

На правах рукописи



Орлов Алексей Александрович

**ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО ПРОСТРАНСТВА ИНГИБИТОРОВ
РЕПРОДУКЦИИ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА
*IN SILICO И IN VITRO***

02.00.16 — Медицинская химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Черноголовка — 2019

Диссертация выполнена на кафедре медицинской химии и тонкого органического синтеза Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» во время обучения в аспирантуре и в лаборатории противовирусных лекарственных средств Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» при работе в должности младшего научного сотрудника.

Научный руководитель:

Палюлин Владимир Александрович

*кандидат химических наук,
ведущий научный сотрудник химического факультета ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»*

Соруководитель:

Осолодкин Дмитрий Иванович

*кандидат химических наук,
заведующий лабораторией противовирусных лекарственных средств ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН»*

Официальные оппоненты:

Офицеров Евгений Николаевич

*доктор химических наук, профессор,
декан факультета химико-фармацевтических технологий и биомедицинских препаратов ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»*

Иванов Александр Владимирович

*кандидат химических наук,
заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций ФГБНУ «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук»*

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

Защита состоится 24 сентября 2019 года в 14 час. 00 мин. на заседании Диссертационного совета Д 002.102.02 на базе Федерального государственного учреждения науки Института физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН) по адресу: 142432, Московская область, г. Черноголовка, Северный проезд, д. 1, зал Ученого совета. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИФАВ РАН по адресу: http://www.ipac.ac.ru/diss_sovet/

Автореферат разослан « _____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 002.102.02
кандидат химических наук



Афанасьева С. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Каждый год увеличивается число видов вирусов, ассоциируемых с заболеваниями человека. По состоянию на 2018 год только для 9 инфекционных заболеваний, вызываемых вирусами иммунодефицита человека, вирусом гепатита С, вирусами герпеса первого и второго типов, вирусом гриппа А и рядом других, допущены к применению лекарства на основе низкомолекулярных соединений, обладающих специфическим противовирусным действием. Одним из родов вирусов, в который входит множество патогенных видов вирусов, для которых отсутствуют специфические противовирусные препараты, является род *Flavivirus*. Поэтому создание новых ингибиторов репродукции флавивирусов является важной задачей современной медицинской химии.

Род *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* включает 53 вида вирусов, многие из которых способны вызывать заболевания человека различной степени тяжести: от неосложнённых лихорадочных состояний до тяжёлых поражений центральной нервной системы. Для России и Европы среди природно-очаговых инфекций особенно актуальной проблемой является клещевой энцефалит: ежегодно им инфицируется более 10 тыс. человек, а на эндемичных территориях проживает свыше 60 млн. человек. Несмотря на наличие эффективной вакцины, охват населения иммунизацией считается недостаточным, в связи с чем разработка других средств профилактики и лечения клещевого энцефалита является актуальной задачей.

Репликативные циклы флавивирусов схожи между собой, а белки, выполняющие ключевые функции, такие как вирусные протеазы, метилтрансферазы, полимеразы, гомологичны, что позволяет применять аналогичные подходы при дизайне соединений, действующих на разные флавивирусы, и перепрофилировать активные соединения. Информация о биологической активности низкомолекулярных соединений, в том числе противовирусной, накапливается в больших базах данных, таких как ChEMBL, PubChem BioAssay, DrugBank и др. Анализ информации, содержащейся в таких базах данных, играет важную роль в установлении соотношений “структура-активность”, анализе ландшафта противовирусной активности и прогнозировании профиля противовирусной активности и механизма действия соединений *in silico*.

Степень разработанности избранной темы. Детальное исследование химического пространства противофлавивирусных соединений с использованием информации из общедоступных баз данных о биологической активности (ChEMBL, PubChem BioAssay и другие) ранее не проводилось. Данные о противофлавивирусной активности и структурах низкомолекулярных органических соединений, активность которых определялась по отношению к флавивирусам, исследовались только в контексте общего химического пространства противовирусных соединений (в частности, с использованием метода генеративного топографического картирования), либо рассматривались в рамках обзорных работ.

На момент начала работы химическое пространство ингибиторов репродукции вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) в общедоступных базах данных было представлено несколькими классами соединений, механизм действия которых предположительно связан с ингибированием проникновения вируса в клетку. Помимо этих

соединений в научной литературе описано ещё несколько классов ингибиторов репродукции ВКЭ, механизм действия которых связан с ингибированием проникновения, ингибированием РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса и взаимодействием с мишенями хозяина. Однако химическое разнообразие соединений с активностью против ВКЭ существенно меньше, чем для других активно изучаемых флавириусов, таких как вирус денге, вирус лихорадки Западного Нила, вирус жёлтой лихорадки.

