе и поддержании гомеостаза. Однако его патологическая активация связана с развитием нейродегенеративных заболеваний (в том числе болезни Альцгеймера), опухолевой прогрессией и метастазированием, а также с усилением вирулентности патогенов, таких как SARS-CoV-2, ВИЧ, вирус гриппа и усилением патогенного действия бактериальных токсинов. Поэтому, фурин является многообещающей терапевтической мишенью для лечения различных заболеваний, однако разработка его ингибиторов требует тщательных исследований для обеспечения избирательности и безопасности воздействия [115].

Соединение **BOS-318**, разработанное компанией Boston Pharmaceutical, эффективно ингибирует фурин с $IC_{50} = 35$ нМ (рис. 1.17). В исследованиях с использованием клеточной линии Calu-3, предварительно обработанных 1 мкМ **BOS-318** за 24 часа до заражения SARS-CoV-2, было обнаружено значительное снижение вирусных титров через 12, 24 и 48 часов после инфицирования ($IC_{50} = 0,2$ мкМ). Однако в клетках HEK293-ACE2 **BOS-318** вызывал усиление проникновения псевдовirusa примерно в 10 раз, что свидетельствует об активации альтернативного pH-зависимого пути проникновения, не требующего участия фурина. Совместная предварительная обработка **BOS-318** и **камостата** (селективного ингибитора TMPRSS2) приводила к полному блокированию проникновения SARS-CoV-2 [116].

Дополнительное подтверждение этой стратегии получено при изучении синтетического пептида **MI-1851**, который в концентрации 10 мкМ ингибировал фурин в клетках Calu-3, снижая титр SARS-CoV-2 в 75 раз. Комбинация **MI-1851** с ингибитором TMPRSS2 (T-ex5 PPMO) приводила к полному подавлению репликации вируса. Эти данные демонстрируют, что комбинированная терапия представляет эффективную стратегию блокирования SARS-CoV-2 инфекции [117].

Ингибиторы ACE2

Ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) представляет собой мембраносвязанную металлопротеазу, относящуюся к семейству дипептидилкарбоксипептидаз, и является основным рецептором для проникновения SARS-CoV-2, SARS-CoV и HCoV-NL63 [118]. ACE2 играет важную роль в ренин-ангиотензин-альдостероновой системе, которая отвечает за гормональные механизмы поддержания гомеостаза в организме человека. Одна из функций ACE2 заключается в каталитическом превращении октапептида Ang II в его метаболит ангиотензин-(1–7) [119].

Хотя в ограниченных исследованиях предпринимались попытки разработки ингибиторов ACE2 для сердечно-сосудистой регуляции, терапевтическое ингибирование этого фермента с целью блокирования вирусной инфекции представляется проблематичным [120]. Это связано с его незаменимой физиологической ролью в организме, включая защитные функции при остром респираторном дистресс-синдроме, который развивается в том числе и при COVID-19 [121].

Заключение

В XXI веке было зарегистрировано появление трех коронавирусов, обладающих высоким эпидемическим или пандемическим потенциалом и вызывающих тяжелые заболевания у людей: SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2. В настоящее время известно более 50 видов коронавирусов, способных вызывать заболевания как у человека, так и у многих млекопитающих, таких как свиньи, крупный рогатый скот, кошки, собаки, куницы, верблюды, летучие мыши, землеройки, ежи, киты, различные виды птиц и др. Высокая скорость эволюции, способность к межвидовой передаче и уклонению от иммунного ответа делают коронавирусы потенциальными источниками новых пандемий. Это подчеркивает необходимость создания противовирусных средств, обладающих широким спектром действия и предназначенных для использования ещё до возникновения новых эпидемических штаммов.

Одной из наиболее перспективных мишеней для противовирусной терапии является поверхностный белок S, обеспечивающий прикрепление вируса к клетке и последующее слияние мембран. Домен RBD является привлекательной мишенью для разработки ингибиторов, поскольку именно он участвует в непосредственном взаимодействии с клеточным рецептором ACE2. Однако высокая изменчивость RBD и его способность быстро накапливать мутации, особенно на фоне иммунного давления, значительно ограничивают его применение в разработке препаратов широкого спектра действия. В связи с этим особый интерес представляют более консервативные участки S белка - HR1/HR2-регионы, критически важные для процесса слияния вирусной и клеточной мембран. Эти участки демонстрируют высокую гомологию среди бета-коронавирусов и могут служить мишенями для создания ингибиторов широкого спектра действия.

Лимитирующей стадией при поиске ингибиторов является скрининг соединений, так как коронавирусы — патогены, работа с которыми требует особых условий, таких как имеющийся в лабораториях уровень биологической защиты BSL-3. В связи с этим для эффективного поиска ингибиторов необходимо разрабатывать суррогатные системы,

способные безопасно и точно моделировать взаимодействие вируса с клеткой/рецептором и оценивать активность потенциальных препаратов. Такие подходы, как псевдовиральные модели, биослойная интерферометрия, конкурентный иммуноферментный анализ и другие методы, позволяют в более безопасных для исследователя условиях быстро и эффективно проводить скрининг библиотек соединений, оценивать их ингибирующую активность, а также изучать влияние вирусных мутаций на эффективность противовирусных препаратов. Суррогатные системы играют ключевую роль в создании высокопроизводительных платформ, способных быстро адаптироваться под новые штаммы, и служат незаменимым инструментом при доклиническом тестировании ингибиторов.

Несмотря на значительное количество описанных в литературе низкомолекулярных ингибиторов проникновения коронавирусов, многие из них были протестированы исключительно *in vitro* в псевдовиральных системах или на ограниченном наборе клеточных линий и не прошли валидацию на патогенных штаммах или в экспериментах *in vivo*. Кроме того, подавляющее большинство известных ингибиторов являются зарубежными разработками, что в условиях современных геополитических и экономических ограничений подчёркивает необходимость создания отечественных противовирусных препаратов, доступных для системы здравоохранения Российской Федерации.

Таким образом, поиск новых низкомолекулярных ингибиторов проникновения коронавирусов и разработка суррогатных систем для их скрининга остаются востребованными направлениями современной вирусологии и медицинской химии. Решение этих задач особенно актуально в условиях продолжающейся эволюции вирусов, поскольку позволяет оперативно создавать эффективные противовирусные препараты и формировать научно-технический задел для быстрого ответа на будущие инфекционные угрозы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Коммерческие наборы, ферменты и реактивы

- ДНК-полимераза TransStart KD Plus с прилагаемым буфером и смесь dNTP (TransGen, Китай);
- 2× реакционная смесь БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color для ПЦР (Биолабмикс, Россия);
- Маркер молекулярного веса ДНК M12 (Сибэнзим, Россия);
- Эндонуклеазы рестрикции AsuNI I, AhiII, CciNI I, в комплекте с буферами (Сибэнзим, Россия);
- Набор для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Clean up Standard (Евроген, Россия);
- Буфер для быстрого лигирования 5X Quick ligation buffer (Евроген, Россия);
- Наборы для выделения до 20 мкг плазмидной ДНК из культуры *E. coli* Plasmid miniprep (Евроген, Россия);
- Наборы для выделения и очистки плазмидной ДНК из культуры *E. coli* QIAprep Spin Midiprep (Qiagen, Германия);
- Набор для трансфекции нуклеиновых кислот в эукариотические клетки при помощи PEI (Биоспецифика, Россия);
- Реагент для трансфекции эукариотических клеток Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, США);
- МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (AppliChem, Германия);
- Пуромицин, 10 мг/мл (InvivoGen, США);
- Гентамицин, 40 мг/мл (Дальхимфарм, Россия);
- Ампициллин, 100 мг/мл (Биосинтез, Россия);
- Канамицин сульфат сухой, 50 мг (БиоЛот, Россия);
- Фетальная бычья сыворотка (Gibco, США);
- Сахароза, ЧДА (ЛенРеактив, Россия);
- Диметилсульфоксид, ДМСО (ЛенРеактив, Россия);
- 5×буфер для лизиса клеточной культуры (Promega, США);
- Реагент для анализа активности люциферазы, LAR (Promega, США);
- Человеческое моноклональное антитело к ACE2 (Cat № FHJ51610 AntibodySystem, Франция);

- Человеческое моноклональное антитело к DPP4 (Cat № FHD74110, AntibodySystem, Франция);
- Мышинные моноклональные антитела к F(ab)₂ конъюгированные APC (LXQ0620071), (R&D Systems, США);
- Препарат белка ACE2 человека (а.о. 18Q–740S, GenBank: AF291820) конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP) предоставлен к.б.н. Беленькой С.В.;
- Препарат полноразмерного поверхностного белка S SARS-CoV-2 штамм Wuhan-Hu-1 (GenBank: MN908947), Delta (GenBank: LC728280.1) предоставлен к.х.н. Исаевой А.А. и Несмеяновой В.С.;
- Препарат рецептор-связывающего домена (RBD) S-белка SARS-CoV-2 (а.о. 308–541), штамм Wuhan-Hu-1 (GenBank: MN908947); Delta (GenBank: LC728280.1) предоставлен к.б.н. Меркульевой Ю.А.;
- Препараты рекомбинантных моноклональных антител: Nb6 и W25 предоставлены ИМКБ СО РАН;
- Препарат рекомбинантного антитела MR191 предоставлен к.б.н. Зыбкиной А.В.

2.1.2. Клеточные линии, штаммы бактерий и вирусов

Штамм *Escherichia coli*, использованный в работе (получен из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»): NEB Stable (F' proAB lacIq Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10 (TetR)/Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- ø80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC).

В работе использовали культуры клеток, полученные из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия):

- НЕК293Т – перевиваемая линия клеток почки эмбриона человека;
- Vero E6 – перевиваемая линия клеток почки зеленой мартышки;
- СНО-K1 – перевиваемая линия клеток яичника китайского хомячка;
- TZM-bl – линия клеток HeLa (рака шейки матки), генетически модифицированная для экспрессии рецепторов CD4, CCR5 и CXCR4;
- HuH7 – линия клеток гепатокарциномы человека;
- Caco-2 – линия аденокарциномы толстой (ободочной) кишки человека.

Для анализа вирус нейтрализации использовали перевиваемую клеточную линию Vero E6 (африканская зеленая мартышка, почка) из Коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, НСО, Россия). В экспериментах использовали следующие штаммы SARS-CoV-2, предоставленные Государственной

коллекцией возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, НСО, Россия):

Wuhan-Hu-1 линия Ba - hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (EPI_ISL_406844);

Delta линия B.1.617.2 - hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (EPI_ISL_7338814);

Omicron линия B.1.1.529 - hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (EPI_ISL_8920444);

Omicron линия BA 5.2 - hCov-19/Russia/Moscow-49415/2022 (EPI_ISL_16613436);

Omicron линия XBB.1.5 - hCov-19/Russia/TYU-SRC-8642/2023 (EPI_ISL_17770464);

Omicron линия BQ.1.1 - hCoV-19/Russia/TOM-SRC-8663/2023 (EPI_ISL_17730076).

2.1.3. Олигонуклеотиды

Все олигонуклеотиды, использованные в работе, были синтезированы ООО «БИОССЕТ» (г. Новосибирск).

Таблица 1. Олигонуклеотиды использованные в работе.

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
S-F	aaaaaagctagcgccaccatgttcgtgtttctgggtgctgc
S-R	aaaaaagcggccgctcatgtgtagtgacgtttcacgc
Sd18-F	aaaaaaggatccttcaccatcagcgtgaccacag
Sd18-R	aaaaaagcggccgctcacttgacgagctgccaca
lid_Sd18-F	gctctgctgtgtgctgctgctgtgtggagcagtccttcgtttcgccgtgaacctgaccacaagaacc
lid-Sd18-R	aaaaaagcggccgctcacttgacgagctgccaca
TPA-F	gaccgccatgttgccattg
TPA-R	cagcagcacacagcagagccctctcttcattgcatccatgggtggccccggggctagcctatagttag
MERS-F	aaaaaacccgggatgatccactccgtgtttctgct
MERS-R	aaaaaagcggccgcttagtgacgtg
SARS1-F	aaaaaacccgggatggatgcaatgaagagagggg
SARS1-R	gcggccgcttacttgacga
SARSDelta-F	aaaaaagctagcagccatgtttgttttctgttttattgc
SARSDelta-R	aaaaaagcggccgcttacagaaaggtagacagcagcacc
Omicron-F	ccatgtttgttttctgttttattgccactagtctctagtcagtggttaattaccacaagaacccagctgc
Omicron-R	atgcaacacagcatgattgtgacatcacgatggcaatcagtcggcgata
XBB.1.5-F	cagcagcacacagcagagccctctcttcattgcatccatgggtggccccggggctagcctatagttag
XBB.1.5-R	aaaaaagcggccgctcacttgacgagctgccaca
DPPR-F	aaaaaacctagggccaccatgaagacaccgtggaaggt
DPP4-R	aaaaaagtcgacctaaaggtaagagaaacattgtttatgaagtgg
ACE2-F	aaaaggctagccatgtcaagctcttctggct
ACE2-R	aaaaaagtcgacctaaaaggaggtctgaacatcatcag

GAPDH-F	ccacatcgctcagacacccat
GAPDH-R	ggcaacaatatccactttaccagag
GAPDH-Z	FAM-ccaatacgaccaaattccgttgactcc-BHQ1
TMS2-F	ctctagccaaggaatagtggatg
TMS2-R	caggcatcactgtggtacag
TMS2-Z	TAMRA-ctgaacacaagtgccggcaatgtcg-BHQ2

2.1.4. Питательные среды

Для работ с клетками *E.coli*: Бактериальная среда LB: 1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl; Бактериальная среда LB-агар: 1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, 1,5% агар.

Для работ с клетками млекопитающих использовали среды производства ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, НСО, Россия). Культуру CHO-K1 вели на среде DMEM/F12 (1:1) с L-глутамином, для работы с клетками Vero Еб использовали питательную среду MEM с L-глутамином. Все среды содержали антибиотик гентамицин (50 мкг/мл) и перед использованием были дополнены 2 или 10% инактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США).

2.1.5. Растворы и буферы

- ТАЕ буфер для электрофореза ДНК в агарозном геле: 40 mM Трис(гидроксиметил) аминотетан, 20 mM уксусная кислота, 1 mM ЭДТА, pH 8,0.
- ФСБР (фосфатно-солевой буферный раствор): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4.
- Блокирующий буфер для ИФА: 1% казеина в буфере ФСБТ.
- Промывочный буфер для ИФА: 1xФСБР, 0,1 % Tween – 20.

2.1.6. Программное обеспечение

Дизайн генетических конструкций проводили с использованием SnapGene 3.2.1. Статистические анализы и визуализацию результатов в виде графиков проводили с помощью GraphPad Prism 8.0.

2.2. Методы

2.2.1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Для получения ПЦР продуктов использовали коммерчески доступный набор TransStart KD Plus DNA Polymerase (TransStart, Китай) согласно рекомендациям

производителя. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 0.2 мкМ dNTP, 200 мкМ каждого олигонуклеотидного праймера F и R (указанные в таблице 1), 5×TransStart KD Plus буфер, 10-50 нг матрицы, 1.25 ед. Taq ДНК полимеразы. Объем смеси доводили до 50 мкл деионизированной водой. ПЦР осуществляли на амплификаторе Veriti (Thermo Scientific, США) по следующей программе: первичная денатурация при 95°C в течение 2 минут (1 цикл); 30 циклов амплификации, включающих денатурацию при 95°C (30 секунд), отжиг праймеров при 58 °C (30 секунд) и элонгацию при 72°C (вариативно); финальную элонгацию при 72°C в течение 5 минут. Полученные ПЦР-продукты анализировали методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле с последующей визуализацией в УФ-свете.

2.2.2. Выделение ДНК из агарозного геля

Выделение целевых фрагментов ДНК из агарозного геля проводили с использованием набора Clean up Standard ("Евроген", Россия) согласно инструкциям производителя. Концентрацию очищенной ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop One (Thermo Scientific, США).

2.2.3. Ферментативный гидролиз ДНК

Гидролиз ДНК проводили с использованием коммерческих эндонуклеаз рестрикции (СибЭнзим, Россия). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 0.8-1.0 мкг целевой ДНК, 10 е.а. соответствующей рестриктазы и 2 мкл 10×реакционного буфера, а также для отдельных ферментов - бычий сывороточный альбумин (BSA) до конечной концентрации 100 мкг/мл. Смесь инкубировали при оптимальной температуре для конкретного фермента (как правило, 37 °C) в течение 2-3 часов.

2.2.4. Лигирование

Реакцию лигирования проводили в течение 30 минут при комнатной температуре (22-25°C) в реакционной смеси, содержащей ПЦР-ампликон и векторную плазмиду, обработанные соответствующими рестриктазами, в молярном соотношении 2:1, 1 единицу ДНК-лигазы фага T4 (СибЭнзим, Россия) и 1× буфер "5x Quick ligation" (Евроген, Россия) в конечном объеме 20 мкл. Полученную лигазную смесь (10 мкл) использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* штамма Neb Stable.

2.2.5 Трансформация компетентных клеток E.coli NEB Stable методом heat-shock

Компетентные клетки *E. coli* аккуратно размораживали на льду в течение 10 минут, после чего добавляли плазмидную ДНК (до 100 нг) или лигазную смесь (10 мкл) и инкубировали на льду в течение 30 минут. Далее клетки подвергали тепловому шоку, помещая их в водяную баню при 42 °С на 30-45 секунд, и немедленно возвращали на лед для двухминутного охлаждения. Добавляли 200 мкл LB-среды и инкубировали при 37 °С в течение 1 часа на качалке (180 об/мин). После клетки высевали на чашки Петри с LB-агаром, содержащим соответствующий селективный антибиотик (канамицин или ампициллин), и инкубировали при 37 °С в течение 16-18 часов до появления отдельных колоний.

2.2.6. Отбор положительных клонов

Для отбора положительных клонов, содержащих целевые генетические вставки размером >2000 п.н., проводили рестрикционный анализ. Индивидуальные колонии культивировали в 5 мл жидкой среды LB с соответствующим антибиотиком при 37°С в течение 16-18 часов. Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора «*E. coli* Plasmid miniprep» (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя, после чего измеряли концентрацию ДНК. С помощью программного обеспечения SnapGene 3.2.1 подбирали оптимальные эндонуклеазы рестрикции и рассчитывали ожидаемые размеры фрагментов. Полученные продукты гидролиза анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле. Положительные клоны идентифицировали по соответствию экспериментально полученных фрагментов расчетным значениям и их отличию от контрольных образцов (вектор без вставки), обработанных теми же рестриктазами.

Другой отбор проводили для клонов, содержащих плазмиду со встроенным геном менее 2000 пн, с использованием ПЦР анализа со специфичными праймерами, обеспечивающими амплификацию гена. Индивидуальные колонии нумеровали, после чего стерильной микробиологической петлей отбирали небольшое количество биоматериала и ресуспендировали в 25 мкл ПЦР-смеси на основе готовой смеси "БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×)". Затем пробирки с реакционной смесью устанавливали в ПЦР-амплификатор. Результаты ПЦР оценивали с помощью электрофореза в 1% -м агарозном геле.

2.2.7. Определение нуклеотидной последовательности ДНК.

Секвенирование ДНК выполняли методом Сэнгера в ЦКП «Геномика» СО РАН с использованием набора CEQ2000 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Beckman Coulter,

США). Анализ флуоресцентно-меченых фрагментов осуществляли на 16-капиллярном автоматическом секвенаторе ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

2.2.8. Выделение плазмидной ДНК

Отдельную колонию клеток культивировали на орбитальной платформе в течение ночи при 37 °C и 170 об/мин в 5 мл среды LB, содержащей селективный антибиотик. После этого, полученную культуру клеток осаждали, а из полученной биомассы выделяли плазмидную ДНК с использованием коммерческого набора «*E.coli* Plasmid miniprep» (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя.

Для получения препаративной наработки плазмидной ДНК клетки культивировали в 150 мл среды LB на орбитальной платформе в течение ночи при 37 °C и 170 об/мин. Из полученной биомассы выделяли плазмидную ДНК с использованием коммерческого набора «*E.coli* Plasmid Midi» (Евроген, Россия) или «Qiagen Plasmid Midi Kit» (Qiagen, США) согласно рекомендациям производителя.

2.2.9. Трансфекция клеточной культуры с использованием Lipofectamine 3000

Клетки HEK293T выращивали в матрасах T25/T75 до конфлюэнтности 70-80%. За час до трансфекции заменяли среду на 2% FBS DMEM/F12. Трансфекцию проводили с использованием коммерческого набора Lipofectamine 3000 (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. Для этого в первой пробирке готовили смесь, содержащую Opti-MEM, реагент P3000 и плазмидную ДНК (количество каждого компонента зависело от количества клеток и подбиралось согласно протоколу). Во вторую пробирку добавляли Opti-MEM и Lipofectamine 3000. Пробирки аккуратно перемешивали, после чего содержимое второй пробирки добавляли в первую, перемешивали пипетированием и инкубировали 10 минут при комнатной температуре. После инкубации комплекс ДНК-липофектамин добавляли к клеткам.

2.2.10. Получение псевдовиральных частиц на основе рекомбинантного вируса везикулярного стоматита

Клетки HEK293T культивировали во флаконах T25/T75 до достижения 70-80% конфлюэнтности. За час до трансфекции среду заменяли на DMEM/F12, содержащую 2% FBS. Трансфекцию проводили с использованием коммерческого набора Lipofectamine 3000 согласно инструкции производителя. В качестве трансфицируемой конструкции использовали плазмиду, содержащую ген поверхностного белка SARS-CoV-2/ SARS-CoV-1/ MERS-CoV/ VSV. На следующий день среду заменяли на свежую среду DMEM/F12 с 2%

FBS. Через час в культуру добавляли рекомбинантный VSVΔG (20 мкл с титром $1,5 \times 10^6$ RLU). Через 4 часа инкубации клетки промывали PBS и добавляли свежую среду DMEM/F12 с 2% FBS. Культуральную среду собирали через 24–48 часов, центрифугировали при $800 \times g$ в течение 10 минут при 4 °C для удаления клеточного дебриса. Полученный супернатант сразу использовали в дальнейших экспериментах или замораживали при -80°C до момента использования.

2.2.11. Получение псевдовиральных частиц на лентивирусной основе

Клетки HEK293T культивировали во флаконах T25/T75 до достижения 70-80% конфлюэнтности. За час до трансфекции культуральную среду заменяли на DMEM/F12, содержащий 2% FBS. Трансфекцию проводили с использованием коммерческого набора Lipofectamine 3000 согласно инструкции производителя с использованием трех плазмид: репортерная pLV, упаковочная pSPX2, оболочечная (содержащая ген поверхностного белка). Через 48 часов собирали культуральную среду, центрифугировали при $800 \times g$ для удаления клеточного дебриса, после чего супернатант сразу использовали или замораживали при -80°C для дальнейших экспериментов.

2.2.12. Функциональный анализ псевдовиральных частиц

Клетки культивировали в 96-луночных планшетах. При достижении монослоя в каждую лунку вносили 100 мкл суспензии псевдовиральных частиц. Через 48 часов инкубации культуральную среду удаляли, добавляли 25 мкл 1×лизирующего буфера (Promega, США) и инкубировали в течение 7–10 минут. Затем клеточный лизат аккуратно ресуспендировали, переносили лизат в лунки оптического планшета (Corning, США). Перед проведением анализа вносили 40 мкл субстрата люциферазы, D-люциферина (LAR (Promega, США)). Измерение люминесцентного сигнала выполняли с использованием мультимодального ридера Varioskan LUX (Thermo Scientific, США). Для каждого измерения проводили нормализацию по количеству жизнеспособных клеток с использованием МТТ-теста.

2.2.13. Очистка псевдовиральных частиц на сахарозной подушке

Для получения концентрированного препарата псевдовиральных частиц культуральную среду, содержащую псевдовиралы, наслаивали на 20% раствор сахарозы (w/v) в 40 мл центрифужных пробирках (Beckman Coulter, США). Далее центрифугировали при $20000 \times g$ в течение 2 часов при температуре 4 °C (Beckman Coulter, США). Затем супернатант аккуратно удаляли, а осадок ресуспендировали в 200 мкл PBS.

Концентрированный препарат псевдовирюсов аликвотировали и хранили при температуре -80 °С до дальнейшего использования.

2.2.14. Определение цитотоксичности соединений на культуре клеток HEK 293T методом МТТ-теста

Клетки HEK293T высевали на 96-луночные культуральные планшеты ($\sim 5 \times 10^4$ клеток/лунку). При достижении 70-80% конфлюэнтности клеточной культуры добавляли исследуемые соединения, разбавленные в DMEM/F-12, в диапазоне концентраций 5 мкМ до 500 мкМ. Клетки инкубировали с соединениями в течение 48 ч, после чего в каждую лунку добавляли по 20 мкл раствора МТТ и инкубировали ещё 2 часа. Затем ростовую среду удаляли, а осадок формазана растворяли в 100 мкл ДМСО. Оптическую плотность определяли при длине волны 570 нм. Контролем служила культура клеток HEK293T без добавления соединений. Значения CC_{50} рассчитывали с использованием программы GraphPad Prism 8.

2.2.15. Определение ингибирующей активности соединений и нейтрализующей активности антител

Растворы соединений в ДМСО (концентрация 10 мг/мл) добавляли в ростовую среду к клеткам-мишеням линии HEK293T-ACE2-TMPRSS2/ HEK293T-DPP4 до конечной концентрации от 5 до 250 мкМ в 96-луночный планшет, затем вносили по 50 мкл псевдовирюса ($\sim 2 \times 10^6$ RLU/мл) и инкубировали 1 час при температуре 37 °С и 5 % CO_2 . После добавляли по 100 мкл суспензии клеток (100 тыс кл/мл), планшеты инкубировали 48 ч при температуре 37 °С, 5% CO_2 . Уровень люминесценции измеряли, как описано в разделе 2.2.12. Процент нейтрализации каждого образца вычислялся как отношение между значениями сигнала тестовых лунок (соединение+псевдовирюс+клетки) и контролем вируса (псевдовирюс+клетки). Значения IC_{50} вычисляли, используя программу GraphPad Prism.8.

Нейтрализующую активность антител оценивали аналогичным образом. Серийные разведения антител (Nb6, W25, MR191) готовили в DMEM/F12 с 2% FBS, добавляли псевдовирюс SARS-CoV-2 (штамм Wuhan-Hu-1) и инкубировали 1 ч при 37 °С. Затем смесь вносили в лунки с клетками HEK293T-ACE2-TMPRSS2 (100 тыс. кл/мл) и через 48 ч измеряли люминесценцию.

2.2.16. Получение стабильного клеточного продуцента на основе HEK293T

Клетки HEK293T высевали на 96-луночные культуральные планшеты ($\sim 5 \times 10^4$ клеток/лунку). При достижении 70-80% конфлюэнтности клеточной культуры, культуральную среду заменяли на DMEM/F12, содержащий 2% FBS. Через час проводили трансфекцию конструкцией pVEAL3 и плазмидой pCMV-SB100, кодирующей транспозазу SB100, с использованием реагента Lipofectamine 3000. Через 72 часа после трансфекции в культуральную среду добавляли селективный антибиотик пурамицин в конечной концентрации 3 мкг/мл. Через 72 часа заменяли среду на DMEM/F12, содержащий 2% FBS и пурамицин. Через неделю культивирования с антибиотиком, клетки рассеивали в 96-луночные планшеты методом предельных разведений, с использованием среды DMEM/F12, содержащей 10% FBS и пурамицин. Планшеты инкубировали при температуре 37 °C и 5 % CO₂. Через две недели визуально анализировали наличие единичных колоний в лунках, моноклоны переносили в 24-луночный планшет для дальнейшего культивирования.

2.2.17. Твердофазный иммуоферментный анализ

В лунках 96-луночных планшетоов сорбировали белок рецептор-связывающий RBD домен S или полноразмерный поверхностный белок S штаммов Wuhan-Hu-1 или Delta в концентрации 150 нг/лунку в 0,01 М фосфатном-солевом буфере (PBS, pH 7,2), инкубировали в течение 18 часов при температуре +4°C. Затем планшеты промывали буфером PBS-T (0,1% Tween-20 в PBS) и блокировали 1% казеина в PBS-T 1 ч при 37 °C. В лунки добавляли растворы соединений в ДМСО (в концентрации 10 мг/мл) разбавленные фосфатным-солевым буфером до концентрации 500 мкг/мл и инкубировали 1 ч при 37 °C. После трехкратной промывки PBS-T добавляли ACE2 меченный пероксидазой хрена в разведении 1/500 в блокирующем буфере и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Лунки снова промывали и добавляли 50 мкл раствора субстрата ТМВ. После 15 минут реакцию останавливали 50 мкл 1М HCl и измеряли оптическую плотность при 450 нм с использованием мультимодального ридера VarioskanLux.

2.2.18. Анализ уровня экспрессии гена, кодирующего TMPRSS2

Тотальную РНК из клеток HEK293T-ACE2-TMPRSS2 выделяли с использованием набора для выделения РНК (Биолабмикс, Россия) согласно протоколу производителя. Для удаления геномной ДНК образцы обрабатывали ДНКазой I (Биолабмикс, Россия): реакционная смесь содержала 1 мкг РНК, 1 мкл ДНКазы I, 10× буфер и воду до общего объема 20 мкл; инкубировали 20 мин при 25 °C, затем инактивировали ДНКазу нагреванием при 70°C в течение 10 мин. Концентрацию РНК повторно измеряли на NanoDrop One

(Thermo Scientific, США). Обратную транскрипцию и амплификацию проводили в одну стадию с использованием набора БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ (2×) (Биолабмикс, Россия) согласно протоколу производителя. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 12,5 мкл 2× БиоМастер-микса (включает обратную транскриптазу и ДНК-полимеразу), праймеры и TaqMan-зонды для TMPRSS2 (TMS2-F, TMS2-R и TMS2-Z) и для контрольной мишени GAPDH (GAPDH-F, GAPDH-R и GAPDH-Z), 2 мкл РНК (~100 нг), остальное деионизированная вода. Амплификацию проводили на приборе QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Scientific, США) по программе: 45 °C – 15 мин (обратная транскрипция), 95 °C – 5 мин; 40 циклов: 95 °C – 15 с, 60 °C – 1 мин. Уровень мРНК TMPRSS2 рассчитывали методом $\Delta\Delta C_t$ с нормировкой на GAPDH относительно контрольных клеток HEK293T.