Целью настоящей работы является анализ химического пространства противофлавивирусных соединений на основе информации, представленной в базе данных ChEMBL, виртуальный скрининг коммерчески доступных низкомолекулярных органических соединений для поиска новых классов ингибиторов репродукции ВКЭ и расширение химического пространства противофлавивирусных соединений путём определения активности низкомолекулярных органических соединений по отношению к вирусу клещевого энцефалита *in vitro*. Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Проанализировать информацию о противофлавивирусной активности, представленную в базе данных ChEMBL;
2. Провести виртуальный скрининг коммерчески доступных низкомолекулярных органических соединений с использованием информации о противофлавивирусной активности из ChEMBL и валидировать результаты прогноза в экспериментах *in vitro*;
3. Определить *in vitro* противовирусную активность по отношению к вирусу клещевого энцефалита и цитотоксичность низкомолекулярных органических соединений.

Научная новизна. Впервые определены структурные особенности противофлавивирусных соединений с использованием информации из общедоступной базы данных ChEMBL и методов анализа химического пространства, в том числе методов анализа главных компонент, самоорганизующихся карт Кохонена, сетей химического пространства и анализа скаффолдов. Впервые показана возможность использования поиска структурных аналогов соединений с известной противофлавивирусной активностью с применением метода генеративного топографического картирования для дизайна новых классов ингибиторов репродукции ВКЭ.

Впервые определена ингибиторная активность N^6 -замещённых производных аденозина, производных 5-(перилен-3-илэтинил)уридина и ряда других аналогов нуклеозидов, а также более 10 классов низкомолекулярных органических соединений по отношению к репродукции ВКЭ. Впервые выявлены структурные фрагменты, обуславливающие ингибиторную активность соединений этих классов. Для активных соединений впервые определена цитотоксичность по отношению к культуре клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) и идентифицированы структурные фрагменты, влияющие на цитотоксичность.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в определении структурных особенностей противофлавивирусных соединений на основе информации из базы данных ChEMBL и в разра-

ботке подходов к прогнозированию механизма действия соединений и виртуальному скринингу коммерчески доступных низкомолекулярных органических соединений для поиска новых ингибиторов репродукции ВКЭ.

Практическая значимость работы заключается в создании аннотированной библиотеки низкомолекулярных органических соединений, содержащей данные об их противофлавивирусной активности, которая может быть использована в работах по определению механизма действия соединений, исследованию соотношений “структура-активность” и для проведения виртуального скрининга библиотек коммерчески доступных соединений. Практическая значимость работы также заключается в получении данных о структурных особенностях соединений, для которых определена ингибиторная активность против ВКЭ и цитотоксичность на культуре клеток СПЭВ. Эти данные могут быть использованы в дальнейшем при разработке специфических противовирусных лекарственных средств, в том числе лекарственных средств против клещевого энцефалита и других заболеваний, вызываемых флавивирусами.

Методология и методы исследования. Химическое пространство противофлавивирусных соединений было проанализировано с использованием информации, извлечённой из общедоступной базы данных ChEMBL. На основе этой информации была создана библиотека соединений (FlaviChEMBL), для которых по данным ChEMBL определялась противофлавивирусная активность. Описания экспериментов FlaviChEMBL были дополнительно проаннотированы к молекулярным мишеням. Для определения структурного разнообразия и структурных особенностей соединений FlaviChEMBL были использованы широкоприменяемые методы анализа химического пространства: анализ скаффолдов, метод самоорганизующихся карт Кохонена, метод анализа главных компонент, сетевые подходы. Информация из FlaviChEMBL была использована для виртуального скрининга библиотеки коммерчески низкомолекулярных органических соединений с применением метода генеративного топографического картирования. Противофлавивирусная активность и цитотоксичность соединений, выбранных в результате виртуального скрининга, были определены в экспериментах *in vitro*.

Эксперименты *in vitro* проводили с использованием штамма ВКЭ Абсеттаров (GenBank № KU885457) из коллекции лаборатории арбовирусологии ФГБНУ «ФНЦИ-РИП им. М.П. Чумакова РАН». Использовали растворы соединений в диметилсульфоксиде. Определение активности соединений против ВКЭ проводили методом ингибирования образования бляшек в культуре клеток СПЭВ. Полуэффективные концентрации EC_{50} рассчитывали по методу Рида и Менча. Цитотоксичность соединений определяли с использованием световой микроскопии визуально по повреждению монослоя СПЭВ или фотокolorометрически с использованием раствора витального красителя нейтрального красного. Полутоксические концентрации CC_{50} рассчитывали по методу Кербера или методу Рида и Менча. Все опыты проводили минимум в трёх повторностях.

Положения, выносимые на защиту. С использованием информации, извлекаемой из базы данных ChEMBL, проанализировано химическое пространство противофлавивирусных соединений, определены их структурные особенности, а также построены карты химического пространства противофлавивирусных соединений.

Показано, что виртуальный скрининг коммерческих низкомолекулярных органических соединений с использованием метода генеративного топографического картирования и данных о противофлавивирусной активности соединений позволяет найти новые классы ингибиторов репродукции вируса клещевого энцефалита.

Выявлены соединения, проявляющие активность по отношению к ингибированию репродукции вируса клещевого энцефалита, в серии N^6 -замещённых производных аденозина. Предложен возможный механизм действия соединений из серии N^6 -замещённых производных аденозина на основе анализа результатов поиска по подобию и молекулярного докинга.

Показано, что жёсткие амфифильные ингибиторы слияния из серии производных 5-(перилен-3-илэтинил)уридина ингибируют репродукцию вируса клещевого энцефалита. Основным структурным фрагментом, важным для эффективного ингибирования репродукции вируса клещевого энцефалита, является перилен.

В результате скрининга *in vitro* выявлены 6 классов низкомолекулярных селен- и сероорганических ингибиторов репродукции вируса клещевого энцефалита.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность положений, выносимых на защиту, и выводов диссертации подтверждается выполнением экспериментов в контролируемых условиях и использованием достаточного числа повторностей. Расчёты были проведены с использованием стандартных алгоритмов и широко используемого программного обеспечения.

Основные результаты работы были представлены на международных и российских конференциях. В частности, материалы работы были представлены на 256-м Конгрессе Американского химического общества (США, Бостон, 19-23 августа 2018), XXV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 9-12 апреля 2018), 255-м Конгрессе Американского химического общества (США, Новый Орлеан, 19-23 марта 2018), 3-й Российской конференции по медицинской химии (Казань, 28 сентября – 3 октября 2017), 3-й Летней школе по хемоинформатике (Казань, 5-7 июля 2017), 12-й Германской конференции по хемоинформатике (Германия, Фульда, 6-8 ноября 2016), на 3-м противовирусном конгрессе (Нидерланды, Амстердам, 12-14 октября 2014).

Соответствие паспорту специальности. Диссертация соответствует паспорту специальности 02.00.16 – Медицинская химия – по пунктам 1 (поиск, структурный дизайн и синтез соединений-лидеров - потенциальных физиологически активных (лекарственных) веществ, на основе: а) знания структурных параметров биомишени или особенностей патогенеза; б) анализа и модификации структур известных активных соединений; в) синтеза и биологического тестирования широкого разнообразия химических соединений), 2 (использование фундаментальных методов математической химии (компьютерного молекулярного моделирования и QSAR) с целью прогнозирования возможности взаимодействия определенных химических соединений с предполагаемой биологической мишенью, а также для выявления взаимосвязи между химической структурой и физиологической активно-

стью) и 6 (биологическое и физиологическое (*in vitro* и *in vivo*) тестирование сконструированных и синтезированных соединений на предмет изучения особенностей их взаимодействия с молекулярными мишенями организма).

Публикации. Всего по материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ, из них 8 статей в рецензируемых научных журналах, 1 патент и 9 тезисов докладов на российских и международных конференциях. Исследования выполнялись при поддержке проектов РФФИ (14-03-31566, 15-04-08365, 16-03-01057, 16-34-01298) и РФФИ (16-15-10307, 15-15-00053) и государственного задания ФГБНУ “ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН”.

Личный вклад автора. Личный вклад автора состоял в подборе и анализе литературных данных, экспериментальном определении противовирусной активности и цитотоксичности *in vitro*, проведении исследований методами вычислительной химии, в частности, методами анализа химического пространства, моделирования по гомологии, молекулярного докинга, в интерпретации, обобщении и обсуждении полученных результатов, формулировании выводов, в подготовке материалов к публикациям и представлении их на конференциях. Имена всех соавторов указаны в опубликованных работах. Участие соавторов и организаций, в которых они работают, отражено в тексте диссертации.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Материал диссертации изложен на 146 страницах машинописного текста, содержит 38 рисунков, 19 таблиц и 337 ссылок.