2.2.19. Анализ экспрессии рецепторов ACE2 и DPP4 методом проточной цитофлуориметрии

Наличие рецепторов ACE2 и DPP4 на поверхности полученных моноклональных клеточных линий HEK293T, HEK293T-ACE2, HEK293T-ACE2-TMPRSS2 и HEK293T-DPP4 оценивали методом проточной цитофлуориметрии. Клетки снимали с культурального пластика раствором трипсин-версен, дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS, pH 7,4), и подсчитывали концентрацию. Аликвоты по 1×10^6 клеток инкубировали с первичными моноклональными антителами к ACE2 или к DPP4 в течение 30 мин при 4 °C в темноте. После инкубации клетки промывали PBS и добавляли вторичные антитела, конъюгированные с APC (мышинные моноклональные антитела к F(ab)₂). Инкубировали 30 мин при 4 °C в темноте, затем промывали и ресуспендировали в 300 мкл PBS. В качестве отрицательного контроля использовали нетрансфицированные клетки HEK293T.

Анализ проводили на проточном цитометре ZE5 (Bio-Rad, США). Долю клеток, экспонирующих целевой рецептор, определяли по порогу флуоресценции, установленному по отрицательному контролю. Обработку данных выполняли с использованием встроенного программного обеспечения прибора. Уровень экспрессии рецепторов оценивали как процент положительных клеток в общей популяции.

2.2.20. Оценка противовирусной активности соединений против вирусов SARS-CoV-2

Работа с вирусом SARS-CoV-2 проводилась в лаборатории 3-го уровня биологической безопасности. Культуру клеток Vero E6 растили в 96-луночных культуральных планшетах до конфлюентности не менее 90–95%. Вирусный материал

включал различные штаммы SARS-CoV-2 с титрами инфекционности 5,5–7,0 lg TCID₅₀/мл, выращенные в культуре Vero E6. Определение ингибирующих концентраций (IC₅₀) соединений было проведено в тесте подавление цитопатического действия вируса на монослой культур клеток.

Тестируемые соединения растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) до концентрации 10 мг/мл и готовили серийные трехкратные понижающиеся разведения, начиная с 300–600 мкг/мл. В экспериментах использовали вирус с множественностью заражения (MOI) 0,01, что соответствует 100 TCID₅₀ на лунку. Для оценки ингибирующей активности и токсичности соединений применяли параллельный подход: в монослой клеток добавляли разведения соединений, после чего в часть лунок вносили поддерживающую среду без вируса (для определения токсичности), а в другую часть — среду с вирусом (для оценки ингибиторной активности).

Культуральные планшеты инкубировали при 37 °C в течение 4 дней. После инкубации проводили окрашивание клеток по протоколу МТТ. Результаты регистрировали с помощью Thermo Scientific Multiskan FC. Обработку данных выполняли в программе SOFTmax PRO 4.0 с использованием 4-параметрической аппроксимации. На основании полученных данных рассчитывали концентрацию, вызывающую 50% ингибирование вируса (IC₅₀), а также индекс селективности (SI), определяемый как отношение токсической концентрации соединения к его ингибиторной активности. В качестве контрольного препарата использовали ремдесивир.

2.2.21. Молекулярный докинг

Все расчёты по подготовке лигандов и белковых структур, молекулярному докингу и динамическому моделированию проводились в среде Schrodinger Small Molecule Drug Discovery Release 2021–3. Координаты кристаллической структуры S-белка SARS-CoV-2 (PDB ID: 7BNM) были получены из базы Protein Data Bank. Перед дальнейшими вычислениями модель обработали с использованием модуля *Protein Preparation Wizard*: были добавлены отсутствующие атомы водорода и уточнена сеть водородных связей, восстановлены недостающие боковые цепи аминокислот, проверены порядки связей, удалены молекулы воды и посторонние лиганды, а также проведена ограниченная минимизация в силовом поле OPLS3e. Структуры лигандов с учётом стереохимии были построены и оптимизированы с помощью *LigPrep* (OPLS3e); возможные таутомерные состояния определялись модулем *Epik*.

Для молекулярного докинга применялся модуль Glide (режим XP). Рецепторные решётки создавались модулем *Receptor Grid Generation* с учётом вероятного центра (радиус

≤ 20 Å). Полученные комплексы оценивались методом MM-GBSA (*Prime*) с использованием модели сольватации VSGB и силового поля OPLS3e; гибкими считались аминокислотные остатки в пределах 3 Å от лигандов.

2.2.22. Ферментативная кинетика

Для оценки ингибирующей активности в отношении основной протеазы SARS-CoV-2 (3CLpro) и дипептидилпептидазы-4 (DPP4) использовали показатель IC_{50} . Флуоресценция возникала в результате ферментативного расщепления флуорогенных пептидных субстратов: Dabcyl-KTSAVLQ↓SGFRKM-E(Edans)-NH₂ — для протеазы 3CLpro и Gly-Pro↓AMC — для протеазы DPP4. Сигнал регистрировали на микропланшетном ридере CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Германия) при длинах волн возбуждения 355 нм и эмиссии 460 нм в режиме кинетического сканирования. Реакционные смеси, содержащие буфер Tris-HCl, соответствующий флуорогенный субстрат, рекомбинантную протеазу (3CLpro или DPP4) в концентрации 1,25 мкг/мл и тестируемое соединение, инкубировали в 384-луночной планшете в течение 30 мин при 30 °C. Калибровку прибора проводили с использованием раствора пептида, подвергнутого полному гидролизу. Расчет значений IC_{50} выполняли с помощью встроенного программного обеспечения MARS Data Analysis.

2.2.23. Статистический анализ

Данные обработаны с использованием программ GraphPad Prism 8.0 и R (версия 4.2). При сравнении двух независимых групп применяли непарный двусторонний t-тест. Для множественных сравнений (более двух групп) использовали поправку Бонферрони: критический уровень значимости $\alpha' = 0,05 / k$, где k – число парных сравнений в данном семействе. Результаты представлены как среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение (SD) для n независимых экспериментов. Полумаксимальные ингибирующие (IC_{50}) и цитотоксические (CC_{50}) концентрации определяли методом нелинейной регрессии с помощью четырёхпараметрической логистической модели (4PL, «log(inhibitor) vs. response — variable slope») в GraphPad Prism 8.0. Качество аппроксимации оценивали по коэффициенту детерминации R^2 и p -значению сравнения регрессионной модели с горизонтальной прямой (F-тест на дополнительную сумму квадратов). Модель считали статистически значимой при $p < 0,05$. Индекс селективности (SI) рассчитывали как отношение CC_{50}/IC_{50} .

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из современных инструментов для изучения процессов вирусного проникновения и скрининга противовирусных соединений является псевдовиральная система. Псевдовирусные частицы несут на своей поверхности гликопротеины исследуемого вируса, что позволяет моделировать такие ключевые этапы, как взаимодействия вируса с клеточным рецептором и его проникновение в клетку, оставаясь при этом репликационно-дефектными и безопасными в работе. Это делает псевдовirusы особенно полезными для исследования патогенных для человека вирусов, включая коронавирусы.

Любая псевдовиральная система включает два ключевых компонента. Первый компонент, набор элементов для сборки вирусных частиц. Он включает генетическую конструкцию, обеспечивающую синтез вирусного поверхностного белка, и систему псевдотипирования. Второй компонент – это клеточная линия, восприимчивая к псевдовиральной инфекции. В ряде случаев вирусные поверхностные белки обладают политропизмом, и специальный подбор клеток не требуется. Однако в ряде случаев эффективность проникновения частиц напрямую зависит от наличия на клетках определенных рецепторов, в этом случае необходимо вести специальный подбор либо конструирование клеточных линий. Эти два компонента формируют псевдовиральную систему, которая служит основой для широкого спектра вирусологических исследований – от оценки нейтрализующей активности антител до скрининга низкомолекулярных соединений.

3.1. Разработка псевдовиральной системы SARS-CoV-2

Для получения псевдовирусных частиц, экспонирующих поверхностный белок S вируса SARS-CoV-2, использовали две системы. Первая, рабдовиральная, на основе вируса везикулярного стоматита (VSV). Вторая, лентивирусная, на основе вируса иммунодефицита человека 1 типа (HIV-1). Общим компонентом обоих подходов псевдотипирования является плазмидная конструкция, содержащая ген поверхностного белка SARS-CoV-2.

3.1.1. Конструирование плазмид, содержащих ген S вируса SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1

Анализ литературных данных показал, что эффективность сборки псевдовирусных частиц SARS-CoV-2 может быть ограничена особенностями структуры S белка [122].

Цитоплазматический участок (СТ) S белка некоторых коронавирусов содержит внутриклеточные сигнальные мотивы удержания, которые важны для включения этого белка в вирионы, их наличие может оказывать негативное влияние на сборку псевдовиральных частиц. Удаление последних а.о. (от 13 до 19 а.о.) повышает эффективность сборки псевдовиральных частиц коронавируса [123]. Эффективность сборки псевдовиральных SARS-CoV-2 также может зависеть от внутриклеточного транспорта S белка к плазматической мембране после его синтеза. На этот процесс способна также влиять лидерная последовательность белка. Ранее показано, что включение сигнальной последовательности из активатора тканевого плазминогена (ТРА) повышает эффективность получения псевдовиральных частиц SARS-CoV [124]. Кроме этого, введение ТРА увеличивало уровень экспрессии гликопротеинов gp120 HIV-1 и H1 вируса гриппа [125], [126]. Учитывая эти данные, был разработан дизайн трех различных вариантов белка S SARS-CoV-2 (рис. 3.1):

1. полноразмерный белок S (плазмида ph-S);
2. усеченный вариант белка S с делецией 18 С-концевых аминокислот (плазмида ph-SΔ18);
3. белок S с заменой нативной лидерной последовательности на сигнальную последовательность ТРА и делецией 18 С-концевых аминокислот (плазмида ph-lid-SΔ18).

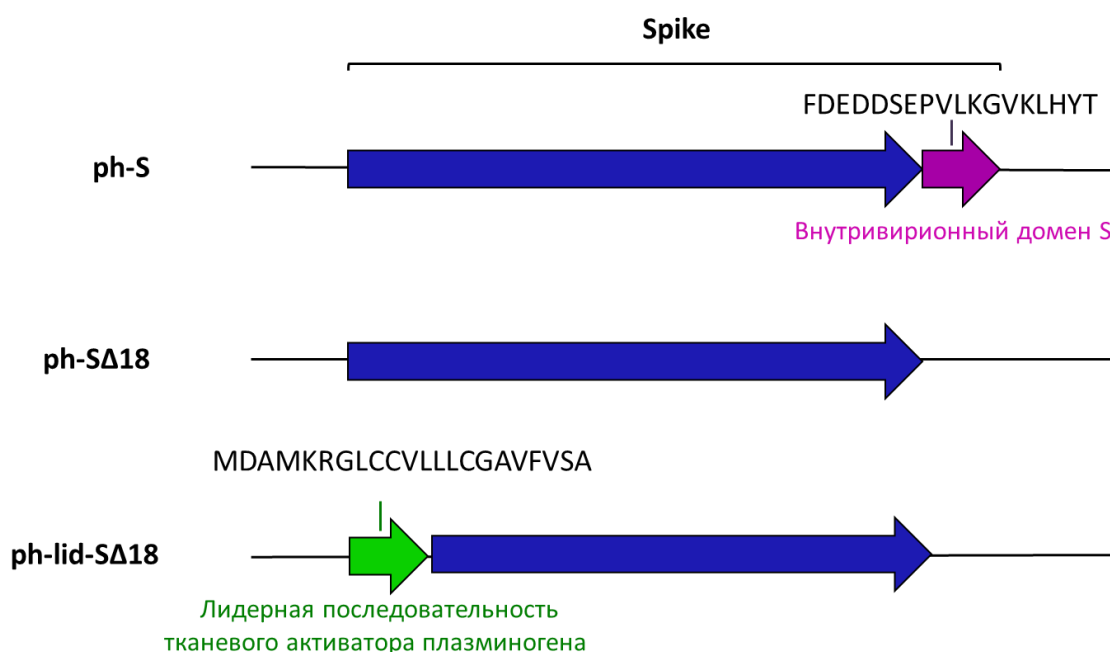


Рисунок 3.1. Схематическое представление участка экспрессионного вектора в области гена, кодирующего поверхностный белок S.

Нуклеотидная последовательность гена полноразмерного белка (1273 а.о.) S SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1, GenBank (GB:MN908947) была оптимизирована по кодонному составу для клеток млекопитающих с помощью онлайн-сервиса GeneOptimizer от ThermoFisher и синтезирована в научно-производственной компании «ДНК-Синтез» (Россия, г. Москва). В качестве экспрессионного вектора была выбрана коммерчески доступная плазмидная конструкция phMGFP. Нуклеотидную последовательность гена S белка, амплифицированную с использованием праймеров S-R и S-F, встраивали в вектор phMGFP по сайтам рестрикции AsuNHI и CciNI (рис. 3.2).

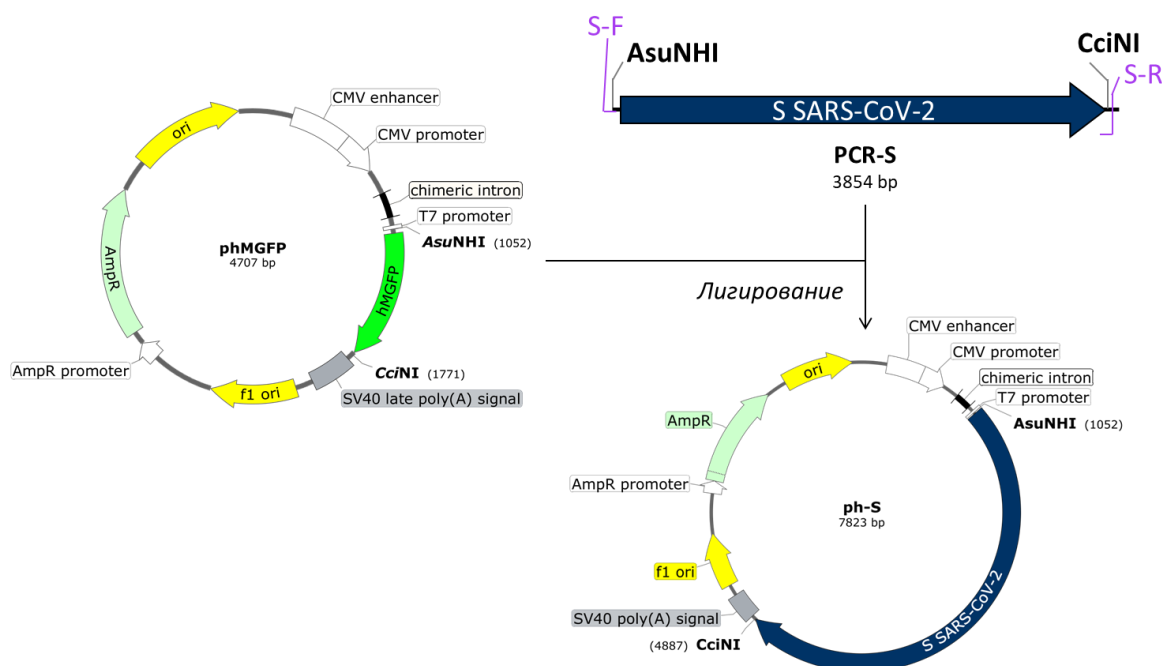


Рисунок 3.2. Схема получения рекомбинантной плазмиды ph-S, кодирующей ген поверхностного белка S.

Для получения конструкции ph-SΔ18 с использованием праймеров Sd18-F и Sd18-R амплифицировали усеченный вариант гена S без последних 54 нуклеотидов (кодирующих фрагмент цитоплазматического домена). Клонирование гена SΔ18 в составе вектора ph-S проводили по сайтам рестрикции AsuNHI и AsiGI.

Для конструирования плазмиды ph-lid-SΔ18 методом ПЦР были амплифицированы два фрагмента гена S: первый фрагмент (983 п.н.) с использованием праймеров Тра-F и Тра-R и второй фрагмент (3783 п.н.) с использованием праймеров lid_Sd18-F и lid_Sd18-R. Данные ампликоны использовали в ПЦР с перекрывающимися праймерами (Тра-F и lid_Sd18-R), полученный ПЦР – продукт (4766 п.н.) был встроен в вектор phMGFP по сайтам рестрикции AhiI и CciNI (рис. 3.3).

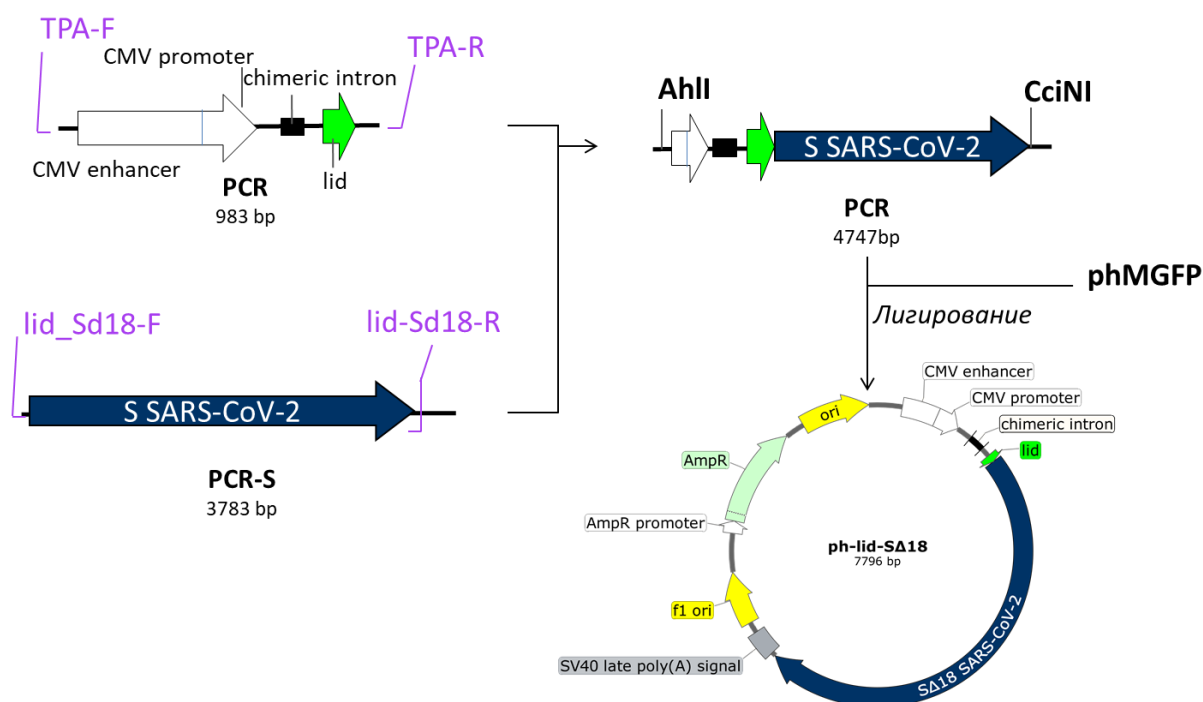


Рисунок 3.3. Схема получения рекомбинантной плазмиды ph-lid-SA18, кодирующей ген поверхностного белка S с заменой нативной лидерной последовательности на сигнальную последовательность TPA и делецией 18 С-концевых аминокислот.

Полученные плазмиды верифицировали рестрикционным анализом с использованием рестриктаз ZrmI, PspPPI и MfeI. Результаты рестрикционного анализа представлены на рисунке 3.4.

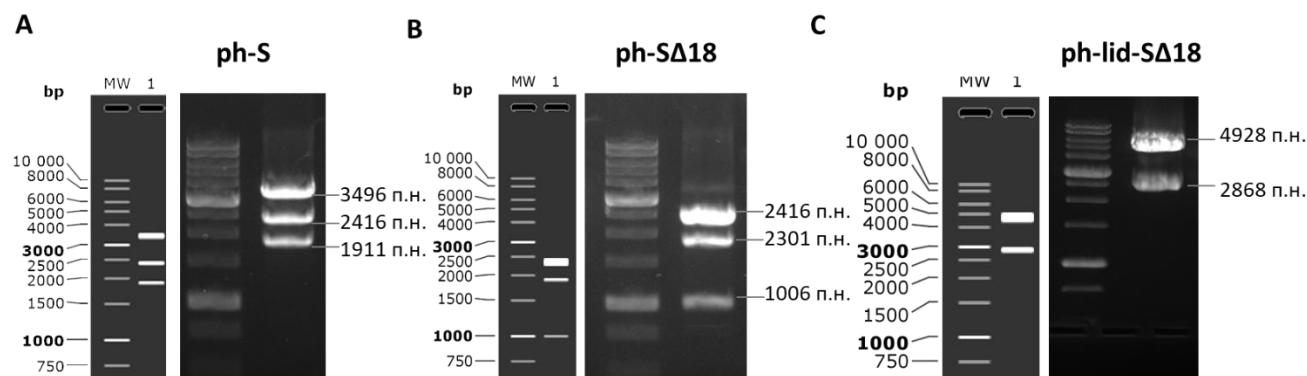


Рисунок 3.4. Сравнение теоретически рассчитанных и экспериментально полученных электрофореграмм фрагментов рестрикции в 1% агарозном геле. Длины фрагментов указаны в п.н. В качестве маркера длин фрагментов использован ДНК-маркер M12 1 Kb (13 фрагментов размером от 0,25 до 10 Kb). **А:** теоретически рассчитанные и экспериментально полученные продукты гидролиза плазмиды ph-S рестриктазой ZrmI; **В:** теоретически рассчитанные и экспериментально полученные продукты гидролиза плазмиды ph-SA18 рестриктазами PspPPI и ZrmI; **С:** теоретически рассчитанные и экспериментально полученные продукты гидролиза плазмиды ph-lid-SA18 рестриктазой MfeI.

Целостность всех полученных нуклеотидных последовательностей (ph-S, ph-SA18, ph-lid-SA18) была подтверждена при помощи секвенирования по методу Сэнгера.

Секвенирование плазмидных конструкций было проведено в ЦКП «Геномика», Новосибирск. В Приложении 1 представлены фрагменты секвенограмм.

3.1.2. Выбор системы сборки

Следующим этапом работы было получение псевдовиральных частиц, экспонирующих на своей поверхности S белок SARS-CoV-2. Схематическое изображение элементов, необходимых для сборки лентивирусных и рабдовиральных псевдовиральных частиц, представлено на рисунке 3.5.

Процедура получения частиц на основе VSV включала два этапа. На первом, проводили трансфекцию клеток HEK293T плазмидой, содержащей ген поверхностного белка. На втором, спустя 16-20 часов к клеткам добавляли препарат рекомбинантного VSV-ΔG(G), в котором ген поверхностного белка G заменен на ген люциферазы светлячка. Препарат VSV-ΔG(G) был любезно предоставлен к.б.н. А.В. Зыбкиной. Урожай псевдовиральных частиц собирали на 2-3-й день после трансфекции клеток.

Для лентивирусной системы сборки третьего поколения использовали плазмиды: репортерную pLV и упаковочную psPX2. Процедура получения частиц на основе лентивируса заключалась в ко-трансфекции клеток HEK293T тремя плазмидами: pLV, psPX2 и суперкапсидной (ph-S, ph-SA18, ph-lid-SA18 или ph-G-VSV). Урожай псевдовиральных частиц собирали через 48 ч после трансфекции.

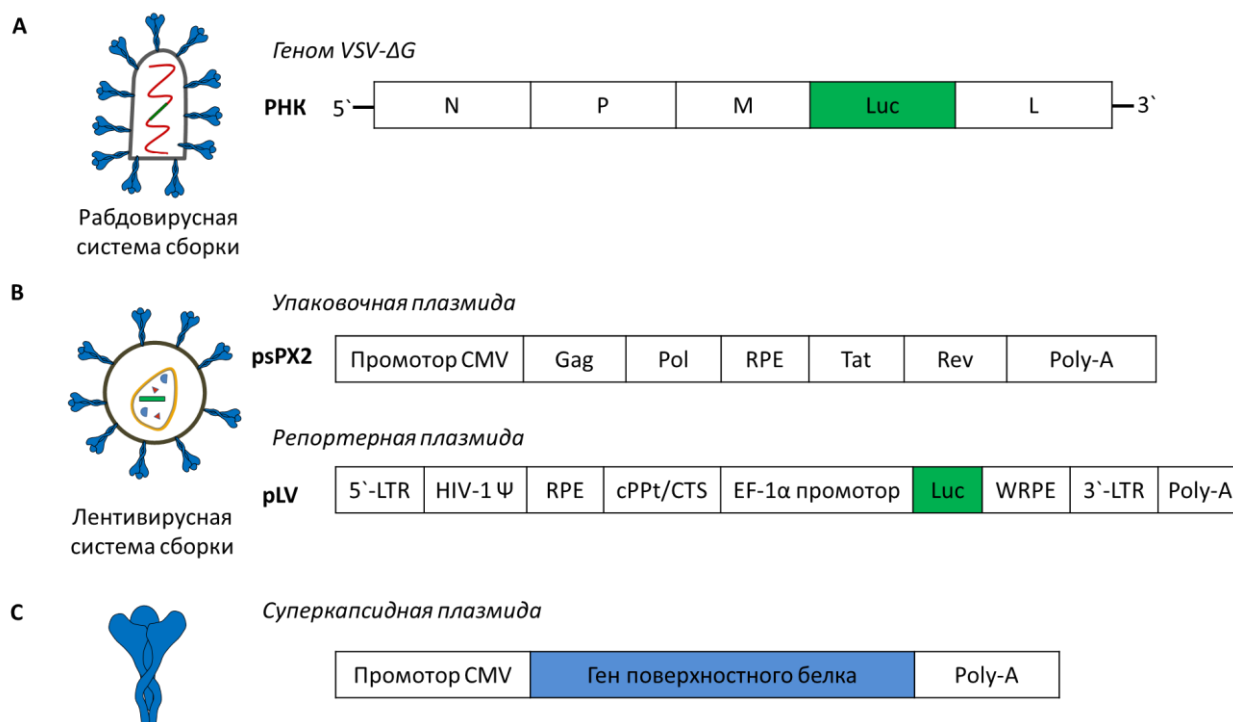


Рисунок 3.5. Элементы для сборки лентивирусных и рабдовиральных псевдовиральных частиц. **А:** РНК рекомбинантного вируса везикулярного стоматита: N - нуклеокапсид, P - фосфопротеин, M - матриксный белок, Luc - люцифераза светлячка, L - полимеразы. **В:** Гены, необходимые для сборки лентивирусных частиц, представленные в составе упаковочной и репортерной плазмид.

Упаковочная: Gag - структурные белки капсида, Pol - ферменты, RRE - Rev-чувствительный элемент экспорта РНК, Tat - активатор транскрипции с LTR-промотор, Rev - транспорт вирусной мРНК из ядра в цитоплазму. Репортерная: 5' LTR - промотор упаковки геномной РНК, HIV-1 Ψ - сигнал упаковки геномной РНК вируса, cPPT/CTS - регуляторный элемент, WPRE - элемент посттранскрипционной регуляции. С: Плаزمид, содержащая ген поверхностного вирусного белка.

С использованием всех трех вариантов плазмид, содержащих гены поверхностного белка S (S, SΔ18, lid-SΔ18), и двух систем сборки были получены псевдовиральные частицы. Функциональную активность частиц оценивали с использованием клеток HEK293T (рис. 3.6.A). Полученные значения сигнала люминесценции находились в диапазоне 1×10^4 – 10^5 RLU. Удаление 18-концевых аминокислот S белка приводило к увеличению эффективности сборки псевдовиральных частиц примерно в 2 раза. Замена нативной лидерной последовательности на сигнальный пептид TPA (конструкция lid-SΔ18) не привела к повышению эффективности сборки псевдовиралов. Для лентивирусной системы уровень сигнала люминесценции для lid-SΔ18 оказался статистически значимо ниже, чем для SΔ18 ($p = 0,0004$). На уровень сигнала влияние также оказывала система сборки, для лентивирусной системы значение RLU в среднем было выше.

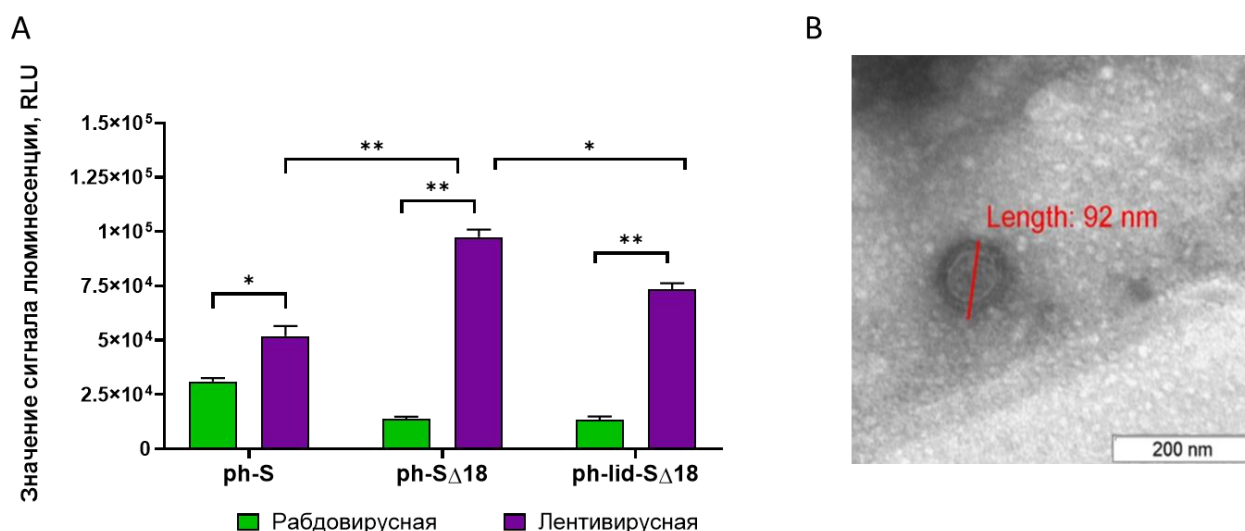


Рисунок 3.6. Функциональный анализ псевдовиральных частиц. **А.** Значение сигнала люминесценции после трансдукции псевдовиральными частицами, несущих поверхностный белок SARS-CoV-2, с использованием конструкций S, SΔ18, lid-SΔ18 и лентивирусных, рабдовирусной системы сборки. Данные представлены как средние $\pm$ стандартное отклонение для трех повторов. Статистическую значимость определяли с помощью непарного t-теста с поправкой Бонферрони для трёх множественных сравнений ($\alpha = 0,0167$). (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ до поправки). После поправки различия между ph-SΔ18 и ph-lid-SΔ18 в лентивирусной системе остаются значимыми ($p = 0,0004$), а в рабдовирусной системе различия между усечёнными вариантами незначимы ($p = 0,71$). **В.** Электронная микрофотография лентивирусных псевдовиральных частиц, несущих поверхностный белок S SARS-CoV-2.

Методом электронной микроскопии была получена микрофотография лентивирусных псевдовиральных частиц (рис 3.6.В). Измерения показали, что их средний диаметр составляет 92 нм, что близко к размерам вирионов SARS-CoV-2 (60–120 нм по

литературным данным). Это подтверждает, что использованная система сборки обеспечивает формирование частиц, близких по размеру к природному вирусу.

В дальнейшей работе были использованы псевдовирусные частицы, собранные с помощью лентивирусной системы и плазмид с архитектурой, подобной ph-SA18.

3.1.3. Конструирование плазмид, содержащих ген S коронавирусов SARS-CoV, MERS-CoV и наиболее эпидемиологически значимых вариантов SARS-CoV-2

На следующем этапе работы на основе оптимальной архитектуры гена S белка была сконструирована расширенная панель плазмид, содержащих гены поверхностных белков представителей семейства *Coronaviridae*, включая SARS-CoV (GB: AAP41037.1), MERS-CoV (GB: MW560956.1), а также наиболее эпидемиологически значимые варианты SARS-CoV-2, включая штаммы Delta (B.1.617.2) (GB: LC728280.1), Omicron (B.1.1.529) (GB: MT380725.1) и XBB.1.5 (GB: MW816500.1). Указанные варианты SARS-CoV-2 были отобраны в соответствии с классификацией ВОЗ, как "варианты, вызывающие беспокойство" (Variants of Concern, VOC) на момент проведения исследования. Они характеризовались повышенной трансмиссивностью, изменённой антигенной структурой и/или способностью частично уклоняться от иммунного ответа [127]. Нуклеотидные последовательности генов были оптимизированы по кодонному составу для экспрессии в клетках млекопитающих и синтезированы в компании «ДНК-Синтез». Клонирование всех вариантов проводили в составе вектора phMGFP по сайтам рестрикции для *AsuNHI* и *CciNI* (для SARS-CoV-2), *XmaI* и *CciNI* (для SARS-CoV и MERS-CoV). Корректность всех полученных конструкций (ph-SA18_Delta, ph-SA18_Omicron, ph-SA18_XBB.1.5, ph-SARS, ph-MERS) подтверждали секвенированием по методу Сэнгера. В Приложении 1 представлены фрагменты секвенограмм.

3.1.4. Получение клеточных линий HEK293T-ACE2, HEK293T-ACE2-TMPRSS2 и HEK293T-DPP4

Важной частью работы стали эксперименты по подбору клеток чувствительных к псевдовирусным частицам SARS-CoV-2, полученных при помощи лентивирусной системы. На первом этапе было решено проверить чувствительность ряда клеток, общедоступных в лабораторных исследованиях. В работе использовали шесть клеточных культур: Caco-2, Vero E6, Tzmb1, HEK293T, Huh7, CHO-K1. Во всех случаях значения сигнала люминесценции не превышали 10 000 RLU (рис. 3.7). В качестве внешнего контроля использовали псевдовирусные частицы, несущие поверхностный гликопротеин G вируса VSV. Этот белок обладает выраженной политропностью, обеспечивая эффективное

проникновение в клетки самых разных видов и тканей за счёт взаимодействия с широко представленными мембранными фосфолипидами и рецепторными структурами. Для контроля уровень сигнала был значительно выше (1×10^6 - $1,5 \times 10^6$ RLU) на всех тестируемых клеточных линиях.

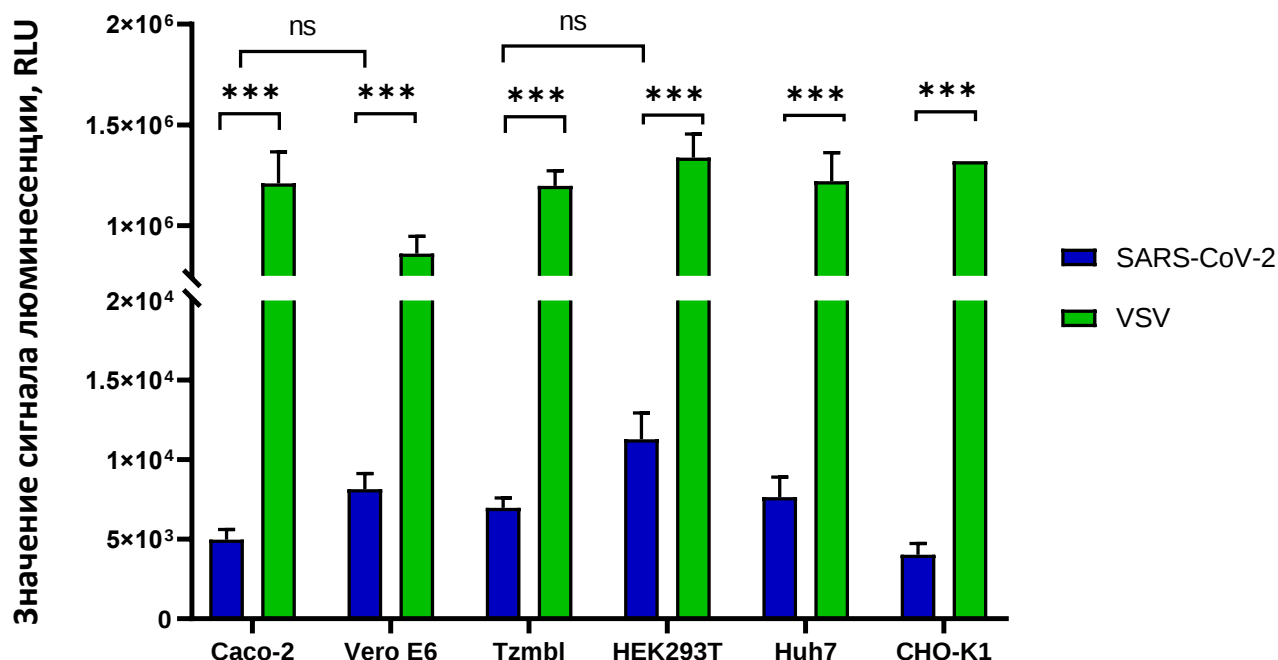


Рисунок 3.7. Трансдуцирующая активность псевдовиральных частиц, экспонирующих поверхностные белки S вируса SARS-CoV-2 и G вируса VSV, на клеточных линиях Caco-2, Vero E6, Tzmb1, HEK293T, Huh7, CHO-K1. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n=3$). Статистический анализ: для каждой линии сравнивали SARS-CoV-2 и VSV с помощью непарного t-теста с поправкой Бонферрони для 6 сравнений ($\alpha' = 0,00833$). Для всех шести линий различия между псевдовиральными частицами SARS-CoV-2 и VSV статистически значимы ($p < 0,0001$). Попарное сравнение уровней люминесценции псевдовиральных частиц SARS-CoV-2 между шестью клеточными линиями (Caco-2, Vero E6, Tzmb1, HEK293T, Huh7, CHO-K1) проводили с помощью непарного t-теста с поправкой Бонферрони на множественные сравнения ($\alpha'=0,0033$).

Данные эксперимента показали, что статистически значимых различий между сигналами, полученными от каждой использованной в эксперименте клеточной линии, не наблюдалось. Анализ транскриптомных данных из публичных баз (GEO, ENCODE) показал низкий уровень базальной экспрессии генов ACE2 и TMPRSS2 в исследуемых клеточных линиях (таблица 2).

Таблица 2. Экспрессия генов рецепторов ACE2 и TMPRSS2 по данным транскриптомного анализа.

Клеточная линия	ACE2 (TPM*)	TMPRSS2 (TPM)	Источник данных
Caco-2	5.2 ± 0.8	<1.0	GSE125616
Vero E6	<0.5	Не детектируется	E-MTAB-9357
TZM-bl	<0.1	<0.5	E-MTAB-7362

HEK293T	1.8 ± 0.3	<1.0	ENCODE
Huh7	2.3 ± 0.4	0.7 ± 0.2	GSE145926

TPM - Transcripts Per Million*

Обращает на себя внимание, что низкая трансдуцирующая активность псевдовиральных частиц SARS-CoV-2, определяемая по уровню сигнала люминесценции коррелирует с низким уровнем экспрессии генов ключевых рецепторов в исследованных клеточных линиях. Поскольку известно, что для проникновения коронавируса в клетку необходимо взаимодействие с соответствующими клеточными рецепторами (в случае SARS-CoV-2 и SARS-CoV — это ACE2, а для MERS-CoV — DPP4), низкий уровень экспрессии генов этих белков будет оказывать влияние на эффективность инфицирования клеток псевдовirusами.

Так как исследуемые клетки не позволили получить достаточные значения уровня люминесценции, было решено получить клеточные линии, устойчиво экспрессирующие гены белков необходимые для входа коронавирусов, это гены - DPP4, ACE2 и TMPRSS2. Для этого были сконструированы интеграционные плазмиды pVEAL3-ACE2, pVEAL3-DPP4, pVEAL4-ACE2-TMPRSS2, содержащие гены ACE2 (GB: OP889272.1), DPP4 (GB: NM_001935.4), TMPRSS2 (GB: NM_001135099.3). Гены клонировали в составе вектора pVEAL3, разработанного ранее в отделе биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора под руководством Щербакова Д.Н. [128] (рис. 3.8). После встройки в вектор pVEAL3 целевые нуклеотидные последовательности оказываются фланкированы участками (плечи интеграции), распознаваемые транспозазой SB100, что обеспечивает эффективную и стабильную интеграцию целевых генов в геном клеток млекопитающих.

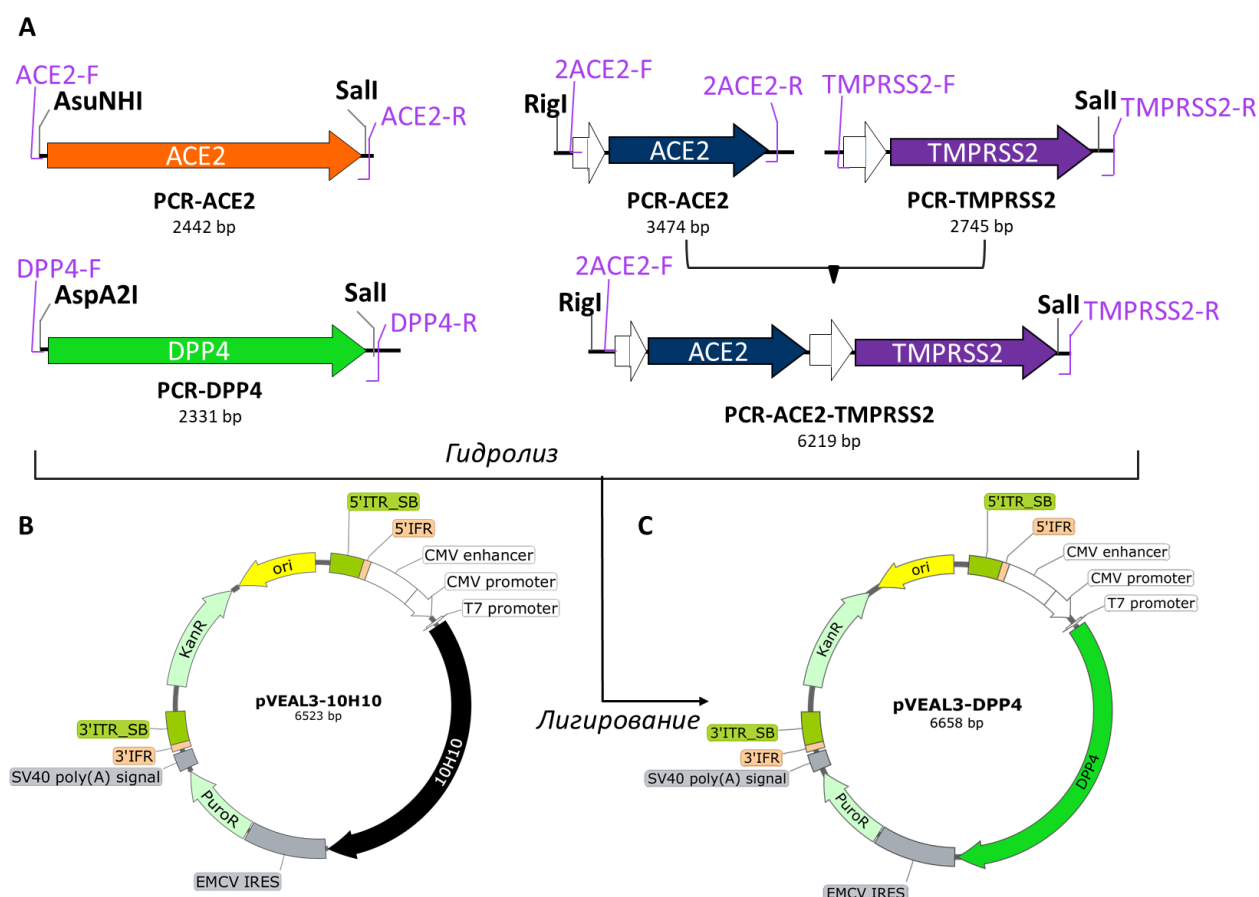


Рисунок 3.8. Общая схема конструирования плазмидных конструкций pVEAL3-ACE2, pVEAL3-DPP4, pVEAL4-ACE2-TMPRSS2, включающая последовательные этапы: ПЦР и гидролиза, лигирования в вектор pVEAL3-10H10 (A). Карта рекомбинантной плазмиды pVEAL3-10H10: EMCV IRES – участок внутренней посадки рибосомы, PuroR – последовательность, кодирующая фактор устойчивости к антибиотику пурамицину, SV40 poly(A) signal – последовательность, необходимую для стабилизации мРНК-транскриптов; KanR – последовательность, кодирующая фактор устойчивости к антибиотику канамицину; 3'ITR_SB и 5'ITR_SB – инвертированные концевые повторы, обеспечивающие связывание с транспозазой SB; 5'IFR и 3'IFR – области, фланкирующие ITR; 10H10 – последовательность, вместо которой были встроены целевые гены (B). Карта рекомбинантной плазмиды pVEAL3-DPP4 (C).

Полученные плазмиды верифицировали рестрикционным анализом с использованием рестриктаз Sfr303I, BamHI, Bsp19I и Psp1214BI. Результаты рестрикционного анализа представлены на рисунке 3.9. Целостность полученных нуклеотидных последовательностей (pVEAL3-ACE2, pVEAL3-DPP4 и pVEAL4-ACE2-TMPRSS2) была подтверждена при помощи секвенирования по методу Сэнгера. В приложении 2 представлены фрагменты секвенограмм.

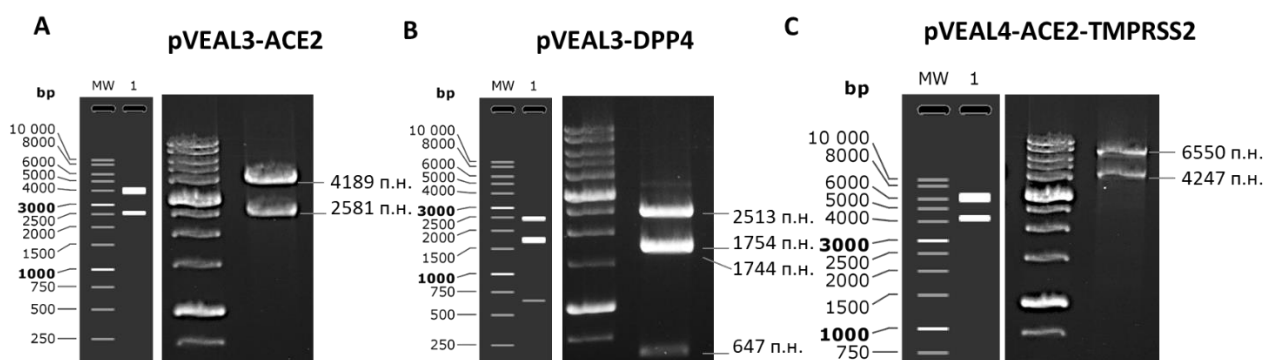


Рисунок 3.9. Сравнение теоретически рассчитанных и экспериментально полученных электрофореграмм фрагментов рестрикции в 1% агарозном геле. Длины фрагментов указаны в п.н. В качестве маркера длин фрагментов использован ДНК-маркер M12 1 Kb (13 фрагментов размером от 0,25 до 10 Kb). **А:** теоретически рассчитанные и экспериментально полученные продукты гидролиза плазмиды pVEAL3-ACE2 рестриктазой Sfr303I; **В:** теоретически рассчитанные и экспериментально полученные продукты гидролиза плазмиды pVEAL3-DPP4 рестриктазами BamHI и Bsp19I; **С:** теоретически рассчитанные и экспериментально полученные продукты гидролиза плазмиды pVEAL4-ACE2-TMPRSS2 рестриктазой Psp1214BI.

Для получения стабильных клеточных культур, экспонирующих рецепторы на своей поверхности, проводили ко-трансфекцию клеток линии HEK293T конструкцией pVEAL3 и плазмидой pCMV-SB100, кодирующей транспозазу SB100, с использованием реагента Lipofectamine 3000. Через 72 часа после трансфекции в культуральную среду добавляли селективный антибиотик пурамицин. Ген устойчивости к пурамицину входит в состав интегрируемой кассеты, что обеспечивает селекцию клеток, содержащих целевую вставку. Для получения моноклональной культуры трансфицированные клетки рассевали в 96-луночную планшете методом предельных разведений. Через две недели клоны клеток отбирали для дальнейшего анализа.

Наличие рецепторов ACE2 и DPP4 на поверхности полученных моноклональных клеточных линий HEK293T-ACE2, HEK293T-ACE2-TMPRSS2 и HEK293T-DPP4 анализировали методом проточной цитофлуориметрии с использованием цитометра ZE5. Для детекции рецепторов применяли неконъюгированные моноклональные антитела к ACE2 и DPP4, с последующей инкубацией с флуоресцентно мечеными вторичными антителами. В качестве отрицательного контроля использовали нетрансфицированные клетки HEK293T. Во всех полученных клеточных линиях наблюдалась высокая специфическая экспрессия целевых рецепторов: более 95% клеток HEK293T-ACE2 и HEK293T-ACE2-TMPRSS2 экспонировали рецептор ACE2, и 98% клеток HEK293T-DPP4 – DPP4 (рис. 3.10). Наличие TMPRSS2 на поверхности клеток HEK293T-ACE2-TMPRSS2 напрямую не анализировали, однако оценили уровень транскрибируемой мРНК TMPRSS2 методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-РВ). Относительный уровень мРНК TMPRSS2 в клетках HEK293T-ACE2-TMPRSS2 был выше

в 1240 ± 150 раз по сравнению с контрольными клетками HEK293T, что подтверждает высокий уровень транскрипции гена TMPRSS2 и позволяют предполагать наличие соответствующего белка на клеточной поверхности.

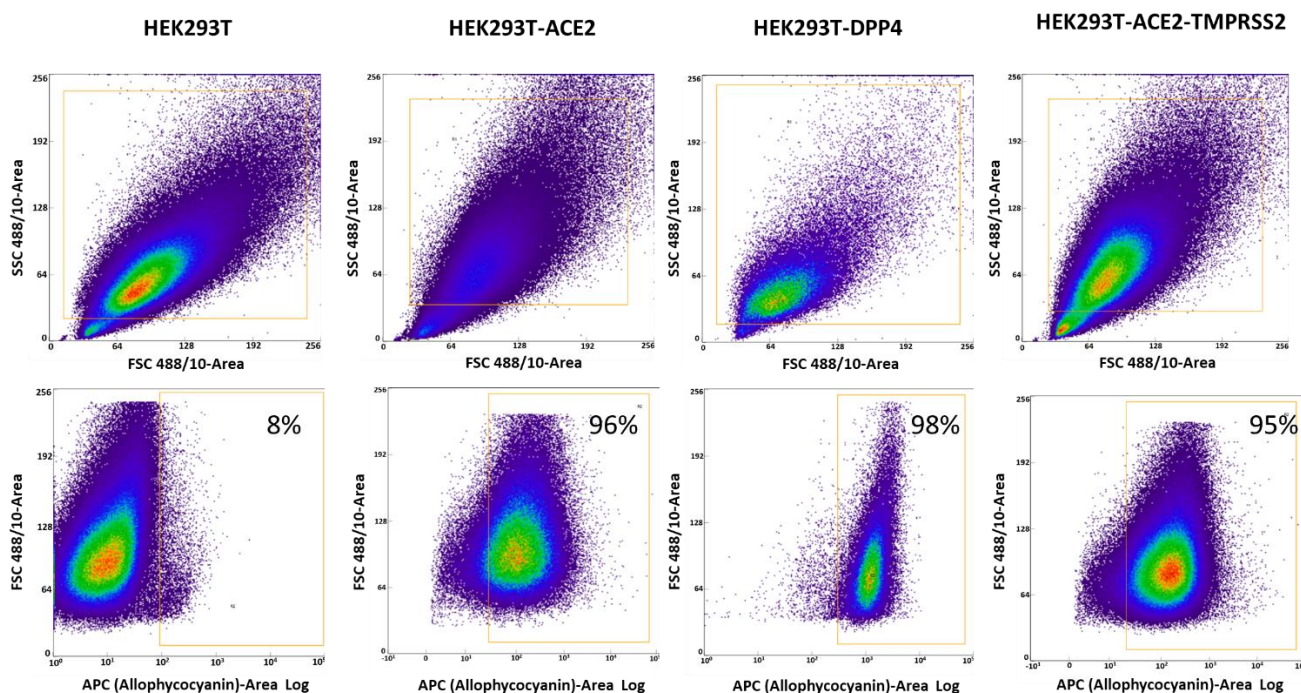


Рисунок 3.10. Данные, полученные с помощью проточного цитофлуориметра. Верхний ряд: распределение клеточной популяции по параметрам прямого (FSC) и бокового (SSC) рассеяния. Нижний ряд: процент представленности рецептора на клеточной культуре.

С использованием полученных клеточных линий анализировали функциональную активность псевдовиральных частиц SARS-CoV-2, SARS-CoV и MERS-CoV (рис. 3.11). Согласно полученным результатам, наибольшая инфекционность псевдовирусов SARS-CoV-2 наблюдалась для клеточной линии HEK293T-ACE2-TMPRSS2. В случае клеток HEK293T-ACE2 инфекционность псевдовирусов была в несколько раз ниже, а в исходных клетках HEK293T практически отсутствовала. Полученные результаты согласуются с опубликованными данными [122], где также отмечалось значительное (в несколько раз) увеличение люминесцентного сигнала псевдовирусов SARS-CoV-2 для клеток, коэкспрессирующих оба белка, по сравнению с клетками, экспрессирующими только ACE2 или только TMPRSS2.

Сигнал люминесценции для псевдовиральных частиц SARS-CoV был ниже (в 6 раз), чем для SARS-CoV-2 и составил в случае клеточной линии HEK293T-ACE2-TMPRSS2 23×10^4 RLU. Высокий сигнал люминесценции детектировали для псевдовиральных частиц MERS-CoV со значением $2,5 \times 10^5$ RLU на клеточной линии HEK293T-DPP4.

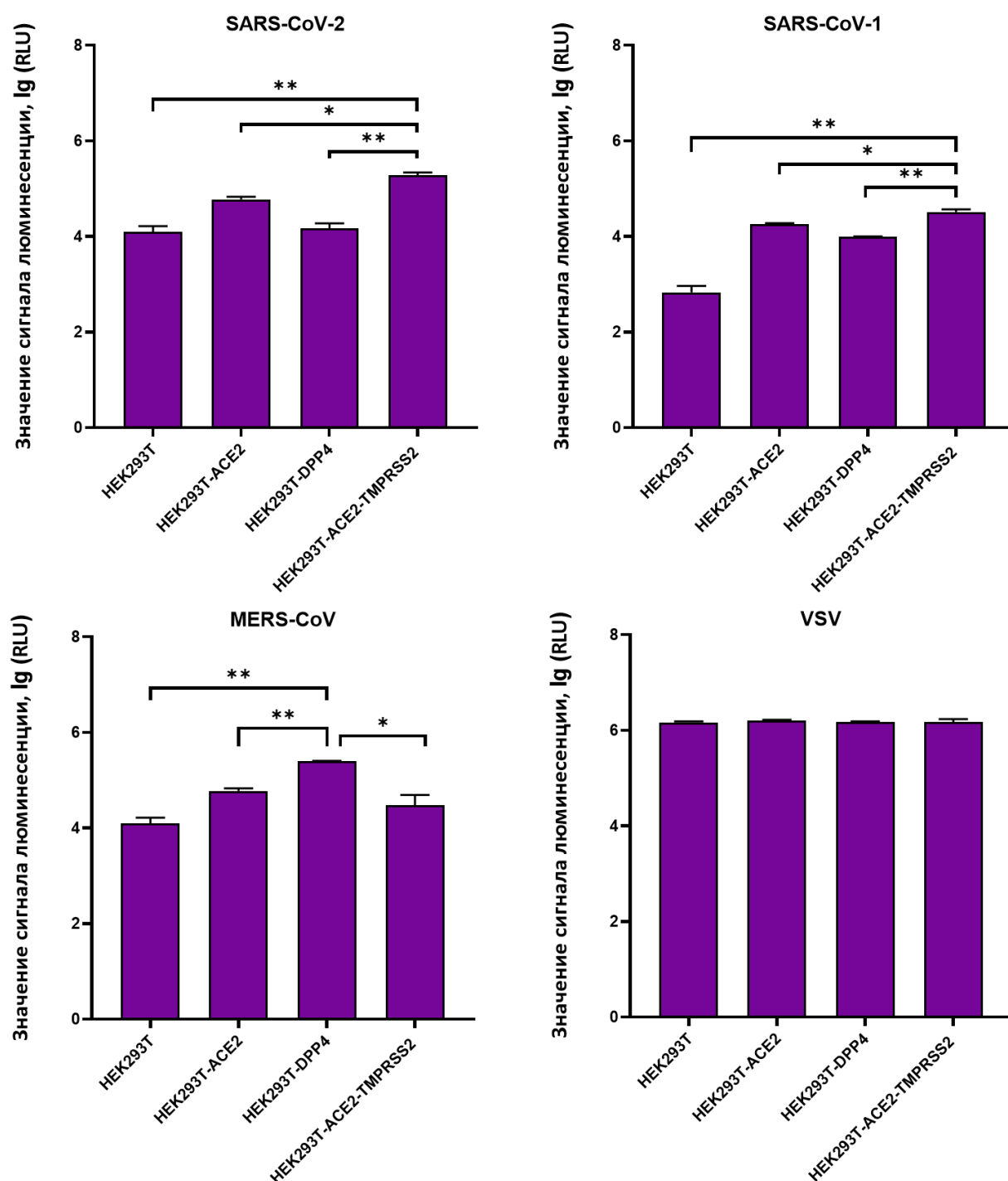


Рисунок 3.11. Значения сигнала люминесценции для псевдовиральных частиц SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, VSV на клеточных линиях HEK293T, HEK293T-ACE2, HEK293T-ACE2-TMPRSS2 и HEK293T-DPP4. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение для трех повторов. Статистическую значимость определяли с помощью непарного t-теста с поправкой Бонферрони для трёх множественных сравнений (критический уровень $\alpha' = 0,017$). (GraphPad Prism). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Клетки HEK293T-ACE2-TMPRSS2 использовали для сравнительного анализа функциональной активности псевдовиральных частиц SARS-CoV-2, содержащих разные варианты S белка штаммов Wuhan-Hu-1, Delta, Omicron, XBB.1.5. Несмотря на отсутствие

статистической значимости различий, для частиц псевдотипированных S белком штамма Omicron наблюдали несколько большую трансдуцирующую активность (рис. 3.12).