Благодарности. Автор благодарит к.б.н. Козловскую Л.И. и д.б.н. Карганову Г.Г. (ФГБНУ “ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН”) за ценные консультации и помощь в проведении исследований по определению противовирусной активности и цитотоксичности *in vitro*. Автор выражает признательность д.х.н. Коршуну В.А. (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук), д.х.н. Доценко В.В. (ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»), д.х.н. Михайлову С.Н. (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук) за предоставленные для экспериментальных исследований образцы соединений. Автор выражает благодарность Dr. Fanny Vonachera, Dr. Dragos Horvath, Dr. Alexandre Varnek (лаборатория хемиоинформатики, Страсбургский университет) за помощь и ценные консультации по использованию метода генеративного топографического картирования. Автор также выражает благодарность к.х.н. Жеребкеру А.Я. (Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Сколковский институт науки и технологий») и проф., д.х.н. Перминовой И.В. (ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова») за ценные консультации по анализу смесей природного происхождения. Автор благодарит посольство Франции в Москве за предоставление стипендии им. М.В. Остроградского. Автор благодарит за поддержку свою семью и друзей.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цель и задачи, описана научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы. В **главе 1** приводится обзор научной литературы по разработке противофлавивирусных соединений и методам анализа химического пространства. В **главе 2** приводятся результаты работы и их обсуждение. В **главе 3** приводится описание вычислительных методов, использованных в работе, а также методики определения противовирусной активности и цитотоксичности *in vitro*.

Результаты и обсуждение

1. Анализ химического пространства противофлавивирусных соединений

Анализ химического пространства противофлавивирусных соединений проводился с использованием информации из базы данных ViralChEMBL (часть базы данных ChEMBL), содержащей стандартизованные данные о структуре и противовирусной активности, аннотированные по современной таксономии вирусов. В том числе использовалась часть ViralChEMBL – FlaviChEMBL, содержащая данные о противовирусной активности по отношению к представителям рода *Flavivirus*. Всего для 10 видов флавивирусов были доступны 655 записей экспериментов, 6204 записи активностей и 3480 структур. В FlaviChEMBL 96% записей об активности не имели аннотации к белковым мишеням. В настоящей работе описания экспериментов были проанализированы вручную и каждому описанию в случае, когда это было возможно, на основе анализа литературных данных была сопоставлена белковая мишень. Это позволило увеличить количество экспериментов с известной молекулярной мишенью до 24%.

Данные FlaviChEMBL об экспериментах и структурах распределены неравномерно по видам вирусов (Рисунок 1). По данным FlaviChEMBL, наиболее изученным вирусом является вирус денге (ДЕНВ).

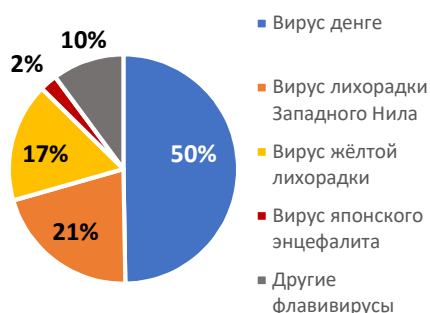


Рисунок 1. Распределение записей о структурах по видам вирусов для FlaviChEMBL.

Распределение физико-химических дескрипторов соединений FlaviChEMBL соответствует их распределению в ViralChEMBL и ChEMBL (Рисунок 2). Различие наблюдается в распределении молекулярного веса (M_w) и количества вращаемых связей (R_b): в FlaviChEMBL доля соединений с меньшими значениями M_w и R_b больше, чем в ViralChEMBL и ChEMBL, что обусловлено большим количеством небольших гетероциклических соединений, не содержащих гибких фрагментов, исследованных в качестве потенциальных ингибиторов репродукции флавивирусов.