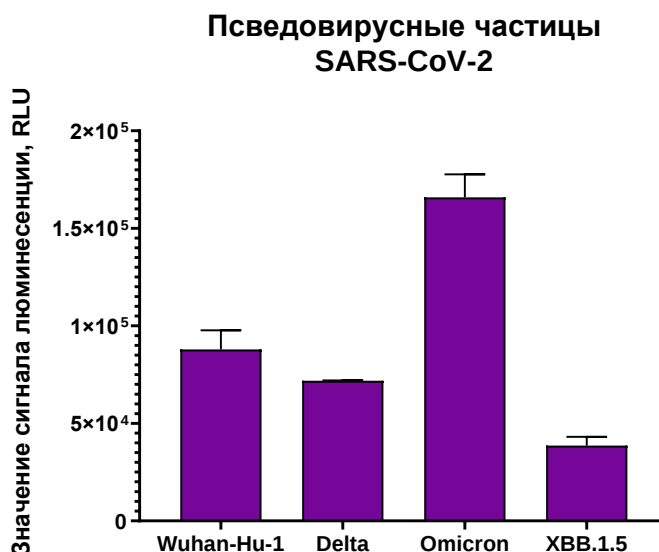


Рисунок 3.12. Трансдуцирующая активность псевдовиральных частиц, экспонирующих поверхностные белки S вируса SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1, Delta, Omicron, XBB.1.5. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение для трех повторов. Статистическую значимость различий между всеми парами штаммов оценивали с помощью непарного t-теста с поправкой Бонферрони для 6 множественных сравнений ($\alpha' \approx 0,0083$). Статистически значимых различий не обнаружено (скорректированное $p > 0,0083$ для всех сравнений).

3.1.5. Изучение антигенных свойств псевдовиралов SARS-CoV-2

Для подтверждения антигенных свойств полученных псевдовиральных частиц были использованы два рекомбинантных моноклональных антитела – Nb6 и W25 [129], [130]. Nb6 представляет собой рекомбинантное однодоменное наноантитело, специфически распознающее S белок SARS-CoV-2 в закрытой конформации RBD. W25 обладает нейтрализующей активностью в отношении широкого спектра вариантов SARS-CoV-2. В качестве отрицательного контроля было выбрано полноразмерное антитело MR191, специфично связывающееся с гликопротеином GP вируса Марбург (рис 3.13) [131].

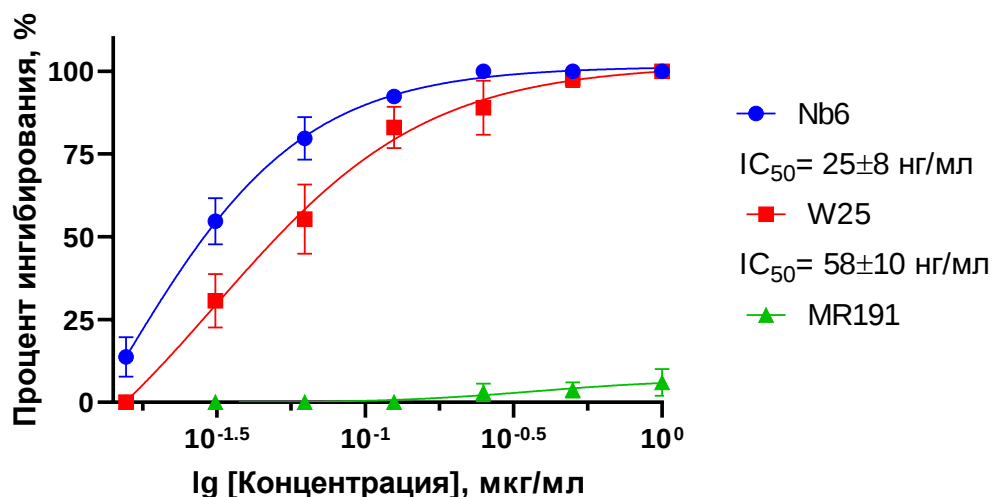


Рисунок 3.13. Кривые нейтрализации лентивирусных псевдовиральных частиц SARS-CoV-2 (штамм Wuhan-Hu-1) рекомбинантными антителами Nb6 и W25. В качестве отрицательного контроля использовали полноразмерное антитело MR191, специфичное к гликопротеину GP вируса Марбург. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 3$). Аппроксимация выполнена четырёхпараметрической логистической моделью (4PL) в GraphPad Prism 8.0. Параметры регрессии: для Nb6: $R^2 = 0,9855$, Hill slope = $-1,18 \pm 0,09$, p (модель) $< 0,0001$; для W25: $R^2 = 0,9750$, Hill slope = $-1,07 \pm 0,12$, p (модель) = $0,0003$; для MR191: $R^2 = 0,6229$, $p = 0,68$ (не значимо).

В результате проведенного анализа было показано, что оба антитела демонстрируют дозозависимую нейтрализацию псевдовирусов SARS-CoV-2 штамм Wuhan-Hu-1. В то же время в присутствии антитела MR191 нейтрализации не наблюдалось (рис. 3.13). Полученные данные свидетельствуют о том, что полученные псевдовиральные частицы несут функционально активный S белок в нативной конформации, сохраняющий антигенную структуру RBD домена.

3.2. Тестирование библиотек соединений

Следующим этапом исследования стало тестирование низкомолекулярных ингибиторов с использованием разработанной псевдовиральной системы. В рамках данной работы была проведена оценка противовирусной активности широкого спектра соединений, включающих: производные различных терпеноидных и стероидных скелетов, производные усниновой кислоты, а также производные адамантана, содержащие монотерпеновые фрагменты. Библиотеки природных производных соединений были получены от лаборатории физиологически активных веществ и лаборатории направленных трансформаций природных соединений Новосибирского института органической химии (НИОХ СО РАН). Чистота и структура тестируемых соединений подтверждены методами газожидкостной хромато-масс-спектрометрии (ГЖХ-МС) и ЯМР-спектроскопии, а также другими физико-химическими и спектральными методами.

3.2.1. Тестирование производных терпеноидов

Одним из перспективных классов природных органических соединений для создания противовирусных препаратов являются терпеноиды, которые широко распространены в природе, обладают базовой низкой токсичностью, отличаются разнообразием структуры и биологической активности. Терпеноиды обладают противоопухолевым, противовоспалительным, антибактериальным, противовирусным, противомаларийным действием, способствуют трансдермальному всасыванию, профилактике и лечению сердечно-сосудистых заболеваний и обладают гипогликемической активностью.

В связи с этим для первичного скрининга на противовирусную активность против SARS-CoV-2 были отобраны соединения, представляющие собой производные различных терпеноидных и стероидных скелетов. В исследование включены следующие группы соединений (табл. 3, структуры веществ приведены в приложении 3).

Таблица 3. Классы соединений, использованных в тестировании.

Номер	Класс соединений	Кол-во	Номера в приложении 3
1.	Имино и аминок производные камфоры	5	1-5
2.	Сложноэфирные производные борнеола	24	6-29
3.	Амиды на основе изоборниламина	6	30-35
4.	Гетероциклические производные 10-камфоросульфокислоты	3	36-38
5.	Борнанные производные тиазолидин-4-она	4	39-42
6.	Стероидные соединения	5	43-47
7.	Пентациклические тритерпеноиды	2	48-49
8.	Производные адамантана	6	50-55
9.	Спироциклические производные камфоры и фенхона	4	56-59
10.	Производные смоляных кислот	3	60-62
11.	Склареол и его производное	2	63-64
12.	Сложноэфирные производные (+)-фенхола	9	65-73

Выбор этих соединений был также обусловлен наличием ранее описанной ингибирующей активности в отношении марбургвируса, эболавируса, вируса гриппа и осповакцины. Для предварительной оценки лекарственного подобия все соединения были

проанализированы на соответствие правилу Липинского «пяти». Согласно данному правилу, соединение считается лекарственноподобным, если оно нарушает не более одного из следующих критериев: молекулярная масса < 500 Да, коэффициент распределения октанол/вода ($\log P$) < 5 , число доноров водородных связей ≤ 5 и число акцепторов водородных связей ≤ 10 . Отобранные соединения в целом удовлетворяют этим требованиям, что свидетельствует о наличии у них потенциальных фармакокинетических характеристик, необходимых для рассмотрения в качестве кандидатов в противовирусные препараты.

Для всех соединений была исследована цитотоксичность для клеточной линии HEK293T-ACE2-TMPRSS2, определена их 50% цитотоксическая концентрация (CC_{50}). Исследование противовирусной активности проводили с использованием полученных лентивирусных частиц, экспонирующих на своей поверхности белок S вируса SARS-CoV-2. Для подавляющего большинства соединений была определена полуингибирующая концентрация (IC_{50}) - концентрация вещества, вызывающая снижение инфекции на 50% по сравнению с контролем. На основании полученных значений IC_{50} и CC_{50} был рассчитан индекс селективности (SI), отражающий отношение между цитотоксичностью и противовирусной активностью, (см. Приложение 3). Согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», перспективный кандидат для противовирусной терапии должен характеризоваться высоким значением CC_{50} , низким IC_{50} и индексом селективности $SI > 8$ [132], [133].

В качестве препарата сравнения был использован коммерчески доступный противовирусный агент «Арбидол» (умифеновир), относящийся к ингибиторам проникновения вирусов. В проведённом исследовании «Арбидол» демонстрировал умеренную противовирусную активность в модели псевдовirusного проникновения: значение IC_{50} составило 7 мкМ, при индексе селективности $SI = 3$ (рис. 3.14). Полученные данные согласуются с литературными наблюдениями о низкой эффективности умифеновира в клеточных моделях SARS-CoV-2 [134],[135].

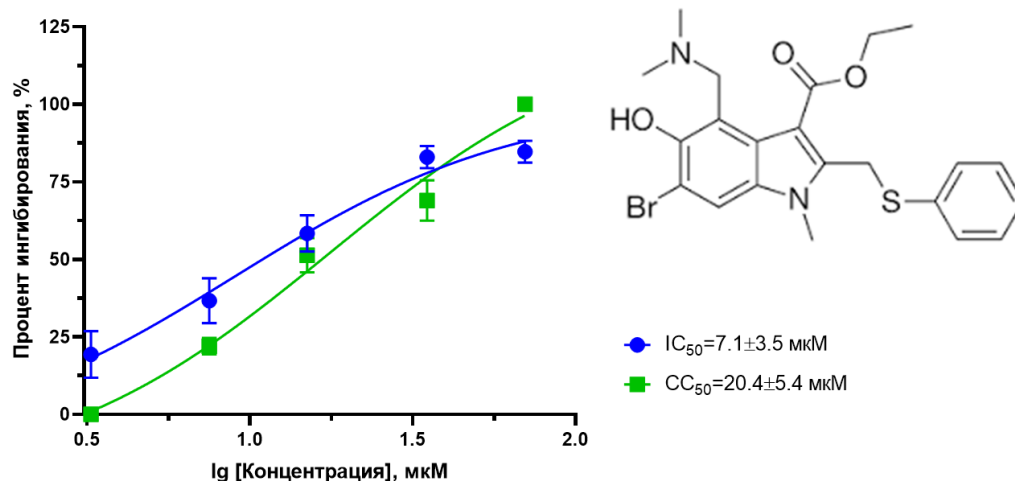


Рисунок 3.14. Зависимость степени ингибирования проникновения псевдовирюсов SARS-CoV-2 (IC_{50}) и цитотоксичности (CC_{50}) от концентрации «Арбидола». Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n=3$). Аппроксимация выполнена четырёхпараметрической логистической моделью (4PL) в GraphPad Prism 8.0. Параметры регрессии для кривой ингибирования: $R^2 = 0,965$, Hill slope = $-1,28 \pm 0,31$, p (модель) = 0,002. Для кривой цитотоксичности: $R^2 = 0,712$, Hill slope = $-1,84 \pm 0,84$, $p = 0,041$.

Структуры наиболее активных соединений, продемонстрировавших значительную ингибирующую активность, представлены на рисунке 3.15, а их значения IC_{50} и CC_{50} приведены в таблице 4 и рисунке 3.16. Анализ полученных данных показал, что большинство исследованных соединений не проявили активность или имели низкий индекс селективности ($SI < 8-9$) в отношении псевдовирюсных частиц SARS-CoV-2. В частности, не были выявлены активные соединения среди следующих групп: производных имино- и аминокамфоры (1-5), 10-камфоросульфокислоты (36-39), стероидные соединения (43-47), пентациклические тритерпеноиды (48-49), производные смоляных кислот (60-61).

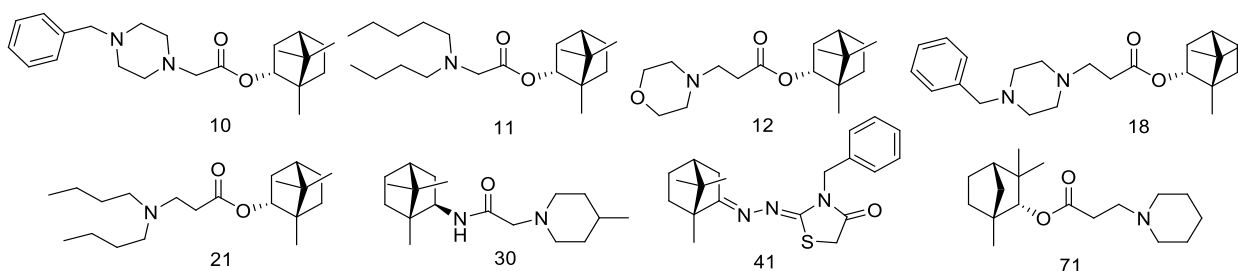


Рисунок 3.15. Структуры наиболее активных природных производных в отношении псевдовирюсных частиц SARS-CoV-2.

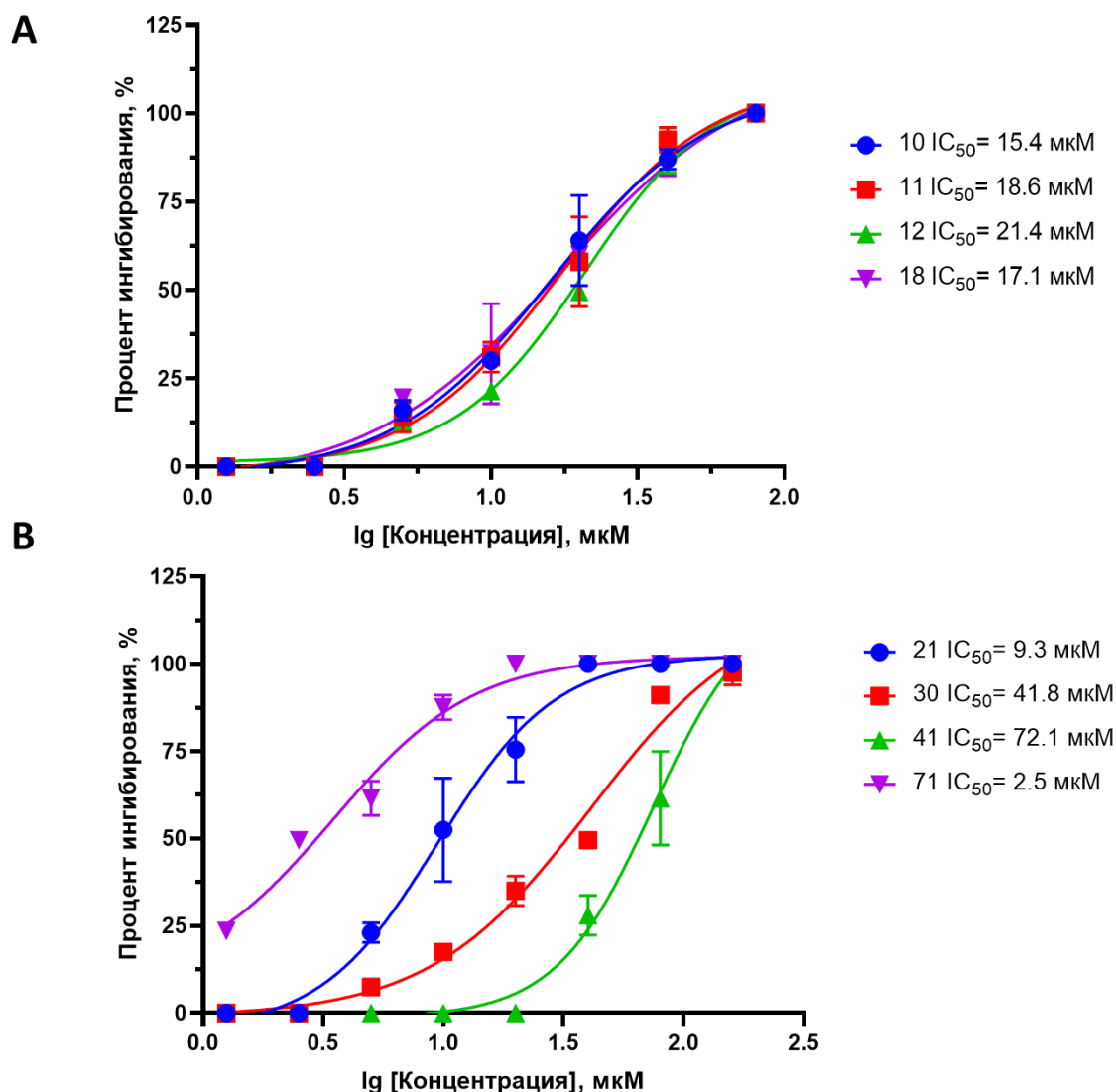


Рисунок 3.16. Зависимость степени ингибирования проникновения псевдовирюсов SARS-CoV-2 соединениями **10**, **11**, **12**, **18** (A) и **21**, **30**, **41**, **71** (B). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n=3$). Аппроксимация выполнена четырёхпараметрической логистической моделью (4PL) в GraphPad Prism 8.0. **10**: $R^2 = 0,995$, Hill slope = $-1,31 \pm 0,11$, $p < 0,0001$; **11**: $R^2 = 0,993$, Hill slope = $-1,23 \pm 0,13$, $p < 0,0001$; **12**: $R^2 = 0,996$, Hill slope = $-1,44 \pm 0,10$, $p < 0,0001$; **18**: $R^2 = 0,990$, Hill slope = $-1,08 \pm 0,14$, $p < 0,0001$; **21**: $R^2 = 0,991$, Hill slope = $-1,32 \pm 0,11$, $p < 0,0001$; **30**: $R^2 = 0,987$, Hill slope = $-1,18 \pm 0,14$, $p < 0,0001$; **41**: $R^2 = 0,958$, Hill slope = $-1,51 \pm 0,22$, $p = 0,0003$; **71**: $R^2 = 0,993$, Hill slope = $-1,09 \pm 0,08$, $p < 0,0001$.

Таблица 4. Противовирусная активность соединений **10**, **11**, **12**, **18**, **21**, **30**, **41** и **71** в отношении псевдовирусных частиц SARS-CoV-2. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистическая значимость различий IC₅₀ исследуемых соединений по сравнению с Арбидолом оценивали с помощью t-теста Уэлча для независимых выборок: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, ns-не значимы.

Соединение	CC ₅₀ , мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI	Соединение	CC ₅₀ , мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
10	110.5 $\pm$ 11.4	15.4 $\pm$ 1.2 ^{ns}	7	21	742.4 $\pm$ 22.5	9.3 $\pm$ 1.1 ^{ns}	80
11	186.5 $\pm$ 12.7	18.6 $\pm$ 2.5*	10	30	417.4 $\pm$ 16.6	41.8 $\pm$ 3.5***	10

12	396.7±32.5	21.4±2.6**	18	41	1890.5±125.2	72.1±5.6 ***	26
18	292.6±21.6	17.1±2.4*	17	71	351.4±41.3	2.5±1.1 ^{ns}	140
Арбидол	20.4±5.4	7.1± 3.5	3				

Наибольшую ингибирующую активность в ходе проведённого скрининга продемонстрировали сложноэфирные производные (+)-фенхола (соединения **65–73**) и борнеола (соединения **10–21**). Среди производных (+)-фенхола наибольшая активность выявлена у соединения **71**, при этом практически все представители данной группы проявили активность в отношении псевдовирусных частиц с IC₅₀ в диапазоне 2-14 мкМ. Наблюдали взаимосвязь между длиной линкера в структуре и активностью, при его длине C₂H₄ наблюдалось повышение биологической активности, например, соединение **63** с морфолиновым кольцом и линкером CH₃ с IC₅₀ 14 мкМ, но при увеличении длины линкера значение IC₅₀ для соединения **70** составило 8 мкМ. Данная взаимосвязь прослеживается и для производных фенхола с 4-этилпиперазиновым, 4-метилпиперазиновым, пиперидиновым заместителем.

Особый интерес также представляют сложноэфирные производные борнеола. Так, для соединений **11** и **21**, отличающихся длиной линкерного фрагмента, показано, что его удлинение способствует повышению противовирусной активности. Это сопровождалось как снижением ингибирующей концентрации (IC₅₀ снизился с 17,7 до 9,2 мкМ), так и увеличением значения цитотоксичности (CC₅₀ выросло с 186 до 742 мкМ), что указывает на улучшение селективности. При сравнении данных биологической активности соединений **19–21**, отличающихся заместителями при третичном атоме азота, можно сделать вывод о важности этого фрагмента. Так, только бутилзамещенный третичный амин проявил целевую активность. Изменение длины в N-заместителе на более короткие цепи - диэтильные (**20**) и диметильные (**19**) группы приводило к полной потере противовирусной активности.

Также другие сложноэфирные производные борнеола (**10, 12, 18**), содержащие 4-фенилпиперазиновый и морфолиновый заместитель, продемонстрировали активность в отношении псевдовирусных частиц.

Среди амидных производных изоборнилиамина умеренную активность показало соединение **30**, содержащее 4-метилпиперидин в качестве заместителя. Изменение этой структуры с введением пиперазинового, морфолинового или 4-этилпиперидинового фрагментов приводила к полной утрате ингибирующей активности.

Представители дитерпеновых соединений (**63-64**), такие как склареол и его производное продемонстрировали умеренную токсичность с CC_{50} 81-161 мкМ, и высокую ингибирующую активность IC_{50} около 4 мкМ. Умеренная активность была обнаружена у спироциклических производных камфоры и фенхона (**56-59**) с IC_{50} 24 - 64 мкМ, несмотря на наличие нитрогруппы в структуре соединений, вещества являются не токсичными на изучаемой клеточной линии (CC_{50} : 500-1077 мкМ).

Соединения **1-73** были исследованы с использованием конкурентного иммуоферментного анализа при концентрации 250 мкМ. В качестве положительного контроля использовали моноклональное нанотело Nb6, специфически связывающееся с RBD S SARS-CoV-2, и органический краситель эритрозин. Ранее было показано, что эритрозин ингибирует взаимодействие поверхностного белка S с рецептором ACE2 [136]. Для эритрозина значения IC_{50} составили, для RBD штамма Wuhan-Hu-1 - 42 мкМ, а для RBD штамма Delta — 43 мкМ. Для полноразмерного тримера S белка значения IC_{50} составили 8,5 мкМ (Wuhan-Hu-1) и 3,4 мкМ (Delta). Согласно полученным данным, природные производные блокировали взаимодействие между RBD и ACE2 менее чем на 20%. Эти данные позволяют предположить, что монотерпены не связываются с RBD или не влияют на возможность взаимодействия RBD с рецептором.

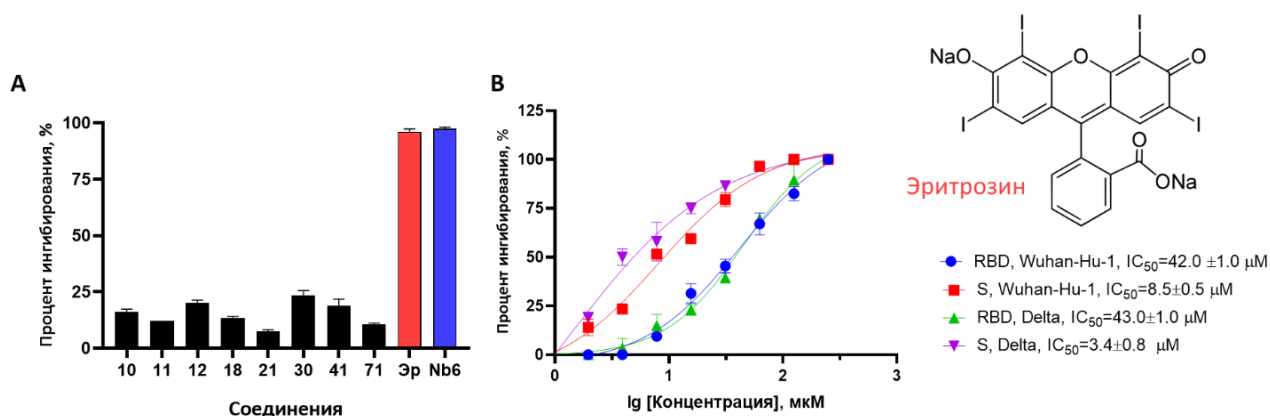


Рисунок 3.17. А. Ингибирующее действие соединений на связывание тримера S SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 с ACE2-HRP в конкурентном ИФА. Значения процента ингибирования, полученные при концентрации 250 мкМ. Nb6, эритрозин (Эр) были включены в качестве положительных контролей. Значения для каждого соединения приведены как среднее $\pm$ стандартное отклонение (SD). В. Зависимость степени ингибирования эритрозина взаимодействия поверхностного белка S SARS-CoV-2 и ACE2. Аппроксимация выполнена четырёхпараметрической логистической моделью (4PL) в GraphPad Prism 8.0. Для RBD Wuhan-Hu-1: $R^2 = 0,990$, Hill slope = $1,04 \pm 0,16$, $p < 0,0001$. Для S Wuhan-Hu-1: $R^2 = 0,989$, Hill slope = $0,94 \pm 0,17$, $p < 0,0001$. Для RBD Delta: $R^2 = 0,991$, Hill slope = $1,26 \pm 0,19$, $p < 0,0001$. Для S Delta: $R^2 = 0,986$, Hill slope = $0,67 \pm 0,34$, $p < 0,0001$.

Соединения **10, 11, 12, 18, 21, 71** были исследованы на ингибирующую активность в отношении инфекционных вирусов SARS-CoV-2 на культуре клеток Vero (Государственная коллекция возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ГНЦ ВБ «Вектор»

Роспотребнадзора, РФ) (таблица 5). В качестве положительного контроля использовали ремдесивир — аденозиновое нуклеотидное пролекарство, являющееся ингибитором РНК-зависимой РНК-полимеразы широкого спектра. Ремдесивир обладает антивирусной активностью против одноцепочечных РНК-вирусов, включая представителей семейств *Filoviridae* (Эболавирус и Марбургвирус), *Coronaviridae* (SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2), а также *Paramyxoviridae* (вирусы парагриппа типа III, Нипах, Хендра, кори, эпидемического паротита) и других.

Таблица 5. Противовирусная активность соединений **10**, **11**, **12**, **18**, **21** и **71** в отношении штаммов вируса SARS-CoV-2, полученных на культуре клеток Vero E6. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистическую значимость различий IC₅₀ соединений **11** и **21** по сравнению с ремдесивиром оценивали с помощью t-критерия Уэлча. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, ns-не значимы.

Соединение	CC ₅₀ , мкМ	SARS-CoV-2, Wuhan-Hu-1 ¹		SARS-CoV-2, Delta ²		SARS-CoV-2, Omicron ³	
		IC ₅₀ , мкМ	SI	IC ₅₀ , мкМ	SI	IC ₅₀ , мкМ	SI
10	362.8 $\pm$ 15.1	NA ⁴	-	NA	-	NA	-
11	313.5 $\pm$ 14.1	9.6 $\pm$ 1.4**	32	17.6 $\pm$ 2.1***	17	7.7 $\pm$ 1.8**	40
12	261.3 $\pm$ 16.3	NA	-	NA	-	NA	-
18	103.8 $\pm$ 13.1	NA	-	NA	-	NA	-
21	336.3 $\pm$ 16.6	4.7 $\pm$ 0.2*	71	3.5 $\pm$ 0.4**	96	3.3 $\pm$ 0.9 ^{ns}	102
71	436.3 $\pm$ 28.6	NA	-	NA	-	NA	-
Ремдесивир	710.9 $\pm$ 21.2	3.8 $\pm$ 0.4	186	2.1 $\pm$ 0.2	338	2.0 $\pm$ 0.1	356

¹Wuhan-Hu-1 линия Ba - hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (EPI_ISL_406844);

²Delta линия B.1.617.2 - hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (EPI_ISL_7338814);

³Omicron линия B.1.1.529 - hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (EPI_ISL_8920444);

⁴NA-нет активности.

По полученным данным, только соединения **11** и **21**, содержащие дибутиламиновую группу проявили активность в отношении исследуемых штаммов вируса. Остальные соединения не продемонстрировали активность. Дополнительно, были проверены сложноэфирные производные фенхола (**68**, **69**, **70**), но они также были не активны.

Методом молекулярного моделирования был определен вероятный сайт связывания соединений **11** и **21** в поверхностном белке S (рис. 3.18). Сайт связывания расположен в области центрального повтора (CHR) и гептадных повторов (HR1), расположенных во второй субъединице S белка. Данная область является более консервативной по сравнению с субъединицей S1. Сайт связывания насыщен гидрофобными аминокислотами, такими как аланин, лейцин, валин и пролин. Молекулярный докинг IFD позволил определить энергетически выгодные конформации лигандов в пределах выявленного сайта связывания.

Согласно модели, соединения **11** и **21** расположены в сайте связывания с образованием водородной связи с His1055. Кроме того, **11** образует катион-π-стэкинг-взаимодействие между протонированным атомом азота и ароматическим кольцом His1055. Во всех случаях наблюдаются гидрофобные взаимодействия между липофильными частями ингибиторов (фрагментом бициклического каркаса и бутильными заместителями) и гидрофобными аминокислотами связывающего участка. Расчётные значения энергии связывания (ΔG MM-GBSA) для обоих лигандов сопоставимы, что согласуется с результатами биологических экспериментов.

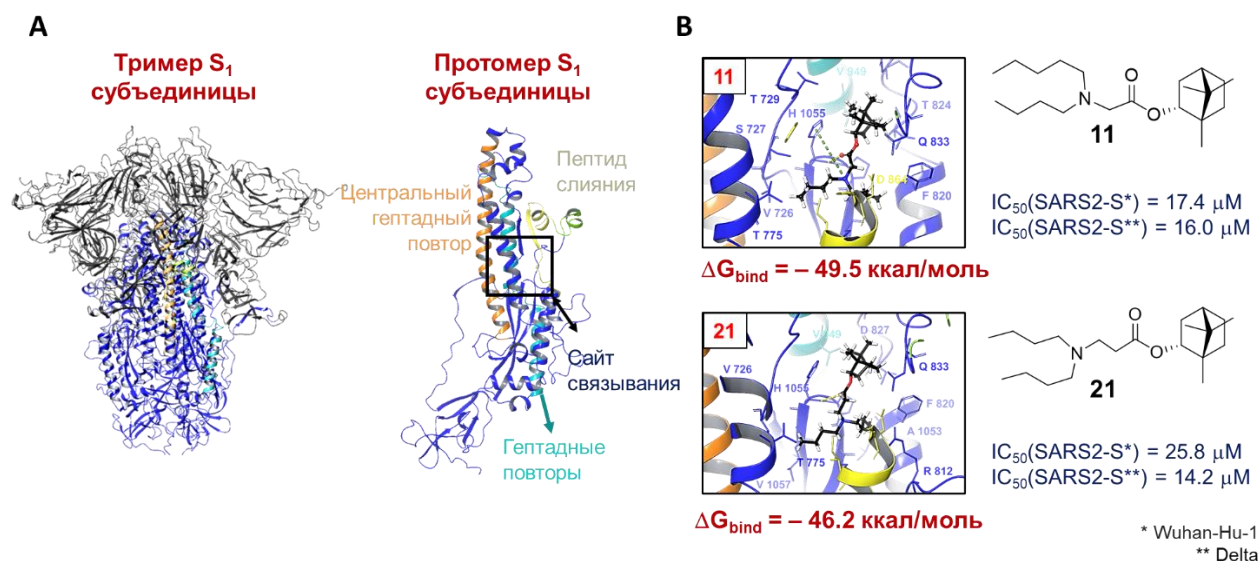


Рисунок 3.18. **А:** Структура поверхностного S белка: тримера и протомера; **В:** расположение соединений **11** и **21** в предполагаемом сайте связывания: водородные связи показаны желтой пунктирной линией, π-катионное взаимодействие — зеленой пунктирной линией.

3.2.2. Тестирование производных усниновой кислоты

Усниновая кислота представляет собой природное соединение, относящееся к производным дибензофурана, и является вторичным метаболитом лишайников, синтезируемым в процессе их жизнедеятельности. Она широко известна благодаря своим антимикробным, противовирусным и противоопухолевым свойствам, что делает её перспективным исходным соединением для разработки новых биологически активных веществ [137]. Ранее было показано, что производные усниновой кислоты обладают ингибирующей активностью в отношении патогенного коронавируса SARS-CoV-2 [138]. В связи с этим были синтезированы тиазол-гидразоны усниновой кислоты, содержащие различные гетероциклические и пространственно объёмные ароматические заместители (рис 3.19).

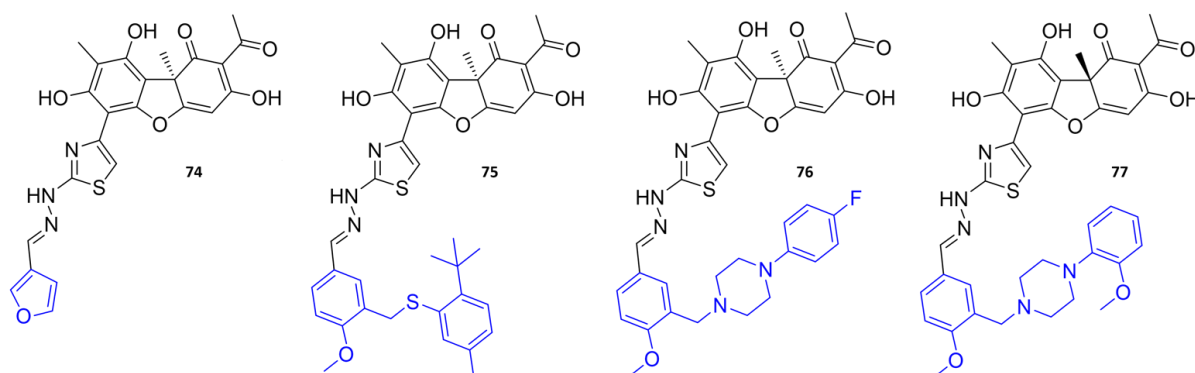


Рисунок 3.19. Структуры производных усниновых кислот (**74-77**).

Производные усниновой кислоты (**74-77**) были исследованы на биологическую активность с использованием псевдовирусных частиц SARS-CoV-2 (таблица 6, рис 3.20).

Таблица 6. Ингибирующая активность производных усниновой кислоты (**74-77**) в отношении псевдовирусных частиц SARS-CoV-2. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистический анализ (t-критерий Уэлча) не выявил значимых различий IC_{50} исследуемых соединений с арбидолом ($p > 0,05$ для всех соединений).

Соединение	CC ₅₀ , мкМ	IC ₅₀ , мкМ	SI
74	5.0 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.1	6
75	130.4 $\pm$ 16.5	9.4 $\pm$ 0.4	14
76	>688	1.1 $\pm$ 0.1	649
77	204.5 $\pm$ 38.1	2.0 $\pm$ 0.7	100
Арбидол	20.4 $\pm$ 5.4	6.1 $\pm$ 3.5	3

Анализ биологических данных, представленных в таблице 6, показывает, что наибольшую активность проявило соединение **74** со значением $IC_{50} = 0,7$ мкМ. Однако наличие фуранозного цикла в его структуре отрицательно сказалось на цитотоксичности: для клеточной линии HEK293T-ACE2-TMPRSS2 значение CC_{50} составило лишь 5 мкМ. В отличие от него, другие производные с пара-метокси-мета-замещёнными ароматическими фрагментами демонстрировали значительно более высокие показатели CC_{50} — свыше 130 мкМ. Особый интерес представляют соединения **76** и **77**, продемонстрировавшие значения IC_{50} в низкомикромолярном диапазоне, их индекс селективности составил 649 и 100, соответственно.

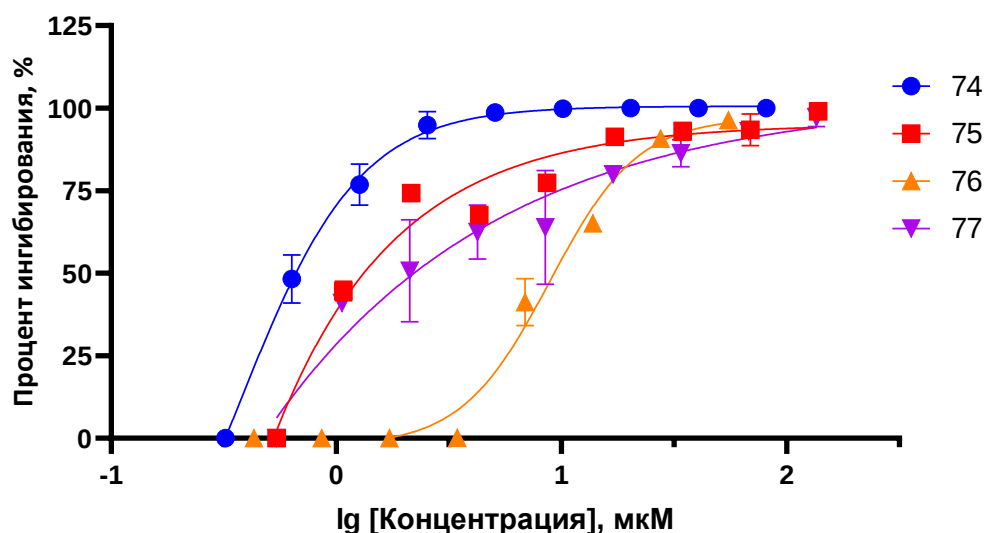


Рисунок 3.20. Зависимость степени ингибирования проникновения псевдовирюсов SARS-CoV-2 соединениями **74**, **75**, **76** и **77**. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n=3$). Аппроксимация выполнена четырёхпараметрической логистической моделью (4PL) в GraphPad Prism 8.0. **74**: $R^2 = 0,993$, Hill slope = $-1,63 \pm 0,25$, $p < 0,0001$; **75**: $R^2 = 0,961$, Hill slope = $-0,78 \pm 0,21$, $p < 0,0001$; **76**: $R^2 = 0,983$, Hill slope = $-1,98 \pm 0,50$, $p < 0,0001$; **77**: $R^2 = 0,931$, Hill slope = $-0,45 \pm 0,15$, $p < 0,0001$.

Для производных усниновой кислоты была исследована способность ингибировать взаимодействие S SARS-CoV-2 с ACE2. Результаты скрининга в ИФА по ингибированию связывания полноразмерного S белка SARS-CoV-2 (штаммы Wuhan-Hu-1 и Delta) с ACE2–HRP представлены на рисунке 3.21.

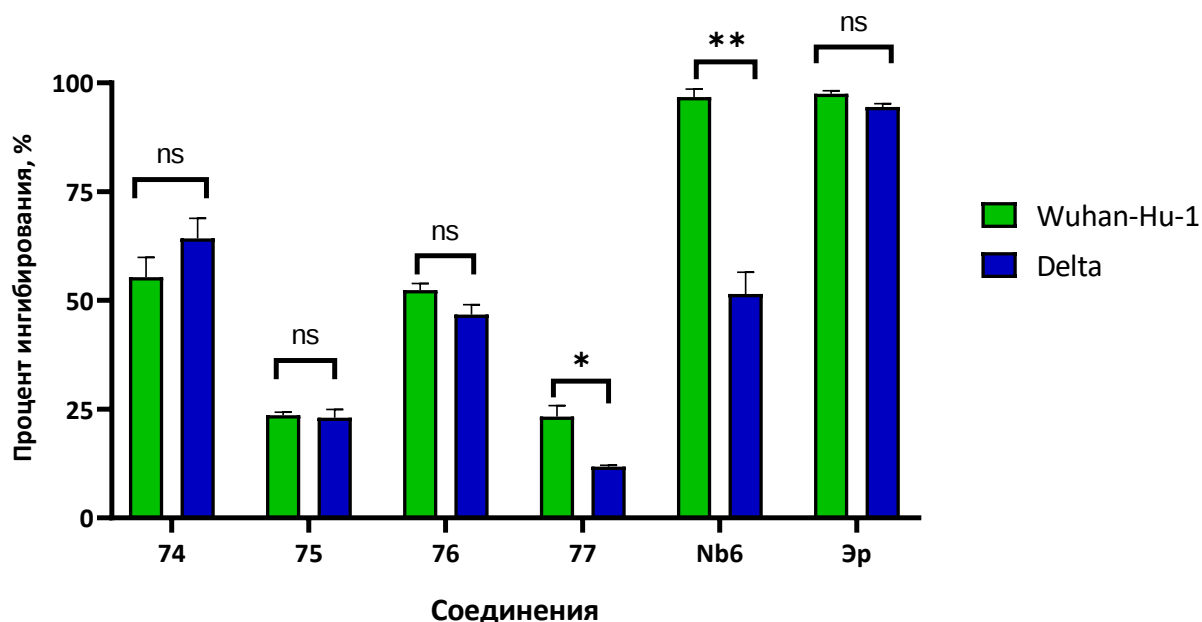


Рисунок 3.21. Ингибирующее действие соединений на связывание полноразмерного белка S SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 и Delta с ACE2–HRP в конкурентном ИФА. Значения процента ингибирования, полученные при концентрации 250 мкМ, показаны нормализованными по отношению к контролю. Nb6 и эритроцин (Эп) были включены в качестве положительного контроля. Данные представлены

как среднее $\pm$ стандартное отклонение для трех повторов. Статистическую значимость определяли с помощью непарного t-теста (GraphPad Prism). (*p <0.05, **p <0.01, ns - незначимо).

Соединения **74** и **75** ингибировали взаимодействие S-ACE2 примерно на 50% при концентрации 250 мкМ, что указывает на их потенциальную способность нарушать процесс вирусного прикрепления к клеткам-мишеням. При этом производное **77**, имеющее сходную структуру с соединением **76**, проявило значительно меньшую активность, ингибируя данное взаимодействие менее чем на 25%.

Для дальнейшей оценки противовирусной активности соединения были протестированы на шести различных штаммах SARS-CoV-2, включая вариант Wuhan-Hu-1 (линия B), широко распространённый в России вариант Delta (B.1.617.2) и четыре актуальных (на момент проведения исследования) штамма Omicron. Результаты биологического тестирования на этих инфекционных штаммах представлены в таблице 7.

Таблица 7. Противовирусная активность производных усниновой кислоты (**74-77**) в отношении шести штаммов вируса SARS-CoV-2, полученных на культуре клеток Vero E6. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение (SD). Для всех тестируемых соединений IC₅₀ статистически значимо выше, чем для ремдесивира (p<0,01, t-критерий Уэлча).

Соединение	CC ₅₀ , мкМ	Wuhan-Hu-1 ¹	Delta ²	Om. B.1. ³	Om. 5.2 ⁴	Om. XBB ⁵	Om. BQ ⁶
		IC ₅₀ , мкМ (SI)	IC ₅₀ , мкМ (SI)	IC ₅₀ , мкМ (SI)	IC ₅₀ , мкМ (SI)	IC ₅₀ , мкМ (SI)	IC ₅₀ , мкМ (SI)
74	572.5 $\pm$ 19.2	28.5 $\pm$ 3.1 (20)	22.5 $\pm$ 2.4 (25)	22.6 $\pm$ 2.3 (25)	17.2 $\pm$ 1.5 (33)	10.7 $\pm$ 0.8 (53)	8.5 $\pm$ 0.7 (67)
75	463.6 $\pm$ 17.8	152.6 $\pm$ 10.2 (3)	148.7 $\pm$ 11.5 (3)	59.1 $\pm$ 3.8 (8)	46.3 $\pm$ 3.9 (11)	99.5 $\pm$ 8.8 (5)	164.9 $\pm$ 12.1 (3)
76	471.2 $\pm$ 15.5	55.9 $\pm$ 6.2 (8)	74.5 $\pm$ 8.0 (6)	44.2 $\pm$ 3.7 (10)	11.7 $\pm$ 0.6 (40)	5.6 $\pm$ 0.2 (83)	52.7 $\pm$ 4.3 (9)
77	467.8 $\pm$ 20.1	49.7 $\pm$ 3.3 (9)	68.2 $\pm$ 5.5 (7)	45.3 $\pm$ 3.9 (10)	37.0 $\pm$ 2.8 (12)	37.0 $\pm$ 2.5 (12)	47.4 $\pm$ 4.1 (10)
Ремдесивир	710.9 $\pm$ 21.2	3.8 $\pm$ 0.42 (186)	2.1 $\pm$ 0.2 (338)	2.0 $\pm$ 0.1 (356)	4.4 $\pm$ 1.0 (159)	2.6 $\pm$ 0.3 (267)	3.1 $\pm$ 0.9 (226)

¹Wuhan-Hu-1 линия Ba - hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (EPI_ISL_406844);

²Delta линия B.1.617.2 - hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (EPI_ISL_7338814);

³Omicron линия B.1.1.529 - hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (EPI_ISL_8920444);

⁴Omicron линия BA 5.2 - hCoV-19/Russia/Moscow-49415/2022 (EPI_ISL_16613436);

⁵Omicron линия XBB.1.5 - hCoV-19/Russia/TYU-SRC-8642/2023 (EPI_ISL_17770464);

⁶Omicron линия BQ.1.1 - hCoV-19/Russia/TOM-SRC-8663/2023 (EPI_ISL_17730076).

Результаты исследования выявили существенные различия в значениях цитотоксичности соединений **74-77** при тестировании на двух клеточных линиях: Vero E6 и HEK293T-ACE2-TMPRSS2. Особенно заметна была разница для соединения **74**: при низкой цитотоксичности на линии Vero E6 (CC₅₀ = 572 мкМ) проявляло выраженную токсичность на клетках HEK293T-ACE2-TMPRSS2 с CC₅₀, равным 5 мкМ. Несмотря на это, соединение **74** продемонстрировало наибольшую эффективность в подавлении репликации всех шести тестируемых штаммов вируса SARS-CoV-2, проявляя активность в нижнем

микромолярном диапазоне концентраций (IC_{50} : 8.5–28.5 мкМ). Особенно выраженное ингибирующее действие наблюдалось против штаммов Omicron XBB.1.5 и BQ.1.1. В отличие от него, вещество **75**, содержащее трет-бутил-метилфенилсульфоновый фрагмент, показало низкую активность против всех исследованных штаммов SARS-CoV-2. Соединение **76** проявило селективную высокую активность против штаммов Omicron BA 5.2 и XBB.1.5, тогда как структурно схожее соединение **77** характеризовалось умеренной активностью против всех тестируемых штаммов вируса.

Для определения возможного механизма действия производных усниновой кислоты было проведено молекулярное моделирование их взаимодействия с S-белком SARS-CoV-2. Полученные результаты исследований на псевдовиральной системе и инфекционном вирусе, а также данные конкурентного ИФА показали, что исследуемые соединения способны ингибировать проникновение вируса и взаимодействие S-белка с рецептором ACE2. При этом характер полученной активности позволил предположить наличие дополнительных участков связывания на поверхности S-белка, отличных от RBD. В качестве потенциального участка связывания был рассмотрен N-концевой домен (NTD) S-белка, в частности сайт связывания биливердина. Выбор данного участка был обусловлен его структурными характеристиками и наличием полости, содержащей гидрофобные и полярные аминокислотные остатки, способные участвовать во взаимодействии с низкомолекулярными соединениями.

Для проверки данного предположения был проведён молекулярный докинг соединения **74** в сайт биливердина NTD S-белка (рис. 3.22). Выбор данного сайта дополнительно обоснован его относительной консервативностью: аминокислотные остатки, формирующие сайт в радиусе 4 Å от лиганда, не подвержены мутациям у основных эпидемически значимых штаммов (Wuhan, Delta, Omicron), что согласуется с сопоставимой активностью соединения против этих вариантов вируса. Анализ построенной модели комплекса показал, что **74** размещается в сайте биливердина, занимая всю его полость. Ключевыми взаимодействиями являются водородные связи: для соединения **74** – с остатками N121 и L101; для **75**, **76** и **77** – с N121 и N188. Кроме того, ароматические кольца соединений **75**, **76** и **77** участвуют в π - π -стэкинг-взаимодействиях с остатками F192 и H207. Механизм противовирусного действия соединений, вероятно, связан с нарушением функции NTD, что влияет на подвижность RBD и, как следствие, на эффективность связывания S-белка с рецептором ACE2.

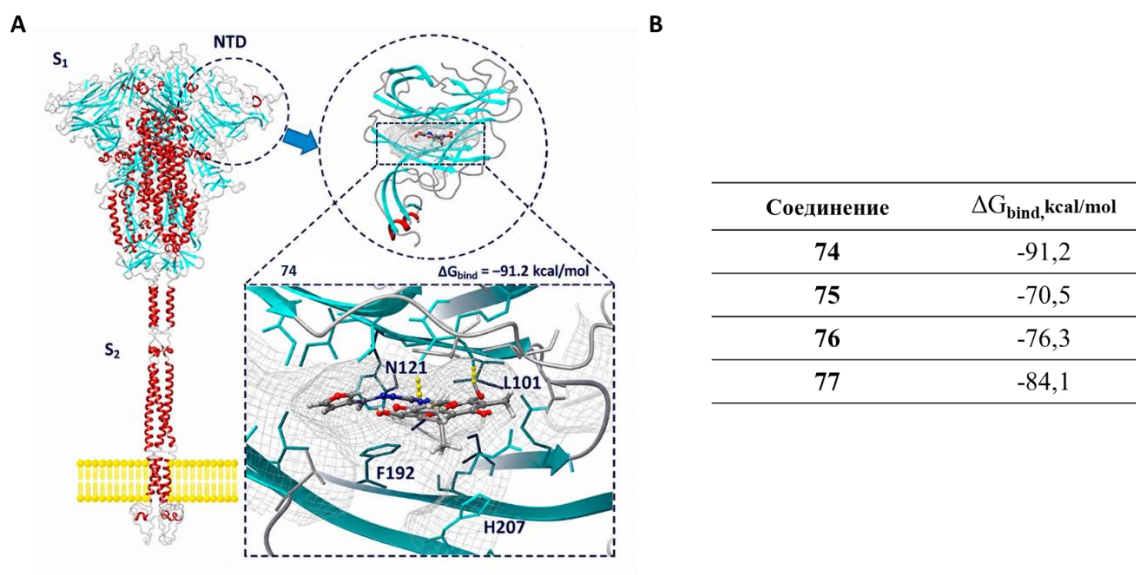


Рисунок 3.22. А. Расположение соединения **74** в сайте связывания биливердина N-концевого домена (NTD) S-белка SARS-CoV-2. Водородные связи показаны жёлтыми пунктирными линиями. В. Результаты процедуры молекулярного докинга **74-77** в сайт биливердина NTD S-белка.

В дополнение к проведённым исследованиям производные усниновой кислоты были изучены на активности в отношении 3CL протеазы SARS-CoV-2. Данные соединения ингибировали 3CL со значениями IC_{50} в диапазоне 13,5 – 27,2 мкМ, тогда как производные терпеноидов не проявляли активности в отношении данной мишени (таблица 8). Полученные результаты свидетельствуют о потенциально мультитаргетном характере действия соединений **74-77**.

Таблица 8. Активность соединений **74-77** против 3CLpro SARS-CoV-2 в сравнении с ингибитором GC376.

Соединение	IC_{50} , мкМ
11	>250
21	>250
74	27.2±1.3
75	25.0±1.2
76	15.5±0.8
77	13.5±0.7
GC376	0.023±0.004

3.2.3. Тестирование библиотеки конъюгатов адамантана и монотерпена

Адамантановый фрагмент представляет значительный интерес для разработки биологически активных соединений благодаря своим уникальным структурным и физико-химическим свойствам. Жесткая, объемная структура, выраженная гидрофобность и липофильность адамантана обеспечивают его производным способность эффективно проникать через клеточные мембраны и взаимодействовать с гидрофобными участками

белковых мишеней [139]. Производные адамантана известны широтой спектра биологической активности, включая противовирусную (амантадин, римантадин, тромантадин), антидиабетическую (саксаглиптин), противоопухолевую (адафостин), противотуберкулёзную (SQ109) и другие виды активности [140].

Особый интерес представляет комбинация адамантанового фрагмента с монотерпеновой структурой, демонстрирующей активность против коронавирусов. Ранее в работах было показано, что такие конъюгаты обладают активностью против ортопоксвирусов [141]. Между двумя гидрофобными скаффолдами был предусмотрен полярный линкер, обеспечивающий оптимальную длину и гибкость молекулы, а также возможность формирования водородных связей с аминокислотными остатками на периферии сайта связывания. В качестве линкеров были выбраны мочевины, тиомочевины, уретаны и тиоуретаны, обладающие способностью выступать как донорами, так и акцепторами водородных связей. Эти функциональные группы обеспечивают достаточную полярность, вариативность пространственной конфигурации и позволяют варьировать электронные свойства соединений.

В лаборатории направленных трансформаций природных соединений (ЛНТПС НИОХ СО РАН) была синтезирована библиотека 1- и 2-адамантанзамещенных соединений, содержащих в качестве линкера фрагмент мочевины (**1-2**), тиомочевины (**3-4**), уретанов (**5-6**), тиоуретанов (**7-8**), и монотерпеновый скаффолд, представленный такими структурами, как 3,7-диметилоктанол (**a**), (-)-нопол (**b**), (+)-борнанный остов (**c**) и (-)-ментон (**d**) (рисунок 3.23).

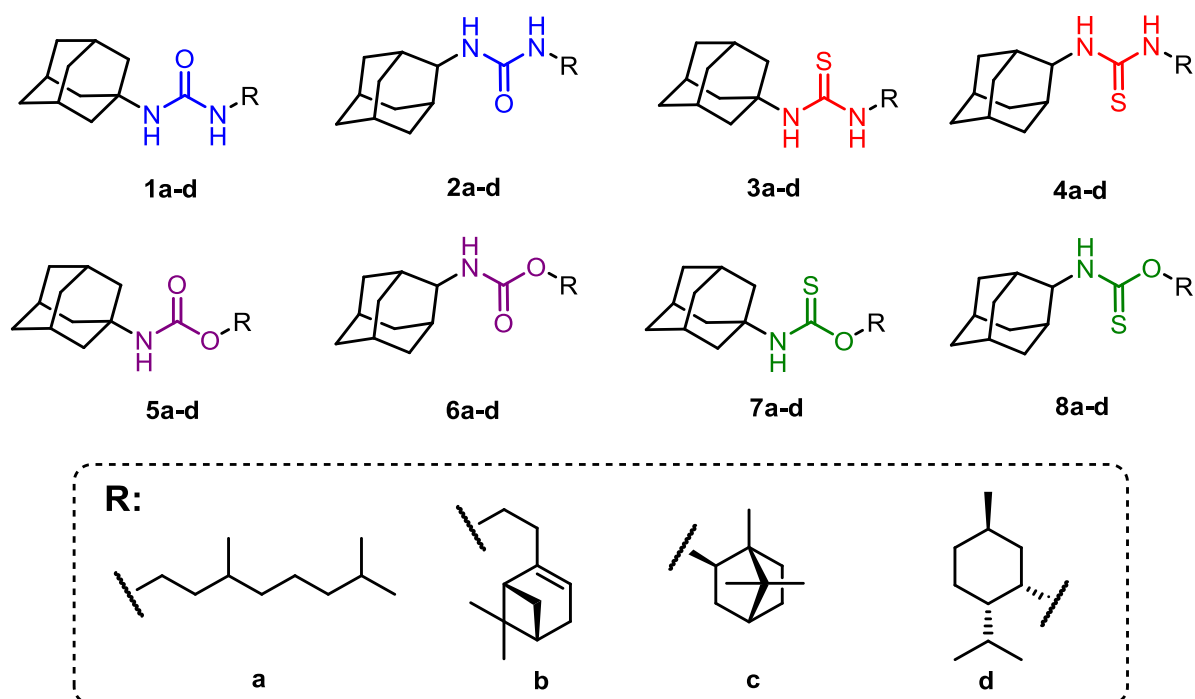


Рисунок 3.23. Библиотека конъюгатов адамантанов и монотерпенов. Заместитель R: **a)** 3,7-диметил октанол, **b)** (-)-нопол, **c)** (+)-борнеол, **d)** (-)-ментон.

Биологическая активность синтезированной библиотеки была исследована с использованием псевдовиральных частиц, содержащих поверхностные белки SARS-CoV, SARS-CoV-2 и MERS-CoV. В экспериментах с псевдовиральными SARS-CoV и SARS-CoV-2 использовали клеточную линию HEK293T-ACE2-TMPRSS2, тогда как для псевдовиральных MERS-CoV применяли линию HEK293T-DPP4. Результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9. Ингибирующая активность конъюгатов адамантанов и монотерпенов в отношении псевдовиральных частиц SARS-CoV-2, SARS-CoV и MERS-CoV. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистическую значимость различий IC_{50} соединений по сравнению с арбидолом оценивали с помощью t-критерия Уэлча. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, ns-не значимы.