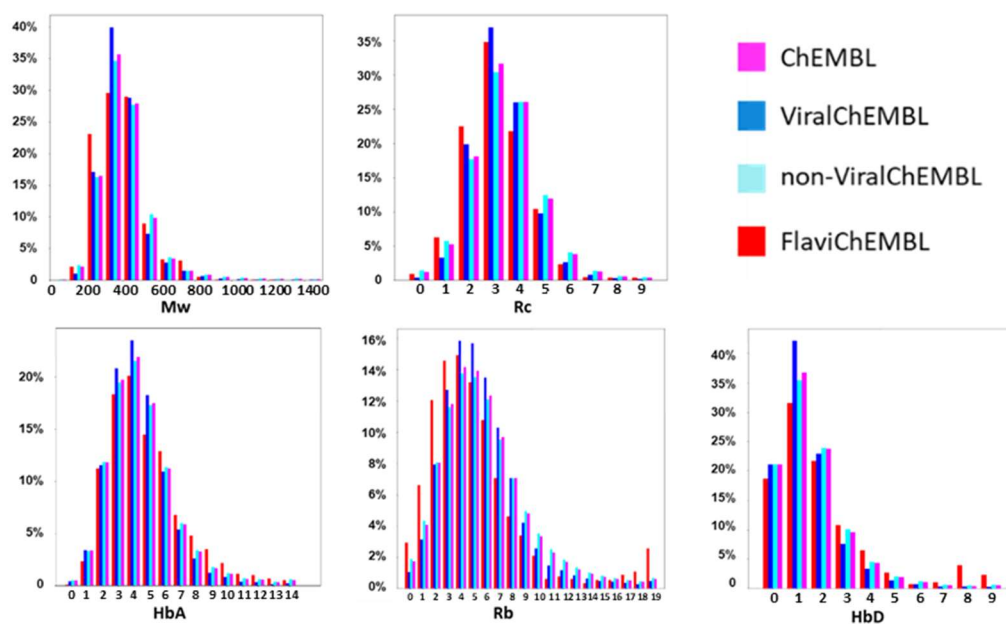
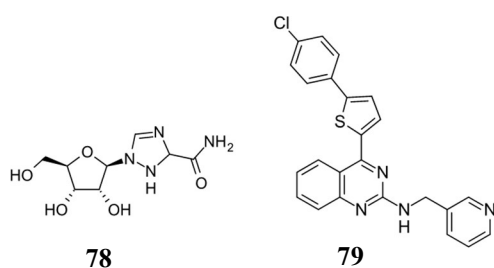


Рисунок 2. Распределения молекулярного веса (Mw), числа циклических фрагментов (Rc), количества акцепторов (HbA) и доноров (HbD) водородной связи, числа вращаемых связей (Rb).

Химическое разнообразие FlaviChEMBL было проанализировано на основе распределения скаффолдов Бемис-Мурко. Распределение частот встречаемости скаффолдов в FlaviChEMBL отличается от распределения в ViralChEMBL (Таблица 1). Наиболее распространённый центральный фрагмент – бензольное кольцо. В отличие от других баз данных, в FlaviChEMBL одними из наиболее изученных скаффолдов являются 2-фенилбензилимидазол, 2-фенилтиазол, роданин и бифенил.

Химическое подобие соединений FlaviChEMBL низкое – плотность молекулярной сети, построенной при разных значениях индекса Танимото, невысокая (Рисунок 3). Химическое пространство FlaviChEMBL представляет собой множество серий соединений с высоким подобием внутри серий и низким между ними (Рисунок 3).





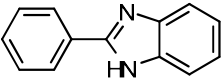
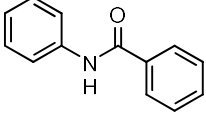
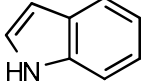
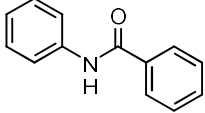
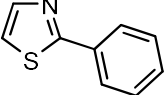
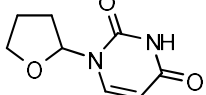

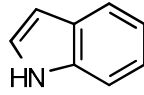
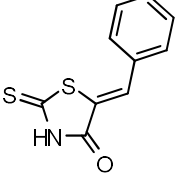
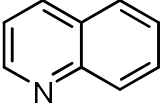
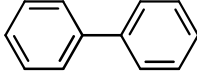

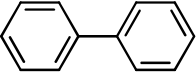
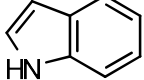
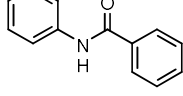
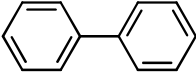
Изученность противовирусной активности соединений FlaviChEMBL небольшая. Всего в FlaviChEMBL присутствовало 472 соединения, протестированных против минимум двух флавивирусов, и 102 соединения, активных по отношению к ингибированию репродукции или ферментов минимум двух флавивирусов. При этом большая часть таких соединений химически подобна (Рисунок 3).



Среди этих соединений представлены производные нуклеозидов, природные соединения, пептиды и пептидомиметики и несколько других классов органических соединений. Рибавирин **78**¹ и производное 2-аминохиназолина **79** были протестированы (и активны) против наибольшего числа флавивирусов по данным FlaviChEMBL.

¹ Нумерация соединений приведена в соответствии с основным текстом диссертационной работы.

Таблица 1. Наиболее частые скаффолды Бемис-Мурко в FlaviChEMBL, ViralChEMBL, ChEMBL, Non-ViralChEMBL².

FlaviChEMBL		ViralChEMBL		Non-ViralChEMBL		ChEMBL	
Скаффолд	Частота, %	Скаффолд	Частота, %	Скаффолд	Частота, %	Скаффолд	Частота, %
	4.109		2.824		1.901		3.057
	1.897		0.227		0.304		0.235
	1.869		0.219		0.227		0.235
	0.833		0.212		0.158		0.227
	0.690		0.201		0.154		0.212

² Соединения, данные о противовирусной активности которых отсутствуют в ChEMBL.

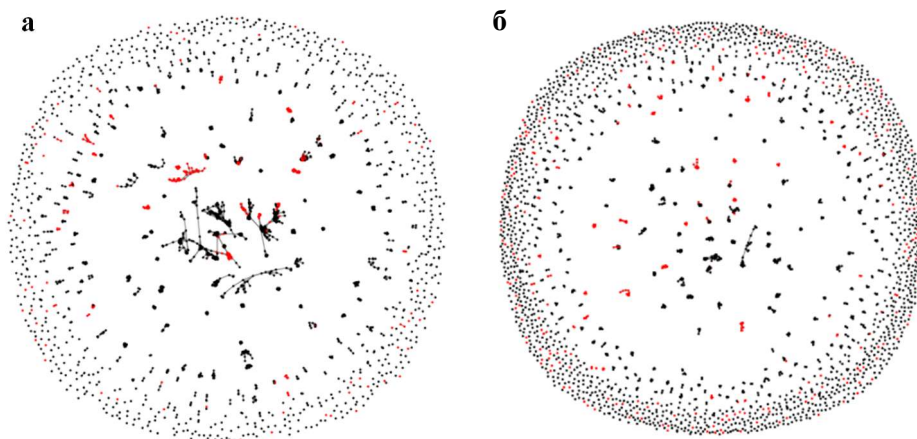


Рисунок 3. Визуализация химического пространства FlaviChEMBL методом молекулярных сетей с использованием алгоритма Фрухтермана-Рейнгольда. Индекс подобия Танимото: а) 0.7, б) 0.9. Соединения, испытанные против одного вида флавивирусов – чёрный, против минимум двух – красный.

Анализ химического пространства FlaviChEMBL проводился с использованием метода анализа главных компонент (PCA) и самоорганизующихся карт Кохонена (SOM). Для изучения положения соединений FlaviChEMBL относительно других противовирусных соединений были построены карты PCA и SOM для ViralChEMBL. Распределение соединений FlaviChEMBL на картах PCA и SOM ViralChEMBL довольно равномерно, и выделить специфические для флавивирусов области практически невозможно (Рисунок 4). На картах SOM и PCA есть ряд областей с соединениями, противофлавивирусная активность которых не исследовалась, но которые располагаются рядом с областями активных по отношению к другим вирусам соединений, что позволяет предположить для них возможность репрофилирования.