Соединение	CC ₅₀ , мкМ	SARS-CoV-2, Wuhan-Hu-1		SARS-CoV		MERS-CoV	
		IC ₅₀ , мкМ	SI	IC ₅₀ , мкМ	SI	IC ₅₀ , мкМ	SI
1a	>747	26.1 $\pm$ 8.5*	>28	NA	-	>298	-
1b	210.1 $\pm$ 44.5	8.2 $\pm$ 4.7 ^{ns}	26	7.4 $\pm$ 2.7	30	29.8 $\pm$ 6.3	7
1c	>756	148.8 $\pm$ 3.2	>5	145.8 $\pm$ 12.1	>5	275.8 $\pm$ 42.4	>3
1d	>747	150.6 $\pm$ 30.4	>5	NT	-	27.5 $\pm$ 10.2	>27
2a	>747	11.8 $\pm$ 1.2*	>63	6.0 $\pm$ 1.8 ^{ns}	>124	38.5 $\pm$ 14.2*	>39
2b	>747	7.2 $\pm$ 2.6 ^{ns}	>103	9.0 $\pm$ 2.5 ^{ns}	>83	70.5 $\pm$ 3.2***	>10
2c	>756	>302	-	>302	-	>302	-
2d	>751	247.6 $\pm$ 21.1	>3	>300	-	>300	-
3a	49.2 $\pm$ 6.3	3.4 $\pm$ 0.9*	14	5.4 $\pm$ 2.3 ^{ns}	10	26.8 $\pm$ 3.1	2
3b	19.6 $\pm$ 6.1	7.1 $\pm$ 3.3	3	6 $\pm$ 2	3	14.0 $\pm$ 2.5	1

3c	>756	127.9±6.0	>6	118±6	>6	248.4±40.5	>3
3d	>717	100.1±29.2	>7	115.2±14.2	>6	121.5±9.4	>6
4a	60.2±6.8	3.4±1.7*	18	6.5±2.1 ^{ns}	10	17.7±6.8	3.5
4b	103.7±14.6	6.5±3.2 ^{ns}	16	10.2±2.1 ^{ns}	10	20.7±2.4	5
4c	>756	121.4±24.8	>6	72.3±6.2	>10	236.6±33.4	>3
4d	>756	91.6±28.3	>8	NT	-	258.8±14.2	>3
5a	119.4±34.6	7.4±1.1 ^{ns}	17	23.8±3.4	5	15.6±3.3	8
5b	90.5±11.1	8.5±3.0 ^{ns}	11	>29	<3	7.0±2.5*	13
5c	>754	126.4±35.9	>6	108.5±6.8	>7	156.6±30.1	>5
5d	54.6±13.4	24.1±4.2	2	9.7±1.0	6	15.8±3.4	4
6a	122.3±17.8	4.6±1.8 ^{ns}	27	>30	<4	18.1±6.5	7
6b	58.2±6.5	11.6±4.2	5	11.2±2.3	5	14.2±3.4	4
6c	<24	NA	-	11.0±3.2	-	>30	-
6d	15.3±7.5	6.2±2.4	2	8.1±2.8	2	3.5±1.6	5
7a	11.7±4.1	4.2±1.5	3	6.3±1.7	2	8.6±3.4	1
7b	44.6±5.0	13.5±3.4	3	8.5±3.5	5	NA	-
7c	>719	92.6±20.8	>8	38.1±9.4***	>20	40.9±14.4**	18
7d	42.2±7.8	6.3±1.4	7	NA	-	NA	-
8a	78.3±6.6	28.1±8.8	3	>42	-	>30	-
8b	47.6±8.2	3.3±0.8*	14	14.3±5.9	3	11.2±3.8	4
8c	589.7±58.4	NA	-	32.2±6.4***	18	>287	-
8d	52.4±7.1	37.8±5.3	2	NA	-	NA	-
Арбидол	20.8±5.2	7.1±3.2	3	8.1±2.1	2.5	17.2±4.5	1

Анализ цитотоксичности показал, что большинство соединений, содержащих линкер - замещенную мочевины и тиомочевину (**1a-4d**), обладают низкой токсичностью в отношении клеток НЕК293Т ($CC_{50}>500$ мкМ), за исключением **3a**, **3b**, **4a**. Напротив, соединения с уретановыми и тиоуретановыми группами (**5a-8d**) проявили высокую или умеренную цитотоксичность с CC_{50} в диапазоне от 11 до 120 мкМ. Исключениями с низкой токсичностью ($CC_{50}>590$ мкМ) стали лишь вещества **5c**, **7c** и **8c**, что, возможно, связано с присутствием борнанового остова в их структуре.

Изучение взаимосвязи структура–активность в тестах проникновения псевдовируса SARS-CoV-2 выявило, что наиболее эффективными ингибиторами являются соединения, содержащие ациклический монотерпеновый заместитель (**1a**, **2a**, **3a**, **4a**, **5a**, **6a**) либо (-)-нопол (**1b**, **2b**, **4b**, **5b**, **8b**). Производные с борнано- и (-)-ментоновым фрагментом (**1-8 c, d**) не проявили противовирусной активности и имели высокие значения IC_{50} (например, для **1-4 c, d** $IC_{50}>100$ мкМ). Анализ влияния типа линкера на биологическую активность показал, что соединения, содержащие фрагмент тиомочевины в качестве линкера, показали самые низкие значения IC_{50} среди всех соединений (**3a**: $IC_{50}=3.4\pm0.9$ мкМ; **4a**: $IC_{50}=3.4\pm1.7$

мкМ). Зависимость активности от мета замесителя в адамантановом фрагменте (1- или 2-Ad) практически не наблюдалась: например, для **1b** и **2b** IC₅₀ были близки (7 и 8 мкМ соответственно). Аналогично, неактивные соединения **3c** и **4c** имели схожие значения CC₅₀ (>700 мкМ) и IC₅₀ (около 120 мкМ).

Также была исследована способность соединений ингибировать проникновение псевдовируса SARS-CoV. Результаты для большинства соединений коррелировали с данными для SARS-CoV-2, что объясняется высокой гомологичностью аминокислотных последовательностей поверхностных белков обоих вирусов. Соединения **1b**, **2a**, **2b**, **3a**, **4a** и **4b** показали противовирусную активность против SARS-CoV, тогда как **1a** было неактивно, но его изомер **2a** проявил лучшую активность по сравнению с SARS-CoV-2. Соединения **5a**, **5c**, **6a** и **8b** не проявили активности, однако **7c** и **8c** продемонстрировали активность с IC₅₀ около 35 мкМ.

Другая ситуация наблюдалась при тестировании на псевдовирусе MERS-CoV: большинство соединений не ингибировали проникновение вирусных частиц в клетки. Исключение составили соединения **1d**, **5b** и **7c**, проявившие активность с IC₅₀ в диапазоне от 7 до 70 мкМ. При этом только соединения **2a** и **2b** продемонстрировали ингибирующую активность в отношении всех трёх исследованных коронавирусов — SARS-CoV, SARS-CoV-2 и MERS-CoV.

Для соединений **1b**, **2a**, **2b**, **3a**, **4a**, **4b**, **5a**, **8b** было проведено дополнительное тестирование с использованием псевдовирусных частиц SARS-CoV-2 штаммов Delta и Omicron. Соединения **7b**, **8d** были включены в качестве отрицательных контролей. Результаты исследования представлены в таблице 10.

Таблица 10. Ингибирующая активность **1b**, **2a**, **2b**, **3a**, **4a**, **4b**, **5a**, **8b**, **8d** в отношении псевдовирусных частиц SARS-CoV-2 штаммов Wuhan-Hu-1, Delta и Omicron. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD). Статистическую значимость различий IC₅₀ соединений для штаммов Delta и Omicron по сравнению со штаммом Wuhan оценивали с помощью двустороннего t-критерия Уэлча. Уровни значимости: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ns – не значимо (p ≥ 0,05).

Соединение	CC ₅₀ , мкМ	SARS-CoV-2, Wuhan-Hu-1		SARS-CoV-2, Delta		SARS-CoV-2, Omicron	
		IC ₅₀ , мкМ	SI	IC ₅₀ , мкМ	SI	IC ₅₀ , мкМ	SI
1b	210.1±44.5	8.2±4.7	26	7.2±1.7 ^{ns}	30	12.5±2.1 ^{ns}	18
2a	>747	11.8±1.2	>67	3.5±0.6 ^{**}	>213	3.5±0.3 ^{**}	>213
2b	>747	7.2±2.6	>40	3.5±0.6 [*]	>213	20±3 ^{**}	>37
3a	49.2±6.3	3.4±0.9	14	3.1±0.5 ^{ns}	16	18.5±2.4 ^{***}	3
4a	60.2±6.8	3.4±1.7	15	3.0±0.2 ^{ns}	15	17.6±2.2 ^{***}	3
4b	103.7±14.6	6.5±3.2	19	5.7±0.6 ^{ns}	18	13.4±3.8 [*]	8
5a	119.4±34.6	7.4±1.1	17	9.4±2.3 ^{ns}	13	NA	-

7b	44.6±5.0	13.5±3.4	3	22.8±3.0*	2	>41	-
8b	47.6±8.2	3.3±0.8	14	10.1±2.5**	5	25.5±2.0***	2
8d	52.4±7.1	37.8±5.3	<2	11.5±3.4**	4	>28	-

Соединения, содержащие фрагмент (–)-нопола (**1b**, **2b**, **4b**), продемонстрировали ингибирующую активность против всех трёх штаммов псевдовируса SARS-CoV-2. Кроме того, соединение **2a** эффективно ингибировало инфекцию, вызываемую всеми тремя штаммами, с $IC_{50}=3,5$ мкМ. Изомерные адамантановые производные **3a** и **4a** показали практически идентичные профили активности: они ингибировали проникновение псевдовируса, экспонирующего S белок штамма Delta, но были неактивны в отношении S белка варианта Omicron. Соединения **7b** и **8d** не проявили активности в отношении псевдовирусных частиц SARS-CoV-2 разных штаммов.

Для исследования взаимодействия соединений с RBD был проведен скрининг библиотеки при 250 мкМ с использованием ИФА. Как и в случае других производных терпенов (**1-73**), процент ингибирования не превышал 20% (рис. 3.24).

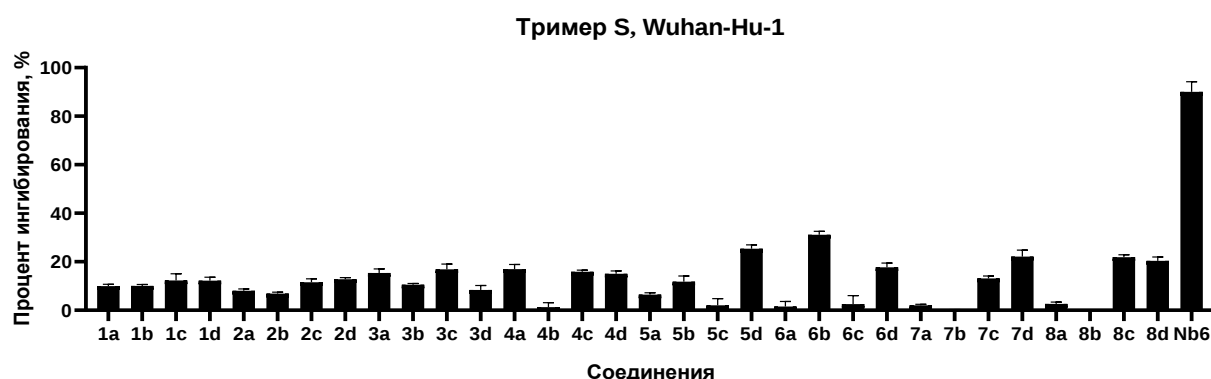


Рисунок 3.24. Ингибирующее действие соединений на связывание тримера S SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 с ACE2–HRP в конкурентном ИФА. Значения процента ингибирования, полученные при концентрации 250 мкМ, показаны нормализованными по отношению к контролю Nb6. Nb6 был включен в качестве положительного контроля. Значения для каждого соединения приведены как среднее ± стандартное отклонение (SD).

Поскольку коронавирусы используют различные рецепторы для проникновения в клетки-хозяина, представляло интерес проверить, обусловлена ли активность соединений против MERS-CoV взаимодействием с его клеточным рецептором — дипептидилпептидазой-4 (DPP4). В связи с этим часть соединений (**1d**, **2a**, **2b**, **5b** и **7c**), показавших активность в отношении MERS-CoV, была дополнительно протестирована на способность ингибировать DPP4. Для этого проводили изучение ферментативной кинетики с использованием рекомбинантного белка DPP4. Значение IC_{50} для всех указанных соединений составило более 250 мкМ, что свидетельствует о слабой ингибирующей активности по сравнению со стандартными ингибиторами DPP4, таким как ситаглиптин

(IC₅₀ = 48 нМ). Это указывает на то, что противовирусная активность данных соединений в отношении MERS-CoV обусловлена другими механизмами, не связанными с ингибированием DPP4.

Данная библиотека соединений была исследована на ингибирующую активность в отношении патогенных вирусов SARS-CoV-2 штаммов Wuhan-Hu-1, Delta, Omicron и Omicron 5.2 (таблица 11).

Таблица 11. Противовирусная активность библиотеки конъюгатов адамантанов и монотерпенов в отношении четырех штаммов вируса SARS-CoV-2, полученных на культуре клеток Vero E6. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD). Статистическую значимость различий IC₅₀ каждого соединения с ремдесивиром оценивали с помощью t-критерия Уэлча. Уровни значимости: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ns – не значимо (p ≥ 0,05).

Соединение	CC ₅₀ , мкМ	Wuhan-Hu-1 ¹		Delta ²		Omicron ³		Omicron 5.2 ⁴	
		IC ₅₀ , мкМ	SI	IC ₅₀ , мкМ	SI	IC ₅₀ , мкМ	SI	IC ₅₀ , мкМ	SI
1a	574.8±12.2	159.1±6.5***	4	118.2±15.5***	5	110.1±15.3***	5	43.7±6.2***	13
1b	353.7±11.1	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
1c	303.6±24.5	136.8±4.5	~2	106.4±5.8	~3	53.4±8.9	~6	102.1±11.7	~3
1d	219.6±20.2	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
2a	450.4±24.3	10.1±1.7**	45	9.8±1.5***	45	3.9±0.7**	115	9.7±0.8**	46
2b	731.8±17.1	187.3±20.4	4	182.8±6.2	4	312.2±15.4	2	114.6±5.2	6
2c	227.4±9.7	102.9±14.1	2	115.7±14.2	2	NA	-	116.9±8.0	2
2d	523.3±10.1	196±9	3	137.3±11.4	4	112.1±10.5	5	166.8±11.1	3
3a	4.5±1.1	2.4±1.1	2	4.4±1.7	1	2.2±0.4	2	2.5±0.5	2
3b	3.2±0.8	1.1±0.2	3	NA	-	NA	-	1.4±0.6	2
3c	3.6±0.4	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
3d	1.3±0.5	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
4a	5.5±0.7	1.9±0.3	3	NA	-	NA	-	1.4±0.5	4
4b	320.4±31.5	6.1±0.4**	53	4.7±0.5***	64	3.7±0.7**	87	5.2±1.0*	61
4c	159.0±14.5	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
4d	15.6±3.1	15.7±1.2	1	14.8±6.4	1	8.4±2.1	2	NA	-
5a	247.4±44.3	8.7±2.1**	28	14.1±5.2***	17	7.4±1.6**	35	8.2±1.5**	50
5b	8.8±2.2	1.3±0.4	6	3.3±0.5	2	1.9±0.5	4	2.2±0.4	4
5c	6.1±1.3	3.7±0.5	2	1.9±0.8	3	2.0±0.4	3	5.1±1.5	1
5d	10.7±2.5	5.5±1.2	2	6.2±2.4	2	3.6±0.5	3	3.8±0.3	3
6a	47.1±4.5	10.0±1.4	5	18.7±3.1	3	13.1±1.2	3	12.1±2.0	4
6b	17.4±2.3	3.0±0.7	4	4.0±0.3	4	2.1±0.3	8	4.3±1.5	4
6c	298.8±21.6	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
6d	23.9±6.5	4.0±0.5	6	4.0±0.9	5	3.1±0.7	6	NT	-
7a	20.6±3.1	4.0±0.2	5	5.6±1.0	3	4.8±0.9	4	4.5±0.4	4
7b	57.4±6.1	6.4±1.8 ^{ns}	9	4.5±0.5***	13	3.1±0.8	18	12.1±3.3***	4
7c	321.1±23.5	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
7d	171.3±17.7	NA	-	NA	-	96.8±11.4	2	162.0±15.7	1
8a	53.1±8.4	12.6±3.0	4	11±1	5	11.7±3.2	5	19.0±3.1	3
8b	53.8±5.6	4.0±0.4 ^{ns}	13	2.6±0.8 ^{ns}	20	2.0±0.4 ^{ns}	27	11.2±2.5***	5
8c	19.2±3.4	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-
8d	112.7±4.3	16.2±3.4***	7	6.7±1.6**	17	5.5±1.0**	22	108.8±18.3***	1
Ремдесивир	711.5± 21.8	3.8±0.4	186	2.1±0.2	338	2.0±0.1	356	3.5±0.5	203

¹Wuhan-Hu-1 линия Ba - hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (EPI_ISL_406844);

²Delta линия B.1.617.2 - hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (EPI_ISL_7338814);

³Omicron линия B.1.1.529 - hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (EPI_ISL_8920444);

⁴Omicron линия BA 5.2 - hCov-19/Russia/Moscow-49415/2022 (EPI_ISL_16613436).

Соединения **2a**, **4b**, **5a**, **7b**, **8b**, **8d** продемонстрировали противовирусную активность в отношении патогенного вируса SARS-CoV-2. Эти соединения содержат в своей структуре фрагмент нопола (**4b**, **7b**, **8b**), ациклический заместитель (**2a**, **5a**) или производное ментонового остова (**8d**). Наиболее широкий спектр ингибирующего действия против четырёх штаммов SARS-CoV-2 показали соединения **2a**, **4b** и **5a**, для которых значения IC₅₀ находились в микромолярном диапазоне от 4 до 10 мкМ. В отличие от них, производные тиюретанов **7b**, **8b** и **8d** не проявили активности в отношении варианта Omicron BA.5.2; кроме того, **7b** и **8d** были неактивны в анализах с использованием псевдовирусных частиц.

Для выяснения возможного механизма действия конъюгатов адамантана и монотерпенов было проведено молекулярное моделирование их взаимодействия с S-белком SARS-CoV-2. Полученные ранее результаты тестирования на псевдовирусной системе и патогенном вирусе показали, что данные соединения способны ингибировать проникновение вируса, однако не влияют на связывание RBD с ACE2 (по данным конкурентного ИФА). Это позволило предположить наличие дополнительных участков связывания на поверхности S-белка, отличных от RBD. В качестве потенциальной мишени был рассмотрен консервативный участок в области гептадных повторов (HR) S2-субъединицы. Выбор данного сайта был обусловлен его консервативностью среди исследованных штаммов SARS-CoV-2, а также структурным сходством терпенового углеродного скелета изучаемых лигандов с известными лигандами этого сайта.

Для проверки данного предположения был проведён молекулярный докинг соединений в выбранный сайт связывания. Анализ построенных моделей комплексов показал, что лиганд **4b** и **5a** размещается в области гептадных повторов S2-субъединицы, занимая всю полость сайта. Ключевыми взаимодействиями являются водородные связи между атомами соединения **4b** и остатками Thr732 и Ala829 (рис. 3.25). Дополнительно гидрофобные фрагменты молекулы окружены гидрофобными аминокислотными остатками, что стабилизирует комплекс. С учётом теоретического характера расчётов ΔG_{bind} , аффинность исследованных соединений к целевому сайту сопоставима, что согласуется с их близкой противовирусной активностью в отношении ряда штаммов SARS-CoV-2.

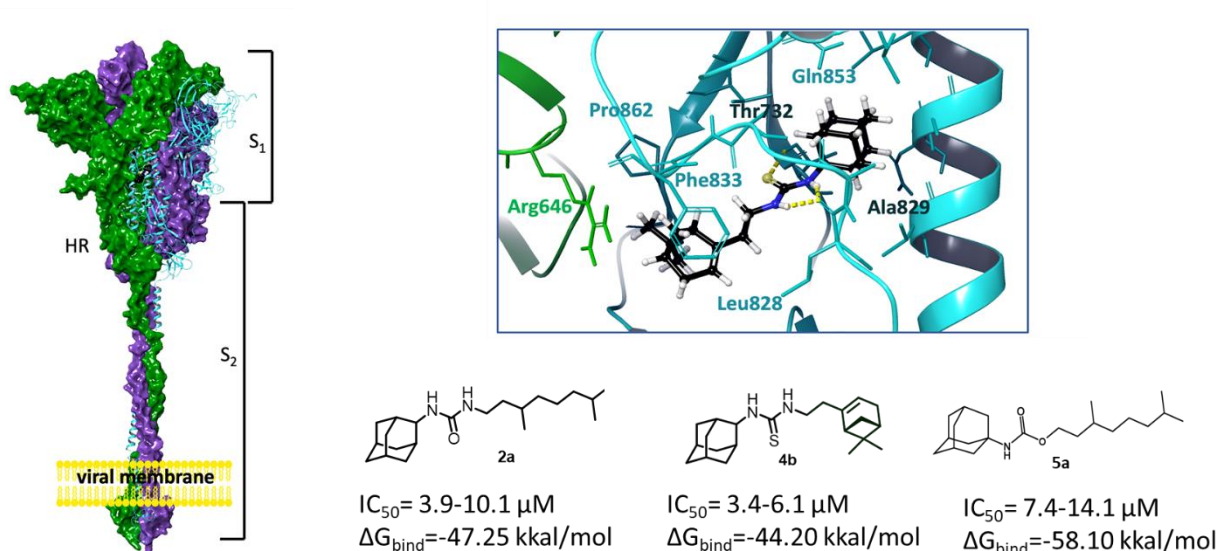


Рисунок 3.25. Расположение соединения **4b** в сайте связывания. Показан полноразмерный тример S SARS-CoV-2. В области гептадных (HR) повторов расположено соединение **4b**. Водородные мостики показаны желтыми прерывистыми линиями. Указана расчётная энергия связывания (ΔG_{bind}) соединений **2a**, **4b** и **5a**.

На основании полученных данных для библиотеки конъюгатов адамантанов и монотерпенов была оценена степень корреляции между результатами, полученными в анализах с патогенным вирусом SARS-CoV-2 и псевдовирусными частицами. Для соединений, обладающих нейтрализующей активностью, была зафиксирована степень корреляции между двумя типами анализов (коэффициент корреляции $R^2 = 0.74$) (рис 3.26). Для расчётов использовались значения IC_{50} , определённые для штамма SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1. Из 32 протестированных соединений 11 проявили активность в анализах с псевдотипированными вирусами, тогда как 7 показали ингибирующую активность в тестах с инфекционным вирусом.

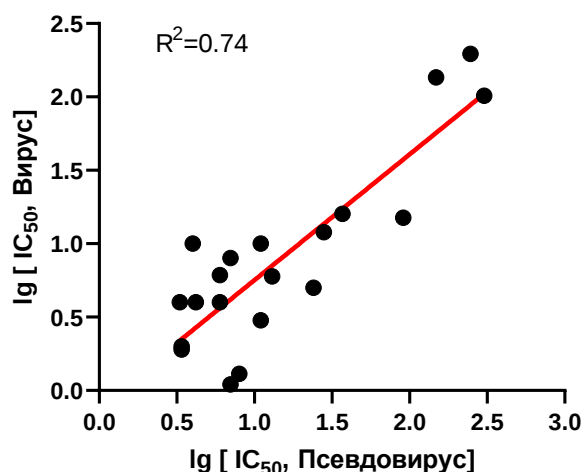


Рисунок 3.26. Корреляция анализа нейтрализации с использованием патогенного вируса и псевдовируса SARS-CoV-2.

Таким образом, в проведённом тестировании были выявлены следующие активные соединения: **11** и **21** (сложноэфирные производные борнеола); **74–77** (производные усниновой кислоты); **2a**, **4b** и **5a** (конъюгаты монотерпена и адамантана). На рисунке 3.27 представлены структуры наиболее активных соединений и результаты тестирования. Данные соединения показывают IC_{50} в диапазоне от 4.7 до 18.6 мкМ. Корреляционный анализ между значениями IC_{50} , полученными в тестах с патогенным вирусом и псевдовиральной системой, выявил, что для производных усниновой кислоты (**74–77**) наблюдается обратная зависимость: их IC_{50} на патогенном вирусе выше, чем в псевдовиральной системе.

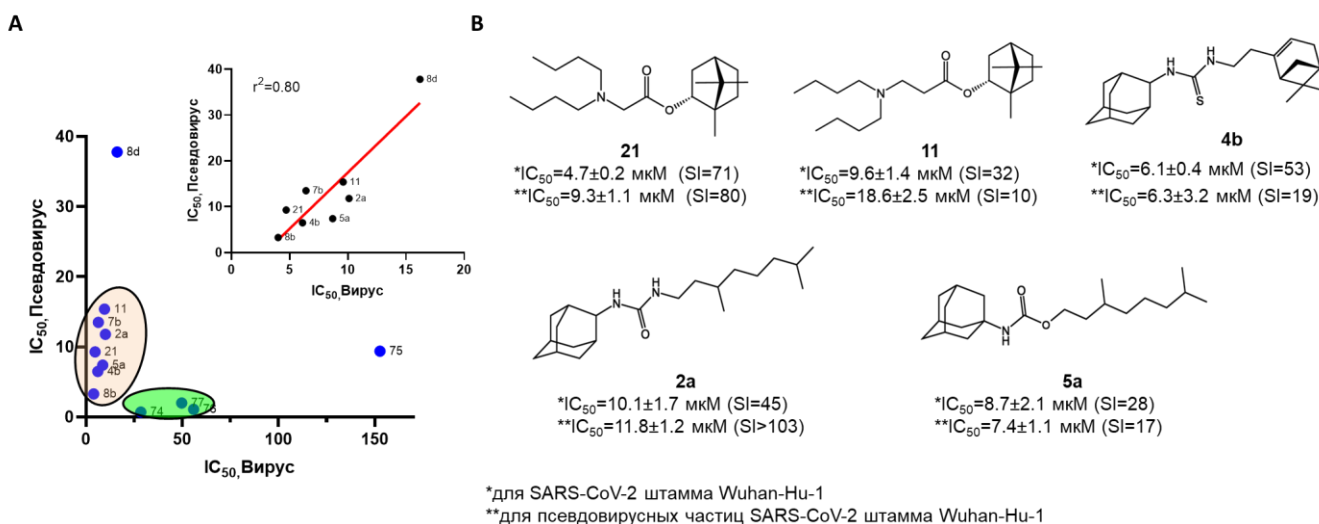


Рисунок 3.27. А. Корреляция между значениями IC_{50} , полученными в тестах с псевдовиральными частицами и патогенным вирусом SARS-CoV-2. **В.** Структуры наиболее активных соединений: **11**, **21** (производные борнеола); **2a**, **4b**, **5a** (конъюгаты адамантана и монотерпена).

При этом для соединений, действия которых, вероятно, связано с ингибированием проникновения (производные терпеноидов и конъюгаты адамантана), наблюдается высокая корреляция между двумя тест-системами ($R^2 = 0,80$). Полученные результаты подтверждают, что разработанная псевдовиральная система является подходящим инструментом для скрининга ингибиторов проникновения, однако для соединений с мультитаргетным механизмом действия необходима дополнительная валидация с использованием патогенного вируса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пандемия COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, продемонстрировала острую необходимость разработки эффективных противовирусных препаратов, нацеленных на ключевые этапы жизненного цикла вируса. Одним из наиболее перспективных направлений является ингибирование проникновения вируса в клетку хозяина, что позволяет предотвратить инфекцию на самой ранней стадии. В связи с этим поиск низкомолекулярных соединений, способных эффективно блокировать этот процесс, представляет собой актуальную задачу современной молекулярной вирусологии и фармакологии.

В рамках данной работы была разработана псевдовиральная система для скрининга низкомолекулярных соединений. Анализ литературных данных и проведенные эксперименты подтвердили, что нативная структура S белка может ограничивать эффективность сборки вирусных частиц. В связи с этим был разработан и апробирован оригинальный дизайн трех вариантов гена: полноразмерного (ph-S), с делецией 18 С-концевых аминокислот (ph-SΔ18) и с заменой лидерной последовательности на сигнальный пептид TPA (ph-lid-SΔ18). Показано, что использование конструкции ph-SΔ18 в сочетании с лентивирусной системой сборки позволяет получать псевдовиральные частицы с наибольшей функциональной активностью ($\sim 1 \times 10^5$ RLU).

Важным компонентом разработанной системы стало получение панели клеточных линий, стабильно экспрессирующих рецепторы входа коронавирусов (HEK293T-ACE2, HEK293T-ACE2-TMPRSS2 и HEK293T-DPP4). Исследования подтвердили, что коэкспрессия ACE2 и TMPRSS2 критически важна для высокой эффективности инфекции псевдовirusами SARS-CoV-2, что полностью согласуется с известными механизмами входа вируса. Наибольшее значение сигнала люминесценции было получено для псевдовиральных частиц SARS-CoV-2 на клеточной линии HEK293T-ACE2-TMPRSS2 и составило 2×10^5 RLU.

Дополнительно в работе использовали конкурентный иммуноферментный анализ с использованием рекомбинантных белков: полноразмерного белка S SARS-CoV-2 и RBD SARS-CoV-2 и ACE2-HRP. Данная система позволила напрямую оценивать способность соединений блокировать взаимодействие RBD S белка с рецептором ACE2.

С использованием обеих систем проведен комплексный скрининг производных терпеноидов и производных усниновой кислоты. Среди производных терпеноидов наибольшую активность проявили сложноэфирные производные борнеола (**11**, **21**) и фенхола (**71**), показавшие активность в псевдовиральной системе (IC_{50} 2-21 мкМ, SI до 175).

При этом было установлено, что их активность не связана с блокировкой RBD-ACE2 взаимодействия, о чем свидетельствуют отрицательные результаты в ИФА. Наиболее перспективные соединения были исследованы на патогенных штаммах SARS-CoV-2. В результате выявлен ряд высокоактивных соединений, проявляющих ингибирующую активность в низкомикромолярном диапазоне. Среди них сложноэфирные производные борнеола (соединения **11**, **21**), производные усниновой кислоты (**76**, **77**). Также производные усниновой кислоты проявили активность в отношении протеазы 3CLpro с IC₅₀ в диапазоне 13-27 мкМ.

Методами молекулярного докинга для наиболее активных производных терпеноидов (**11**, **21**) был идентифицирован потенциальный сайт связывания в области пептида слияния S2-субъединицы белка, что объясняет их механизм действия, не связанный с блокировкой связывания с ACE2.

Был проведен анализ новой библиотеки соединений, содержащей фрагмент адамантана и монотерпенов. Соединения **2a**, **4b**, **5a** проявили широкий спектр активности в низкомикромолярном диапазоне как против псевдовиральных частиц, так и против патогенных штаммов SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1, Delta, Omicron), демонстрируя относительно высокие индексы селективности (SI до 67). Соединения **7b**, **8b**, **8d** проявили активность в отношении патогенного вируса SARS-CoV-2, но не были активны в экспериментах с использованием псевдовиральных систем.

Проведенное исследование позволило идентифицировать новые соединения-кандидаты для разработки противовирусных препаратов против коронавирусов. Дальнейшее изучение выявленных лидирующих структур, включая оптимизацию их структуры и исследование *in vivo*, представляется перспективным направлением для разработки эффективных противовирусных средств.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны рекомбинантные плазмиды ph-SΔ18, ph-SΔ18_Delta, ph-SΔ18_Omicron, ph-SΔ18_XBB.1.5, ph-SARS, ph-MERS для сборки псевдовиральных частиц коронавирусов. Показано, что делеция участка, кодирующего 18 С-концевых аминокислот цитоплазматического домена поверхностного S белка варианта Wuhan-Hu-1 (конструкция ph-SΔ18), в сочетании с лентивирусной системой упаковки обеспечивает формирование функционально активных псевдовиральных частиц SARS-CoV-2 с максимальным уровнем люминесцентного сигнала ($\sim 1 \times 10^5$ RLU).

2. Для получения стабильных клеточных линий разработаны интеграционные векторы pVEAL3-ACE2, pVEAL4-ACE2-TMPRSS2 и pVEAL3-DPP4, содержащие в своем составе гены рецепторов входа коронавирусов ACE2, TMPRSS2 и DPP4. Полученные стабильные клеточные линии HEK293T-ACE2, HEK293T-ACE2-TMPRSS2 и HEK293T-DPP4, характеризуются высоким уровнем экспрессии целевых рецепторов (более 95% клеток), что подтверждено методом проточной цитофлуориметрии.

3. Установлено, что коэкспрессия рецепторов ACE2 и TMPRSS2 на клетках HEK293T-ACE2-TMPRSS2 важна для проникновения псевдовиральных SARS-CoV-2, обеспечивая максимальный сигнал люминесценции (2×10^5 RLU). Для псевдовиральных MERS-CoV и SARS-CoV максимальная трансдуцирующая активность зафиксирована на линиях HEK293T-DPP4 ($2,5 \times 10^5$ RLU) и HEK293T-ACE2-TMPRSS2 (3×10^5 RLU) соответственно.

4. С использованием разработанной псевдовиральной системы было проведено тестирование библиотеки из 109 низкомолекулярных органических соединений и выявлены лидеры.

А. Выявлены соединения-лидеры среди производных терпеноидов, обладающие ингибирующей активностью в отношении проникновения коронавирусов. С использованием разработанной псевдовиральной системы установлено, что сложнэфирные производные борнеола **11** и **21** ингибируют псевдоинфекцию SARS-CoV-2 с IC_{50} 18.6 и 9.3 мкМ соответственно и проявляют активность в отношении патогенных штаммов SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1, Delta, Omicron) с IC_{50} в диапазоне 3.3–17.6 мкМ при индексе селективности SI до 102. Методом молекулярного докинга идентифицирован вероятный сайт связывания данных соединений в S2 субъединице S-белка (область HR1/CHR).

Б. Идентифицированы производные усниновой кислоты с мультитаргетным механизмом противовирусного действия. Соединения **76** и **77** проявили высокую активность в

отношении псевдовиральных частиц SARS-CoV-2 (IC_{50} 1.1 и 2.0 мкМ, SI 649 и 100 соответственно) и патогенных штаммов SARS-CoV-2, включая варианты Omicron XBB.1.5 и BQ.1.1 (IC_{50} 5.6–52.7 мкМ). Установлена способность данных соединений ингибировать 3CL-протеазу SARS-CoV-2 с IC_{50} 13.5–15.5 мкМ, что свидетельствует о мультитаргетном характере их действия.

В. Определены конъюгаты адамантана и монотерпенов с широким спектром противовирусной активности. Среди протестированных конъюгатов наиболее активными ингибиторами псевдовиральных частиц SARS-CoV-2, SARS-CoV и MERS-CoV являются соединения **2a** и **2b**, содержащие ациклический монотерпеновый заместитель и фрагмент (-)-нопола соответственно (IC_{50} для SARS-CoV-2 составляет 7.2–11.8 мкМ, SI>10). Соединения **2a**, **4b** и **5a** подтвердили высокую активность (IC_{50} 3.7–14.1 мкМ) в отношении патогенных штаммов SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1, Delta, Omicron).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grubaugh N. D., et al. Tracking virus outbreaks in the twenty-first century // *Nature Microbiology*. – 2019. – Vol. 4, № 1. – P. 10–19.
2. Lundstrom K. Coronavirus pandemic: treatment and future prevention // *Future Microbiology*. – 2020. – Vol. 15, № 15. – P. 1507–1521.
3. Aw D. Z. H., Zhang D. X., Vignuzzi M. Strategies and efforts in circumventing the emergence of antiviral resistance against conventional antivirals // *Antimicrobial Resistance*. – 2025. – Vol. 3, № 1.
4. Tan C., et al. The development and application of pseudoviruses: assessment of SARS-CoV-2 pseudoviruses // *PeerJ*. – 2023. – Vol. 11. – P. 1–17.
5. Cui J., Li F., Shi Z. L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses // *Nature Reviews Microbiology*. – 2019. – Vol. 17, № 3. – P. 181–192.
6. V'kovski P., et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 // *Nature Reviews Microbiology*. – 2021. – Vol. 19, № 3. – P. 155–170.
7. Gorkhali R., et al. Structure and function of major SARS-CoV-2 and SARS-CoV proteins // *Bioinformatics and Biology Insights*. – 2021. – Vol. 15.
8. Hardenbrook N. J., Zhang P. A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly // *Current Opinion in Virology*. – 2022. – Vol. 52. – P. 123–134.
9. Fehr A. R., Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis // *Methods in Molecular Biology*. – 2015.
10. Cao Y., et al. Characterization of the SARS-CoV-2 E protein: sequence, structure, viroporin, and inhibitors // *Protein Science*. – 2021. – Vol. 30, № 6. – P. 1114–1130.
11. Zhou S., et al. SARS-CoV-2 E protein: pathogenesis and potential therapeutic development // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2023. – Vol. 159. – P. 114242.
12. Santos-Mendoza T. The envelope (E) protein of SARS-CoV-2 as a pharmacological target // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15, № 4.
13. Xia B., et al. SARS-CoV-2 envelope protein causes acute respiratory distress syndrome (ARDS)-like pathological damages and constitutes an antiviral target // *Cell Research*. – 2021. – Vol. 31, № 8. – P. 847–860.
14. Cubuk J., et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12, № 1. – P. 1–17.
15. Zeng W., et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2020. – Vol. 527, № 3. – P. 618–623.

16. Bai Z., et al. Structure and biological functions of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein as a potential drug target // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – P. 1115.
17. Surjit M., Lal S. K. The SARS-CoV nucleocapsid protein: a protein with multifarious activities // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2008. – Vol. 8. – P. 397–405.
18. Zhang J., et al. Structure of SARS-CoV-2 spike protein // *Current Opinion in Virology*. – 2021. – Vol. 50. – P. 173–182.
19. Guan X., Yang Y., Du L. Advances in SARS-CoV-2 receptor-binding domain-based COVID-19 vaccines // *Expert Review of Vaccines*. – 2023. – Vol. 22, № 1. – P. 422–439.
20. Walls A. C., et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein // *Cell*. – 2020. – Vol. 181, № 2. – P. 281–292.
21. Chambers J. P., et al. SARS-CoV-2 early entry events // *Journal of Pathogens*. – 2020. – Vol. 2020. – P. 1–11.
22. Shang J., et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2 // *Nature*. – 2020. – Vol. 581, № 7807. – P. 221–224.
23. Samavati L., Uhal B. D. ACE2, much more than just a receptor for SARS-CoV-2 // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2020. – Vol. 10. – P. 1–9.
24. Saponaro F., et al. ACE2 in the era of SARS-CoV-2: controversies and novel perspectives // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2020. – Vol. 7. – P. 1–25.
25. Lan J., et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor // *Nature*. – 2020. – Vol. 581, № 7807. – P. 215–220.
26. Ali A., Vijayan R. Dynamics of the ACE2–SARS-CoV-2/SARS-CoV spike protein interface reveal unique mechanisms // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 1–12.
27. Wan Y., et al. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus // *Journal of Virology*. – 2020. – Vol. 94, № 7.
28. Lak A. K. Š., Ska A. L. Ń. Galectin-3 as a multifunctional protein // *Cellular and Molecular Biology Letters*. – 2004. – Vol. 9. – P. 305–328.
29. Seyran M., et al. The structural basis of accelerated host cell entry by SARS-CoV-2 // *FEBS Journal*. – 2021. – Vol. 288, № 17. – P. 5010–5020.
30. Behloul N., et al. Role of the GTNGTKR motif in the N-terminal receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein // *Virus Research*. – 2020. – Vol. 286. – P. 198058.
31. Soh W. T. et al. The N-terminal domain of spike glycoprotein mediates SARS-CoV-2 infection by associating with L-SIGN and DC-SIGN // *bioRxiv*. – 2020. – P. 1–30.

32. Ashhurst A. S. et al. Potent Anti-SARS-CoV-2 Activity by the Natural Product Gallinamide A and Analogues via Inhibition of Cathepsin L // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2022. – Vol. 65, No. 4. – P. 2956–2970.
33. Jackson C. B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2022. – Vol. 23, No. 1. – P. 3–20.
34. Plante J. A. et al. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness // *Nature*. – 2021. – Vol. 592, No. 7852. – P. 116–121.
35. Zhang J. et al. Structural impact on SARS-CoV-2 spike protein by D614G substitution // *Science*. – 2021. – Vol. 372, No. 6541. – P. 525–530.
36. Berger I., Schaffitzel C. The SARS-CoV-2 spike protein: balancing stability and infectivity // *Cell Research*. – 2020. – Vol. 30, No. 12. – P. 1059–1060.
37. Marchetti C. et al. Heptad stereotypy, S/Q layering, and remote origin of the SARS-CoV-2 fusion core // *Virus Evolution*. – 2021. – Vol. 7, No. 2. – P. 1–23.
38. Wang M. Y. et al. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2020. – Vol. 10. – P. 1–17.
39. White J. M. et al. Structures and Mechanisms of Viral Membrane Fusion Proteins // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 2008. – Vol. 43, No. 3. – P. 189–219.
40. Duan L. et al. The SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Biosynthesis, Structure, Function, and Antigenicity: Implications for the Design of Spike-Based Vaccine Immunogens // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 1–12.
41. Mayi B. S. et al. The role of Neuropilin-1 in COVID-19 // *PLoS Pathogens*. – 2021. – Vol. 17, No. 1. – P. 1–8.
42. Clausen T. M. et al. SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2 // *Cell*. – 2020. – Vol. 183, No. 4. – P. 1043–1057.
43. Zhang Q. et al. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2021. – Vol. 6, No. 1.
44. De Clercq E. Antivirals and antiviral strategies // *Nature Reviews Microbiology*. – 2004. – Vol. 2, No. 9. – P. 704–720.
45. Steiner S. et al. SARS-CoV-2 biology and host interactions // *Nature Reviews Microbiology*. – 2024. – Vol. 22, No. 4. – P. 206–225.
46. Beeraka N. M. et al. Strategies for Targeting SARS CoV-2: Small Molecule Inhibitors—The Current Status // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – Vol. 11.
47. Cannalire R. et al. Targeting SARS-CoV-2 Proteases and Polymerase for COVID-19 Treatment: State of the Art and Future Opportunities // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2022. – Vol. 65, No. 4. – P. 2716–2746.

48. Anirudhan V. et al. Targeting SARS-CoV-2 viral proteases as a therapeutic strategy to treat COVID-19 // *Journal of Medical Virology*. – 2021. – Vol. 93, No. 5. – P. 2722–2734.
49. Di Marco L. et al. A Comprehensive Review of Antiviral Therapy for Hepatitis C: The Long Journey from Interferon to Pan-Genotypic Direct-Acting Antivirals (DAAs) // *Viruses*. – 2025. – Vol. 17, No. 2. – P. 1–18.
50. Majerová T., Konvalinka J. Viral proteases as therapeutic targets // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2022. – Vol. 88.
51. Akinosoglou K., Schinas G., Gogos C. Oral Antiviral Treatment for COVID-19: A Comprehensive Review on Nirmatrelvir/Ritonavir // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, No. 11.
52. Fu Z. et al. The complex structure of GRL0617 and SARS-CoV-2 PLpro reveals a hot spot for antiviral drug discovery // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12, No. 1. – P. 1–12.
53. Kokic G. et al. Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12, No. 1. – P. 1–7.
54. Wang Y. et al. RNA-dependent RNA polymerase of SARS-CoV-2 as a therapeutic target // *Journal of Medical Virology*. – 2021. – Vol. 93, No. 1. – P. 300–310.
55. Tao K., Jagannathan P., Shafer W. SARS-CoV-2 Antiviral Therapy // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2021. – Vol. 34, No. 4.
56. Peng Q. et al. Structural Basis of SARS-CoV-2 Polymerase Inhibition by Favipiravir // *Innovation*. – 2021. – Vol. 2, No. 1. – P. 100080.
57. Shyr Z. A. et al. Drug discovery strategies for SARS-CoV-2 // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2020. – Vol. 375, No. 1. – P. 127–138.
58. Van Damme E. et al. A small-molecule SARS-CoV-2 inhibitor targeting the membrane protein // *Nature*. – 2025. – Vol. 640, No. 8058. – P. 506–513.
59. Laporte M. et al. A coronavirus assembly inhibitor that targets the viral membrane protein // *Nature*. – 2025. – Vol. 640, No. 8058. – P. 514–523.
60. A. Srinivas Reddy et al. Virtual Screening in Drug Discovery – A Computational Perspective // *Current Protein and Peptide Science*. – 2007. – Vol. 8, No. 4. – P. 329–351.
61. Kitchen D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2004. – Vol. 3, No. 11. – P. 935–949.
62. Lionta E. et al. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: Principles, Applications and Recent Advances // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2014. – Vol. 14, No. 16. – P. 1923–1938.
63. Adel Hamza N.-N. W., Zhan C.-G. Ligand-Based Virtual Screening Approach Using a New Scoring Function // *Journal of Chemical Information and Modeling*. – 2012. – Vol. 52, No. 4. – P. 963–974.

64. McInnes C. Virtual screening strategies in drug discovery // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2007. – Vol. 11, No. 5. – P. 494–502.
65. Trischitta P. et al. Pseudovirus-Based Systems for Screening Natural Antiviral Agents: A Comprehensive Review // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2024. – Vol. 25, No. 10.
66. Li Q. et al. Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses // *Reviews in Medical Virology*. – 2018. – Vol. 28, No. 1. – P. 1–10.
67. Kaufer A. M. et al. Laboratory biosafety measures involving SARS-CoV-2 and the classification as a Risk Group 3 biological agent // *Pathology*. – Vol. 52, No. 7. – P. 790–795.
68. СП 1.2.036-95. 1.2. Эпидемиология. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности. Санитарные правила (утв. Постановлением Госкомсанэпиднадзора РФ от 28.08.1995 № 14).
69. Wakita T. et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome // *Nature Medicine* – 2005. – Vol. 11, No. 7. – P. 791–796.
70. Lu Y. et al. Advances in Neutralization Assays for SARS-CoV-2 // *Scandinavian Journal of Immunology*. – 2021. – Vol. 94, No. 3. – P. 1–15.
71. Baer A., Kehn-Hall K. Viral concentration determination through plaque assays: Using traditional and novel overlay systems // *Journal of Visualized Experiments*. – 2014. – No. 93. – P. 1–10.
72. Mendoza E. J. et al. Two Detailed Plaque Assay Protocols for the Quantification of Infectious SARS-CoV-2 // *Current Protocols in Microbiology*. – 2020. – Vol. 57, No. 1. – P. 1–15.
73. Bewley K. R. et al. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays // *Nature Protocols*. – 2021. – Vol. 16, No. 6. – P. 3114–3140.
74. Vanderheiden A. et al. Development of a Rapid Focus Reduction Neutralization Test Assay for Measuring SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies // *Current Protocols in Immunology*. – 2020. – Vol. 131, No. 1. – P. 1–14.
75. Schneider C. S. et al. Surface plasmon resonance as a high throughput method to evaluate specific and non-specific binding of nanotherapeutics // *Journal of Controlled Release*. – 2015. – Vol. 219. – P. 331–344.
76. Schasfoort R. B. M. Introduction to Surface Plasmon Resonance // *Handbook of Surface Plasmon Resonance* / ed. Schasfoort R. B. M. – The Royal Society of Chemistry, 2017. – P. 1–26.

77. Englebienne P., Van Hoonacker A., Verhas M. Surface plasmon resonance: Principles, methods and applications in biomedical sciences // *Spectroscopy*. – 2003. – Vol. 17, No. 2–3. – P. 255–273.
78. Kumar P. K. R. Systematic screening of viral entry inhibitors using surface plasmon resonance // *Reviews in Medical Virology*. – 2017. – Vol. 27, No. 6. – P. 1–12.
79. Petersen R. L. Strategies using bio-layer interferometry biosensor technology for vaccine research and development // *Biosensors*. – 2017. – Vol. 7, No. 4.
80. Jug A., Bratkovič T., Ilaš J. Biolayer interferometry and its applications in drug discovery and development // *TrAC Trends in Analytical Chemistry* – 2024. – Vol. 176.
81. Murali S. et al. Applications of Surface Plasmon Resonance and Biolayer Interferometry for Virus–Ligand Binding // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, No. 4.
82. Nienaber V. L. et al. Discovering novel ligands for macromolecules using X-ray crystallographic screening // *Nature Biotechnology*. – 2000. – Vol. 18, No. 10. – P. 1105–1108.
83. Zhao Y. et al. Toremifene interacts with and destabilizes the Ebola virus glycoprotein // *Nature*. – 2016. – Vol. 535, No. 7610. – P. 169–172.
84. Rosa A. et al. SARS-CoV-2 can recruit a heme metabolite to evade antibody immunity // *Science Advances*. – 2021. – Vol. 7, No. 22. – P. 1–14.
85. Zuiderweg E. R. P. Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy // *Biochemistry*. – 2002. – Vol. 41, No. 1. – P. 1–7.
86. Gossert A. D., Jahnke W. NMR in drug discovery: A practical guide to identification and validation of ligands interacting with biological macromolecules // *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. – 2016. – Vol. 97. – P. 82–125.
87. Nogales E., Scheres S. H. W. Cryo-EM: A Unique Tool for the Visualization of Macromolecular Complexity // *Molecular Cell*. – 2015. – Vol. 58, No. 4. – P. 677–689.
88. Wrapp D. et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation // *Science*. – 2020. – Vol. 367, No. 6483. – P. 1260–1263.
89. Wang Q. et al. In Silico Discovery of Small Molecule Modulators Targeting the Achilles' Heel of SARS-CoV-2 Spike Protein // *ACS Central Science*– 2023. – Vol. 9, No. 2. – P. 252–265.
90. Fu W. et al. Repurposing FDA-approved drugs for SARS-CoV-2 through an ELISA-based screening for the inhibition of RBD/ACE2 interaction // *Protein Cell*. – 2021. – Vol. 12, No. 7. – P. 586–591.
91. Mendonça D. A. et al. Repurposing anti-cancer porphyrin derivative drugs to target SARS-CoV-2 envelope // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2024. – Vol. 176.

92. Herrmann L. et al. Synthesis and in vitro Study of Artemisinin/Synthetic Peroxide-Based Hybrid Compounds against SARS-CoV-2 and Cancer // *ChemMedChem*. – 2022. – Vol. 17, No. 9. – P. 1–6.
93. Zhang D. qi et al. Peroxide derivatives as SARS-CoV-2 entry inhibitors // *Virus Research*. – 2024. – Vol. 340. – P. 199295.
94. Acharya A. et al. Discovery and Evaluation of Entry Inhibitors for SARS-CoV-2 and Its Emerging Variants // *Journal of Virology*. – 2021. – Vol. 95, No. 24.
95. Wang L. et al. Discovery of potential small molecular SARS-CoV-2 entry blockers targeting the spike protein // *Acta Pharmacologica Sinica*. –2022. – Vol. 43, No. 4. – P. 788–796.
96. Yang C. et al. Salvianolic acid C potently inhibits SARS-CoV-2 infection by blocking the formation of six-helix bundle core of spike protein // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2020. – Vol. 5, No. 1. – P. 2–4.
97. Zhang D. et al. Identification of natural compounds as SARS-CoV-2 entry inhibitors by molecular docking-based virtual screening with bio-layer interferometry // *Pharmacological Research*. – 2021. – Vol. 172. – P. 105820.
98. Gao J. et al. Kaempferol inhibits SARS-CoV-2 invasion by impairing heptad repeats-mediated viral fusion // *Phytomedicine*. – 2023. – Vol. 118. – P. 154942.
99. Vankadari N. Arbidol: A potential antiviral drug for the treatment of SARS-CoV-2 by blocking trimerization of the spike glycoprotein // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2020. – Vol. 56, No. 2. – P. 105998.
100. Wang M. et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro // *Cell Research*. – 2020. – Vol. 30, No. 3. – P. 269–271.
101. Fantini J. et al. Structural and molecular modelling studies reveal a new mechanism of action of chloroquine and hydroxychloroquine against SARS-CoV-2 infection // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2020. – Vol. 55, No. 5. – P. 105960.
102. Hu X. et al. Discovery of Small Molecule Entry Inhibitors Targeting the Fusion Peptide of SARS-CoV-2 Spike Protein // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2021. – Vol. 12, No. 8. – P. 1267–1274.
103. Chen Y. et al. Sertraline Is an Effective SARS-CoV-2 Entry Inhibitor Targeting the Spike Protein // *Journal of Virology*. – 2022. – Vol. 96, No. 24.
104. Zhao M. M. et al. Cathepsin L plays a key role in SARS-CoV-2 infection in humans and humanized mice and is a promising target for new drug development // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2021. – Vol. 6, No. 1.
105. Fink K. et al. Amantadine inhibits SARS-CoV-2 in vitro // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, No. 4. – P. 1–10.

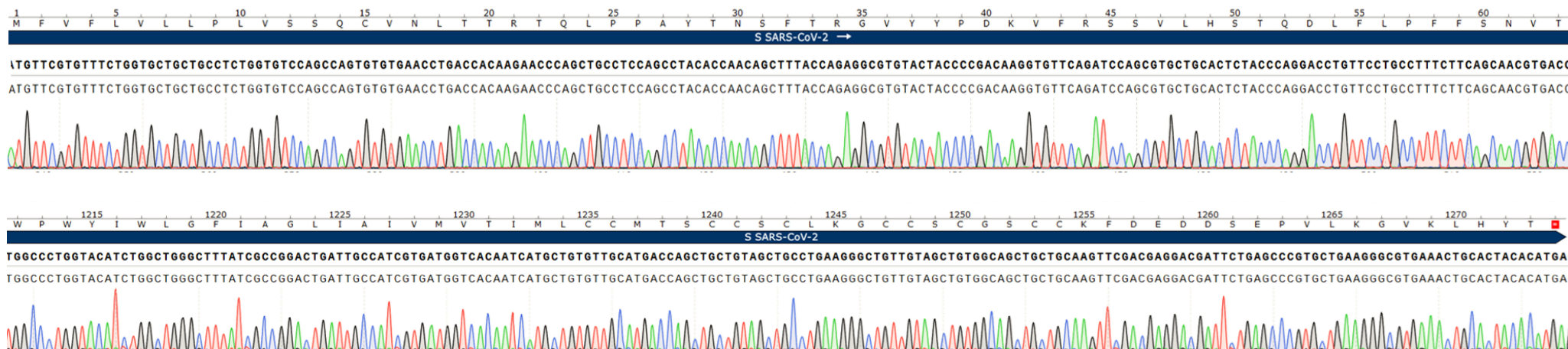
106. Smieszek S. P., Przychodzen B. P., Polymeropoulos M. H. Amantadine disrupts lysosomal gene expression: A hypothesis for COVID19 treatment // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2020. – Vol. 55, No. 6.
107. Mollica V., Rizzo A., Massari F. The pivotal role of TMPRSS2 in coronavirus disease 2019 and prostate cancer // *Future Oncology*. – 2020. – Vol. 16, No. 27. – P. 2029–2033.
108. Parmar M. S. TMPRSS2: An Equally Important Protease as ACE2 in the Pathogenicity of SARS-CoV-2 Infection // *Perspectives and Controversies*. – 2020. – Vol. 8. – P. 147–154.
109. Kim T. S. et al. Phenotypic Analysis of Mice Lacking the Tmprss2-Encoded Protease // *Molecular and Cellular Biology*. – 2006. – Vol. 26, No. 3. – P. 965–975.
110. Hoffmann M. et al. Nafamostat mesylate blocks activation of SARS-CoV-2: New treatment option for COVID-19 // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2020. – Vol. 64, No. 6. – P. 19–21.
111. Wettstein L., Kirchhoff F., Münch J. The Transmembrane Protease TMPRSS2 as a Therapeutic Target for COVID-19 Treatment // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23, No. 3.
112. Khan U. et al. Safety and Efficacy of Camostat Mesylate for Covid-19: a systematic review and Meta-analysis of Randomized controlled trials // *BMC Infectious Diseases*. – 2024. – Vol. 24, No. 1. – P. 1–15.
113. Hernández-Mitre M. P. et al. TMPRSS2 inhibitors for the treatment of COVID-19 in adults: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials of nafamostat and camostat mesylate // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2024. – Vol. 30, No. 6. – P. 743–754.
114. Villoutreix B. O., Badiola I., Khatib A.-M. Furin and COVID-19: Structure, Function and Chemoinformatic Analysis of Representative Active Site Inhibitors // *Frontiers in Drug Discovery* – 2022. – Vol. 2. – P. 1–7.
115. Braun E., Sauter D. Furin-mediated protein processing in infectious diseases and cancer // *Clinical & Translational Immunology*. – 2019. – Vol. 8, No. 8. – P. 1–19.
116. Essalmani R. et al. Distinctive Roles of Furin and TMPRSS2 in SARS-CoV-2 Infectivity // *Journal of Virology*. – 2022. – Vol. 96, No. 8.
117. Bestle D. et al. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells // *Life Science Alliance*. – 2020. – Vol. 3, No. 9. – P. 1–14.
118. Wu J. et al. Advances in research on ACE2 as a receptor for 2019-nCoV // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2021. – Vol. 78, No. 2. – P. 531–544.

119. Turner A. J. ACE2 Cell Biology, Regulation, and Physiological Functions // The Protective Arm of the Renin Angiotensin System: Functional Aspects and Therapeutic Implications / ed. Unger T., Steckelings U. M., Santos R. A. S. – 2015. – P. 185–189.
120. Vaduganathan M. et al. Renin–Angiotensin–Aldosterone System Inhibitors in Patients with Covid-19 // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – Vol. 382, No. 17. – P. 1653–1659.
121. Verdecchia P. et al. The pivotal link between ACE2 deficiency and SARS-CoV-2 infection // *European Journal of Internal Medicine*. – 2020. – Vol. 76. – P. 14–20.
122. Neerukonda S. N. et al. Establishment of a well-characterized SARS-CoV-2 lentiviral pseudovirus neutralization assay using 293T cells with stable expression of ACE2 and TMPRSS2 // *PLoS One*. – 2021. – Vol. 16, No. 3. – P. 1–19.
123. Yu J. et al. Deletion of the SARS-CoV-2 Spike Cytoplasmic Tail Increases Infectivity in Pseudovirus Neutralization Assays // *Journal of Virology*. – 2021. – Vol. 95, No. 11.
124. Nie Y. et al. Highly infectious SARS-CoV pseudotyped virus reveals the cell tropism and its correlation with receptor expression // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2004. – Vol. 321, No. 4. – P. 994–1000.
125. Wang J. Y. et al. Improved expression of secretory and trimeric proteins in mammalian cells via the introduction of a new trimer motif and a mutant of the tPA signal sequence // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 91, No. 3. – P. 731–740.
126. Wang S. et al. Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine // *Vaccine*. – 2006. – Vol. 24, No. 21. – P. 4531–4540.
127. Choi J. Y., Smith D. M. SARS-CoV-2 Variants of Concern // *Yonsei Medical Journal*. – 2021. – Vol. 62, No. 11. – P. 961–968.
128. Исаева А. А., Несмеянова В. С., Зыбкина А. В., Щербаков Д. Н., Шаньшин Д. В., Волкова Н. В. Универсальный интеграционный вектор pVEAL и рекомбинантная плаزمида pVEAL-15742, обеспечивающая синтез и секрецию scFv-Fc антител ADI-15742 против вируса Эбола в клетках млекопитающих и полученная с использованием вектора pVEAL. – Патент RU 2749459 C1. – 2021.
129. Schoof M. et al. An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive Spike // *Science*. – 2020. – Vol. 370, No. 6523. – P. 1473–1479.
130. Modhiran N. et al. A nanobody recognizes a unique conserved epitope and potently neutralizes SARS-CoV-2 Omicron variants // *iScience*. – 2023. – Vol. 26, No. 7.
131. King L.B. et al. The Marburgvirus-Neutralizing Human Monoclonal Article The Marburgvirus-Neutralizing Human Monoclonal Antibody MR191 Targets a Conserved Site to Block Virus Receptor Binding // *Cell Host Microbe*. – 2018. – Vol. 23, № 1. P. 101-109.