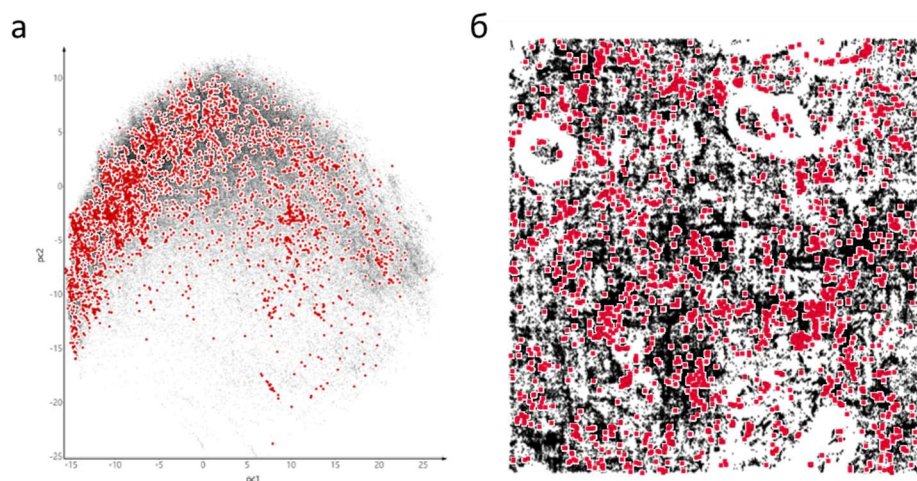


Рисунок 4. Визуализация химического пространства FlaviChEMBL и ViralChEMBL. а) Метод анализа главных компонент. б) Самоорганизующаяся карта Кохонена. Соединения FlaviChEMBL показаны красным, соединения ViralChEMBL – чёрным.

Для исследования сходства химического пространства FlaviChEMBL и ViralChEMBL было оценено химическое подобие структур, содержащихся в этих

базах данных. Для поиска химически подобных соединений был использован метод k-ближайших соседей, в котором в качестве метрики подобия использовался индекс Танимото (граничное значение – 0.8). Всего было найдено 22203 пары соединений FlaviChEMBL-ViralChEMBL (2421 соединение FlaviChEMBL и 7122 соединения из ViralChEMBL; одно соединение может входить сразу в несколько пар). Наиболее распространёнными классами соединений были производные нуклеозидов и пептидомиметики. Больше всего пар было найдено для вируса гепатита С (ВГС), который относится к тому же семейству, что и флавивирусы, - *Flaviviridae*. Это отражает подобие химических пространств соединений, испытанных по отношению к ингибированию репродукции флавивирусов и ВГС. При разработке противофлавивиральных соединений использовались подходы, аналогичные подходам к дизайну соединений против ВГС, многие соединения были перепрофилированы.

Подобие биологических мишеней может быть оценено с использованием информации о подобии соединений, проявляющих активность по отношению к этим мишеням. Такой подход может применяться даже в том случае, когда точная молекулярная мишень действия соединений не установлена. Например, если структурно подобные соединения проявляют активность против родственных вирусов по данным экспериментов на клеточных линиях, можно предположить, что механизм их действия связан с ингибированием одной и той же молекулярной мишени. Для того, чтобы проанализировать подобие экспериментов FlaviChEMBL и ViralChEMBL, все пары структурно подобных соединений были сгруппированы по экспериментам, в которых они были исследованы. Большую часть экспериментов с наибольшим подобием составили те, в которых определялась активность соединений, изначально создававшихся как ингибиторы широкого спектра действия, а также аналогов нуклеозидов, которые обладают высоким химическим подобием. Полученные в ходе такого поиска данные могут быть использованы для прогнозирования механизма действия соединений. Так, например, производные ликорина эффективно ингибируют репродукцию вируса жёлтой лихорадки (ВЖЛ) и вируса гепатита С (ВГС). Наиболее вероятным механизмом ингибирования репродукции ВГС этими соединениями является подавление экспрессии белка теплового шока HSP A8. Этот белок также играет важную роль в проникновении и репликации ДЕНВ, что подтверждает возможность реализации противофлавивиральной активности по этому механизму.

Анализ химического пространства FlaviChEMBL позволил установить основные характеристики и структурные особенности противофлавивиральных соединений. Химическое пространство FlaviChEMBL в основном представлено несколькими классами соединений, а профили противовирусной активности, содержащие данные для более чем одного вида вирусов, доступны лишь для малой части соединений. Дальнейшее расширение химического пространства противофлавивиральных соединений и установление спектра активности изученных соединений путём скрининга *in vitro* было необходимо для более глубокого анализа связи между структурой соединения и его противовирусной активностью.