132. Хабриев Р. У. и др. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
133. Бунятян Н. Д., Васильев А. Н., Верстакова О. Л., Журавлева М. В., Лепяхин В. К., Коробов Н. В., Меркулов В. А., Орехов С. Н., Сакаева И. В., Утешев Д. Б., Ягудина А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздравсоцразвития России, 2012. – Ч. 1. – 944 с.
134. Nojomi M. et al. Effect of Arbidol (Umifenovir) on COVID-19: a randomized controlled trial // *BMC Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 20, No. 1. – P. 1–10.
135. Amani B., Zareei M. Efficacy and safety of arbidol (umifenovir) in patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis // *Reviews in Medical Virology*. – 2021. – Vol. 31, No. 6.
136. Bojadzic D. et al. Small-Molecule Inhibitors of the Coronavirus Spike: ACE2 Protein – Protein Interaction as Blockers of Viral Attachment and Entry for SARS-CoV // *ACS Infectious Diseases*. – 2021. – Vol. 7, No. 6. – P. 1519–1534.
137. Macedo D. C. S. et al. Usnic acid: from an ancient lichen derivative to promising biological and nanotechnology applications // *Phytochemistry Reviews*. – 2021. – Vol. 20, No. 3. – P. 609–630.
138. Filimonov A. S. et al. (+)-Usnic Acid and Its Derivatives as Inhibitors of a Wide Spectrum of SARS-CoV-2 Viruses // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, No. 10.
139. Wishnok J. S. Medicinal properties of adamantane derivatives // *Journal of Chemical Education*. – 1973. – Vol. 50, No. 11. – P. 780–789.
140. Lamoureux G., Artavia G. Use of the Adamantane Structure in Medicinal Chemistry // *Current Medicinal Chemistry*. – 2010. – Vol. 17, No. 26. – P. 2967–2978.
141. Mozhaitsev E. S. et al. Structure-Based Design, Synthesis, and Biological Evaluation of the Cage–Amide Derived Orthopox Virus Replication Inhibitors // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15, No. 1.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Фрагменты секвенограмм конструкций ph-S, ph-SA18, ph-lid-SA18, ph-SA18_Delta, ph-SA18_Omicron, ph-SA18_XBB.1.5, ph-SARS и ph-MERS

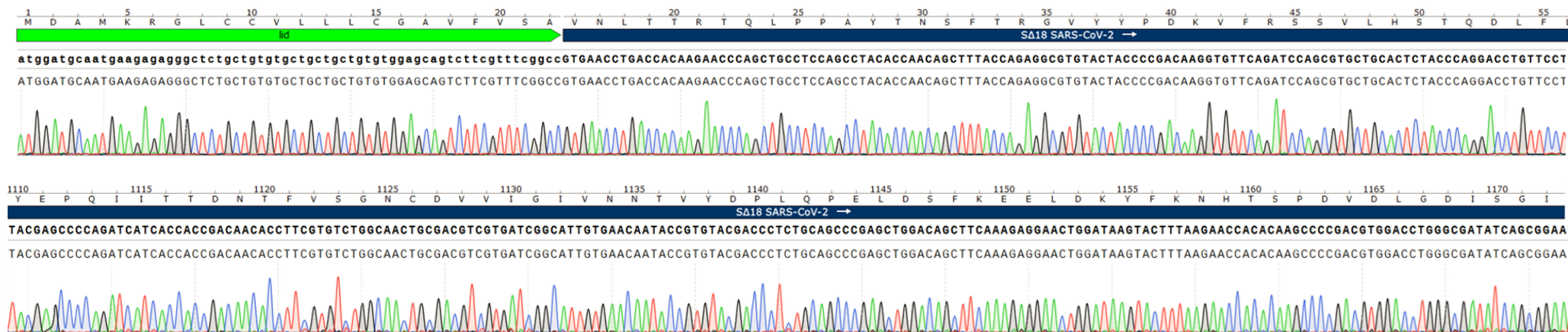
Фрагменты секвенограммы конструкции ph-S



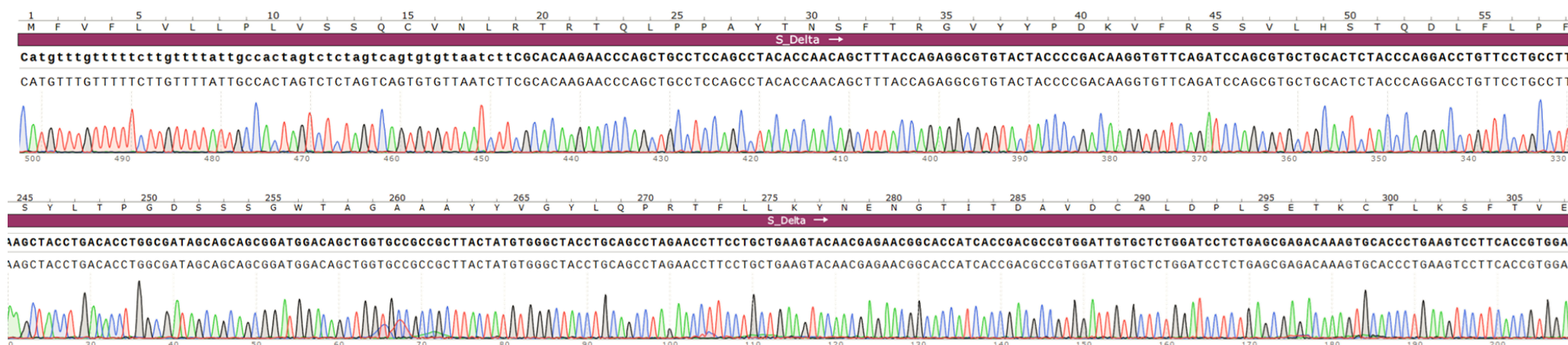
Фрагменты секвенограммы конструкции ph-SA18



Фрагменты секвенограммы конструкции ph-lid-SΔ18



Фрагменты секвенограммы конструкции ph-SΔ18_Delta



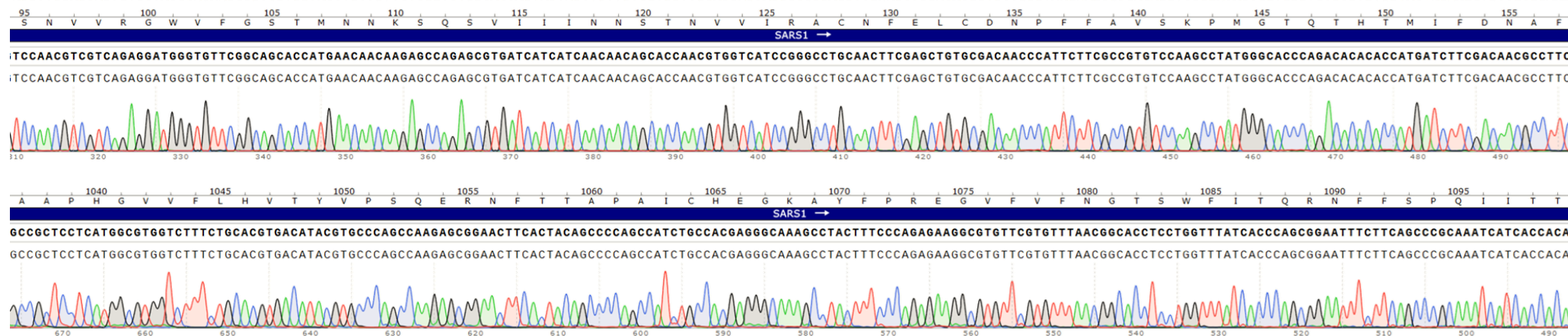
Фрагменты секвенограммы конструкции ph-SA18_Omicron



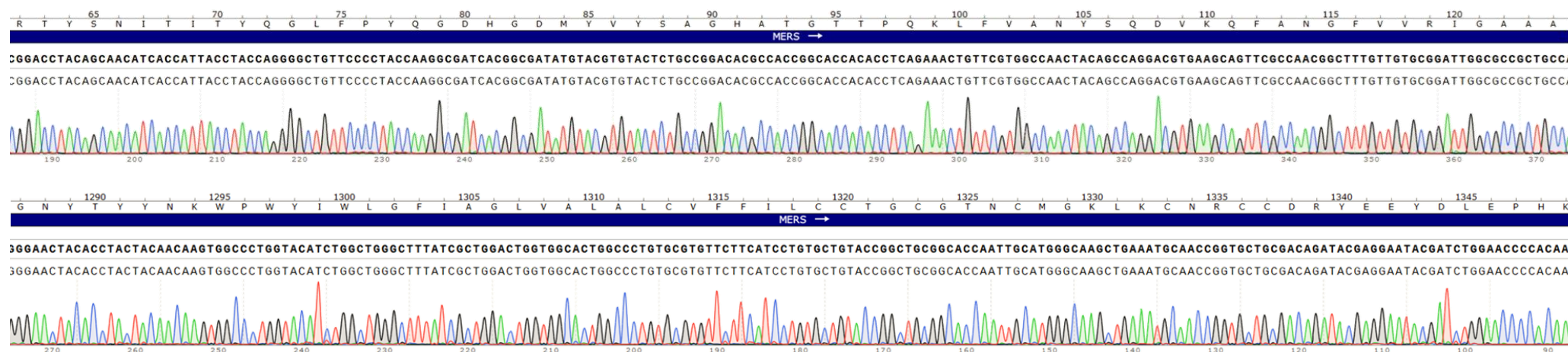
Фрагменты секвенограммы конструкции ph-SA18_XBB.1.5



Фрагменты секвенограммы конструкции rh-SARS

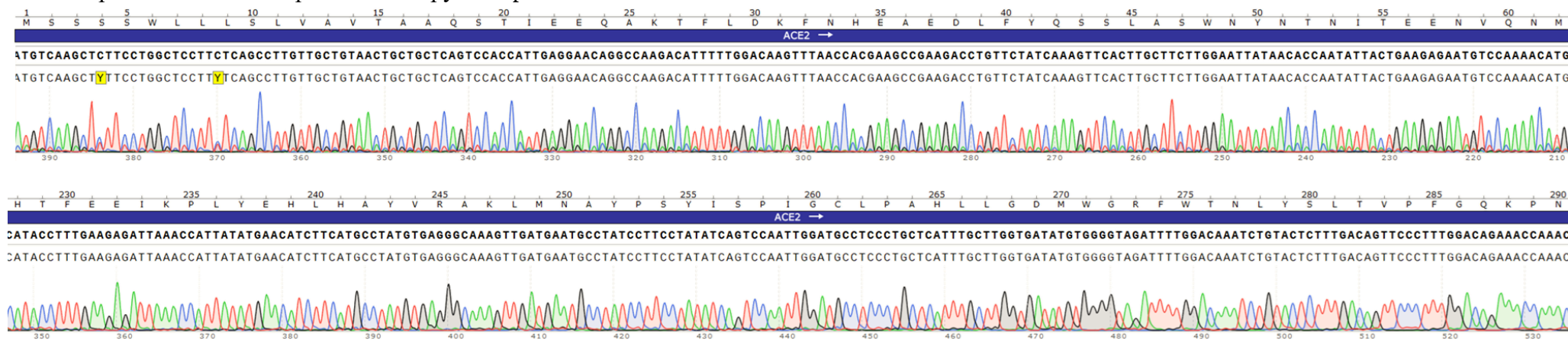


Фрагменты секвенограммы конструкции rh-MERS



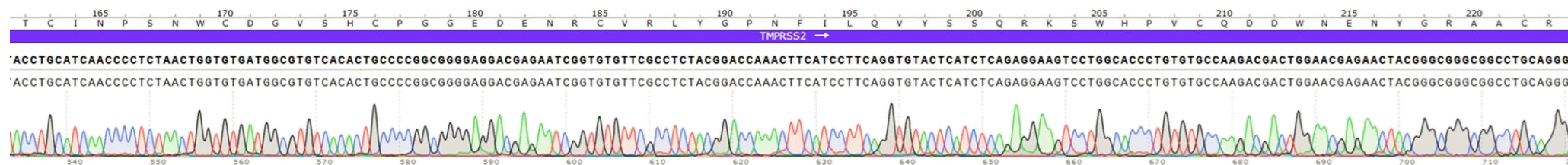
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Фрагменты секвенограмм конструкций pVEAL3-ACE2, pVEAL4-ACE2-TMPRSS2 и pVEAL3-DPP4

Фрагменты секвенограммы конструкции pVEAL3-ACE2

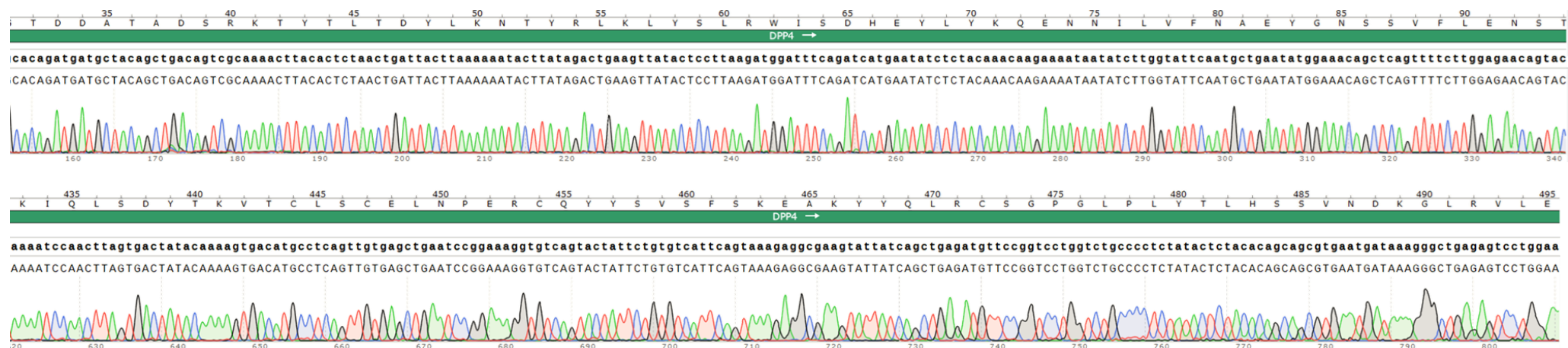


Фрагменты секвенограммы конструкции pVEAL4-ACE2-TMPRSS2

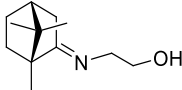
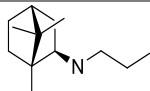
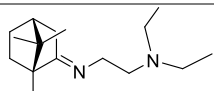
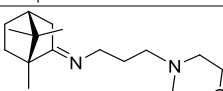
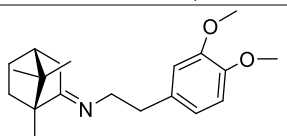
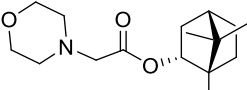
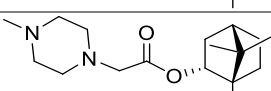
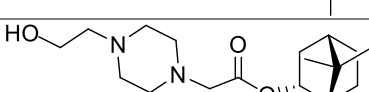
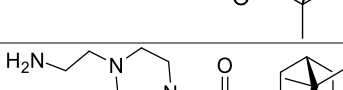
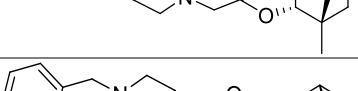
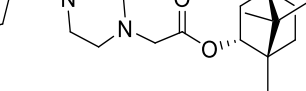
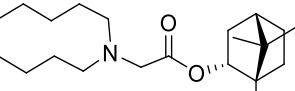


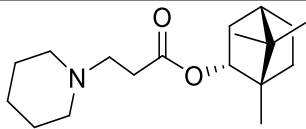
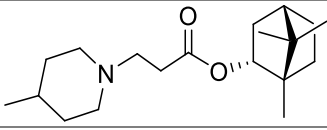
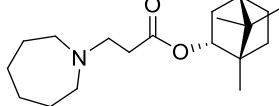
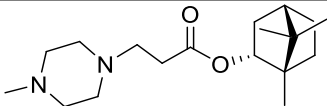
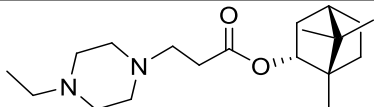
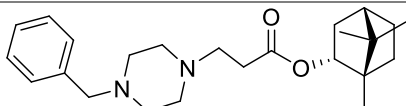
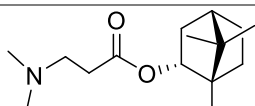
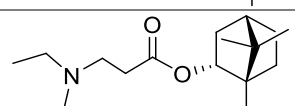
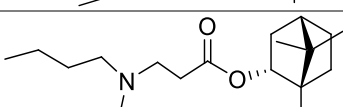
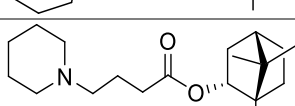
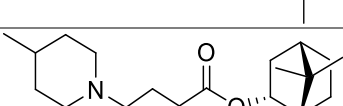
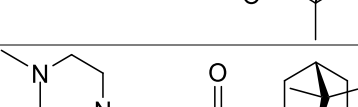
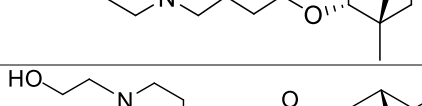
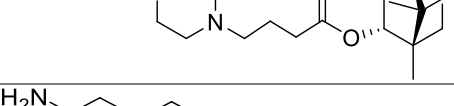
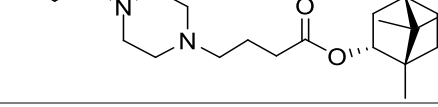


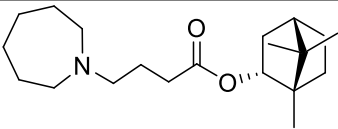
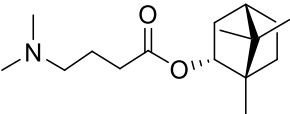
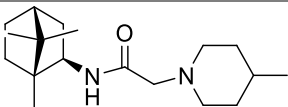
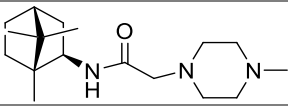
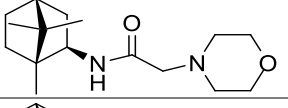
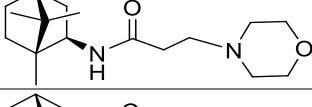
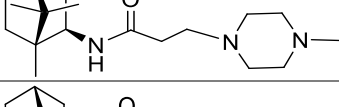
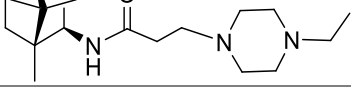
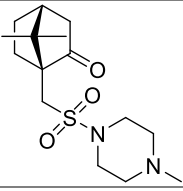
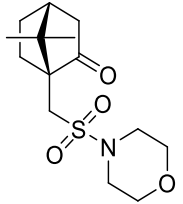
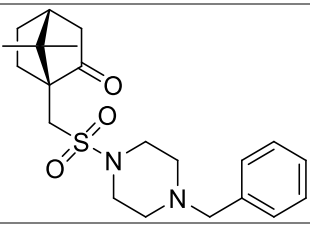
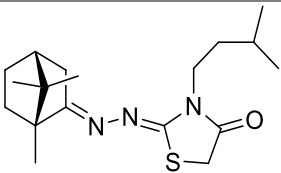
Фрагменты секвенограммы конструкции pVEAL3-DPP4

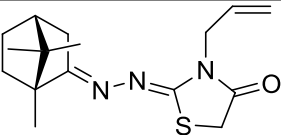
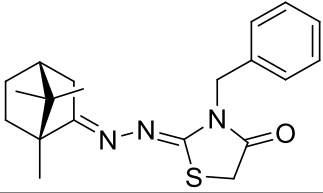
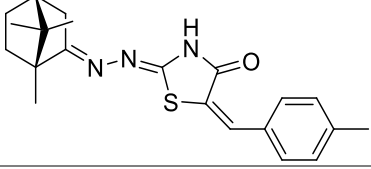
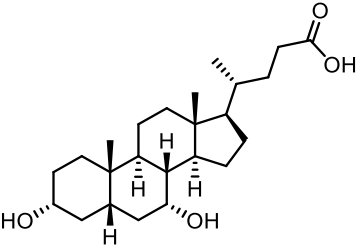
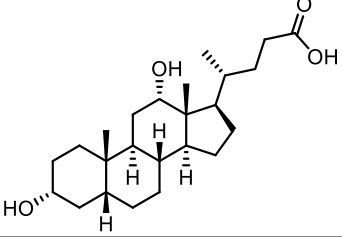
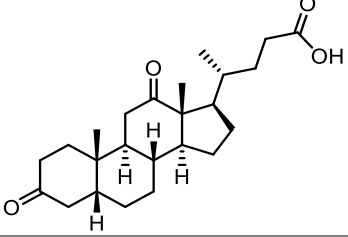
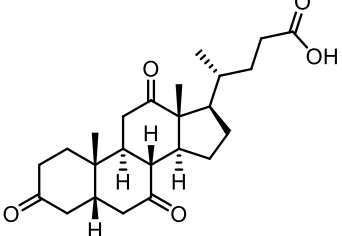
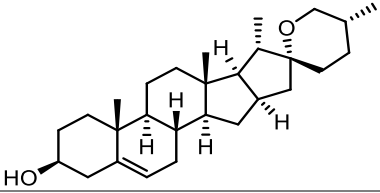


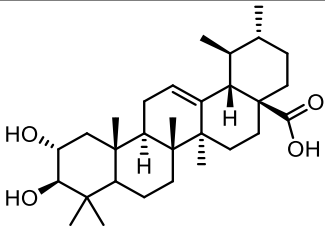
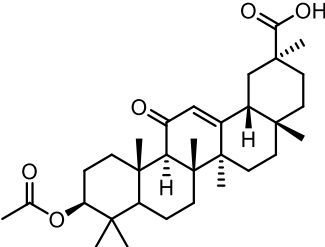
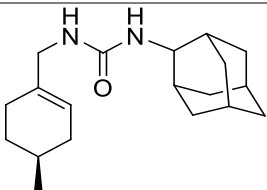
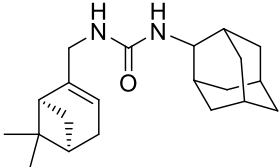
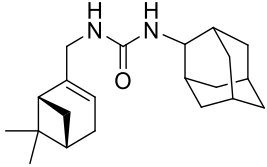
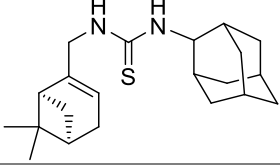
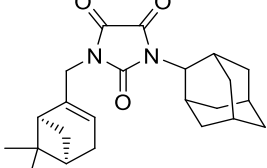
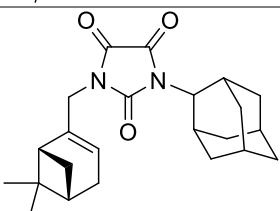
ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Результаты скрининга библиотеки соединений: структура, цитотоксичность (CC₅₀); ингибирующая активность (IC₅₀) в отношении псевдовиральных частиц SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1; соответствие правилу Липинского

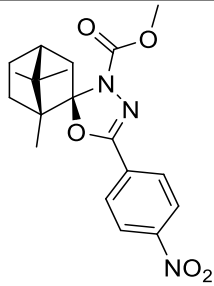
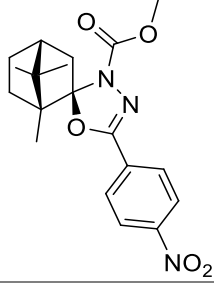
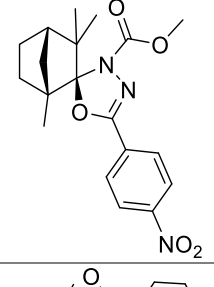
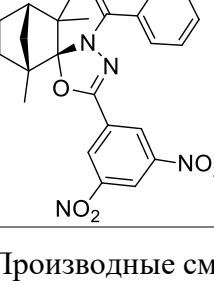
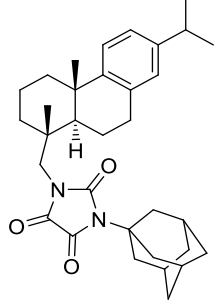
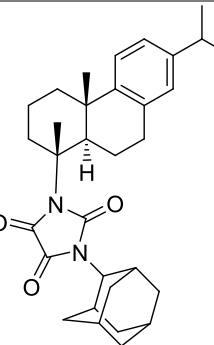
Соединение	Структура	CC ₅₀ ¹ , мкМ	IC ₅₀ ² , мкМ	SI	RO5
Имино и amino производные камфоры					
1		2950±250	>500	-	+
2		1260±321	>500	-	+
3		1260±145	>500	-	+
4		1080±214	>440	-	+
5		660±85	>200	-	+
Сложноэфирные производные борнеола					
6		982±102	188±31	-	+
7		1455±74	>500	-	+
8		1045±84	>500	-	+
9		346±53	>200	-	+
10		362±22	15±1	23	+
11		186±13	17±2	10	+
12		396±56	21±2	18	+

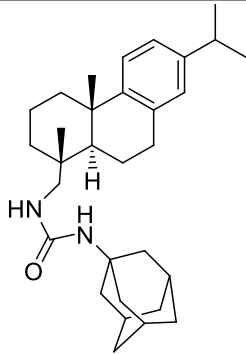
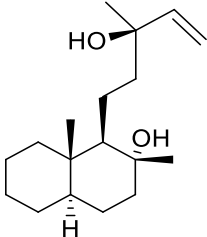
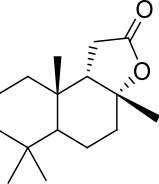
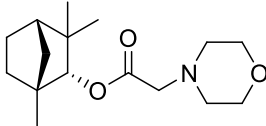
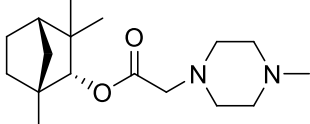
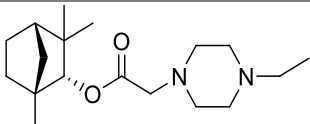
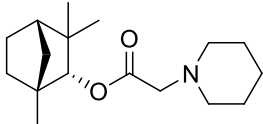
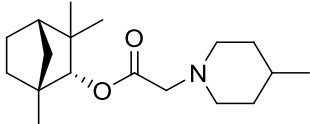
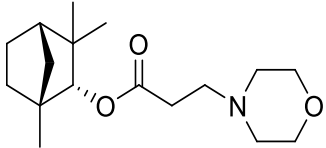
13		960±44	>200	-	+
14		540±87	>200	-	+
15		538±65	>200	-	+
16		350±23	>200	-	+
17		855±95	>200	-	+
18		292±36	17±1	17	+
19		1015±115	>200	-	+
20		935±77	>200	-	+
21		742±62	9±1	80	+
22		407±25	>200	-	+
23		350±32	>200	-	+
24		348±54	155	2	+
25		438±21	196	2	+
26		179±23	59±3	3	+
27		165±32	52±4	3	+

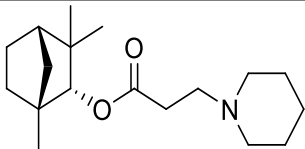
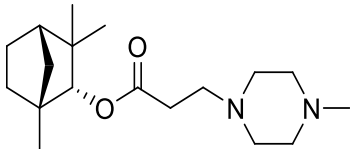
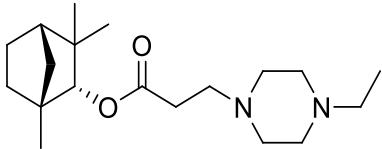
28		1080±136	190±36	5	+
29		490±59	>200	-	+
Амиды на основе изоборниламина					
30		417±42	41±4	10	+
31		1525±203	156±23	9	+
32		820±71	>200	-	+
33		2160±135	>200	-	+
34		1140±102	>200	-	+
35		1260±96	190±25	6	+
Гетероциклические производные 10-камфоросульфокислоты					
36		2450±211	>200	-	-
37		2450±254	>200	-	-
38		1260±130	>200	-	-
Соединения с борнанаовым и тиазолидин-4-оновым фрагментом					
39		300±22	65±12	4	-

40		320±19	36±9	8	-
41		1890±98	72±11	26	-
42		300±23	66±9	4	-
Стероидные соединения					
43		185±11	80±11	2	-
44		270±26	>100	2.7	-
45		250±31	>200	1	-
46		270±37	>200	1	-
47		4±1	NA	-	-
Пентациклические тритерпеноиды					

48		0.24±0.12	NA	-	-
49		185±41	80±9	2.3	-
Соединения с адамантановым и монотерпеновым фрагментом					
50		380±31	152±24	2.5	+
51		456±45	<18	-	+
52		395±60	<18	-	-
53		31±8	<18	-	-
54		245±25	34±3	7	-
55		>261	31±8	8.4	-
Спироциклические производные камфоры и фенхона					

56		884±80	101±24	8.5	-
57		350±26	24±3	13	-
58		670±75	NA	-	-
59		>1077	64±10	16	-
Производные смоляных кислот					
60		503±86	77±13	6.5	-
61		384±34	NA	-	-

62		>270	54±9	5	-
Склареол и его производное					
63		162±33	4±1	41	+
64		81±16	<4	21	+
Сложноэфирные производные (+)-фенхола					
65		291±42	14±3	21	+
66		646±7	5±1	129	+
67		909±64	6±2	151	+
68		229±11	14±4	17	+
69		293±10	10±1	29	+
70		318±7	8±1	47	+

71		351±41	2±1	175	+
72		454±65	<<4	113	+
73		357±24	<<4	89	+

¹Цитотоксичность была исследована в отношении клеточной культуры HEK293T-ACE2-TMPRSS2;

²Ингибирующая активность была исследована с использованием лентивирусных псевдовиральных частиц, содержащих поверхностный белок S SARS-CoV-2 (штамм Wuhan-Hu-1), и клеточной культуры HEK293T-ACE2-TMPRSS2;

³Соответствие правилу Липински оценивали по четырём критериям: молекулярная масса ≤ 500 Да, коэффициент распределения октанол/вода ($\log P$) ≤ 5 , число доноров водородных связей (HBD) ≤ 5 , число акцепторов водородных связей (HBA) ≤ 10 . Соединение считается соответствующим правилу (отмечено как «+»), если нарушает не более одного критерия.