2. Поиск ингибиторов репродукции вируса клещевого энцефалита *in vitro* и *in silico*

2.1. Нуклеозидные ингибиторы репродукции вируса клещевого энцефалита

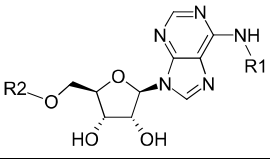
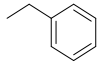
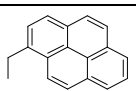
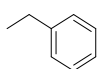
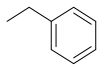
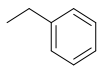

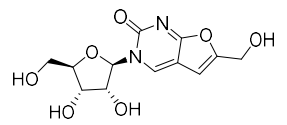
Противовирусная активность аналогов нуклеозидов по отношению к флавивирусам определялась реже (см. Таблица 1), чем в среднем для других родов вирусов согласно данным FlaviChEMBL, что актуализирует поиск нуклеозидных ингибиторов репродукции флавивирусов. Среди аналогов нуклеозидов, представленных в FlaviChEMBL, были производные, содержащие объёмные заместители в 5'-*O*-положении и ингибирующие репродукцию ВЖЛ, вируса лихорадки Западного Нила (ВЛЗН) и ДЕНВ. В настоящей работе была исследована способность структурно похожих соединений ингибировать репродукцию вируса клещевого энцефалита (ВКЭ, штамм Абсеттаров, GenBank № KU885457). Поскольку производные нуклеозидов часто обладают широким спектром активности, в настоящей работе также были исследованы нуклеозиды, содержащие заместители в N^6 -положении, для которых ранее была обнаружена активность по отношению к энтеровирусам.

Эффективность ингибирования репродукции ВКЭ была определена *in vitro* для N^6 -замещённых аденозинов, 3'-*C*-метилнуклеозидов, N^2 -замещённых гуанозинов, N^4 -замещённых цитидинов и ряда других аналогов нуклеозидов (Таблица 2).

Из 41 протестированного соединения 6 подавляли репродукцию ВКЭ *in vitro*. Все 3'-*C*-метилнуклеозиды, N^2 -замещённые гуанозины, N^4 -замещённые цитидины и большая часть N^6 -бензиладенозинов не проявили активность. Таким образом, N^6 -замещение, а также 3'-*C*-метилирование рибозы обычно не приводят к появлению активности. Тем не менее, с увеличением размера заместителя в положении N^6 от метила до 2-пиренилметила активность увеличивалась: N^6 -метиладенозин **100** и бензиладенозин **88** не были активными, N^6 -антранилметиладенозин **94** проявлял умеренную активность, N^6 -(2-пиренилметил)аденозин **95** проявлял наибольшую активность среди соединений этой серии, хотя в то же время проявлял высокую цитотоксичность после 7 дней инкубации с клетками. Удаление рибозы из **88** также не приводило к появлению активности.

Подструктурный поиск и поиск по подобию соединений, содержащих объёмные заместители в 5'-*O*-положении, позволил найти их структурные аналоги в FlaviChEMBL, для которых было показано, что введение объёмных заместителей по 5'-гидроксильной группе приводит к появлению активности в отношении репродукции флавивирусов, переносимых комарами. Модификация N^6 -бензиладенозина по 5'-гидроксильной группе силильными заместителями также привела к ингибированию репродукции ВКЭ (соединения **97**, **98**). Предполагается, что такие производные связываются с метилтрансферазным доменом (МТ) неструктурного белка NS5 в сайте связывания *S*-аденозилгомоцистеина и таким образом ингибируют функционирование белка.

Таблица 2. Ингибирование репродукции ВКЭ и цитотоксичность *in vitro* для некоторых аналогов нуклеозидов.

№⁶-замещённые аденозины					
					
№	Заместитель		CC ₅₀ (24ч), мкМ	CC ₅₀ (7д), мкМ	EC ₅₀ ³ , мкМ
	R1	R2			
100	CH ₃	H	н.о. ⁴	н.о.	>50
88		H	>50	>50	>50
92		H	н.о.	н.о.	>50
93		H	н.о.	н.о.	>50
94		H	>50	>50	15±2
95		H	>50	9	6±1
96			>50	9	2±1
97			>50	>50	20±10
98			>50	>50	5±4
Производные уридина					
124			>50	>50	9.4±0.4
125			н.о.	н.о.	>50
128			н.о.	н.о.	>50

³ Если не указано иное, то определение значений EC₅₀ проводилось при предварительной инкубации вируса и раствора соединения перед добавлением к монослою клеток СПЭВ.

⁴ н.о. – значение не определялось.

Для оценки возможности связывания соединений с МТ ВКЭ был проведён молекулярный докинг соединений **97**, **98** в сайт связывания *S*-аденозилгомоцистеина МТ домена модели белка NS5 ВКЭ, построенной по гомологии (Рисунок 5 а, б, в). Соединения располагаются в сайте схожим с лигандом образом (Рисунок 5 б, в) и, как следствие, может реализовываться конкурентное ингибирование метилтрансферазы флавивирусов.

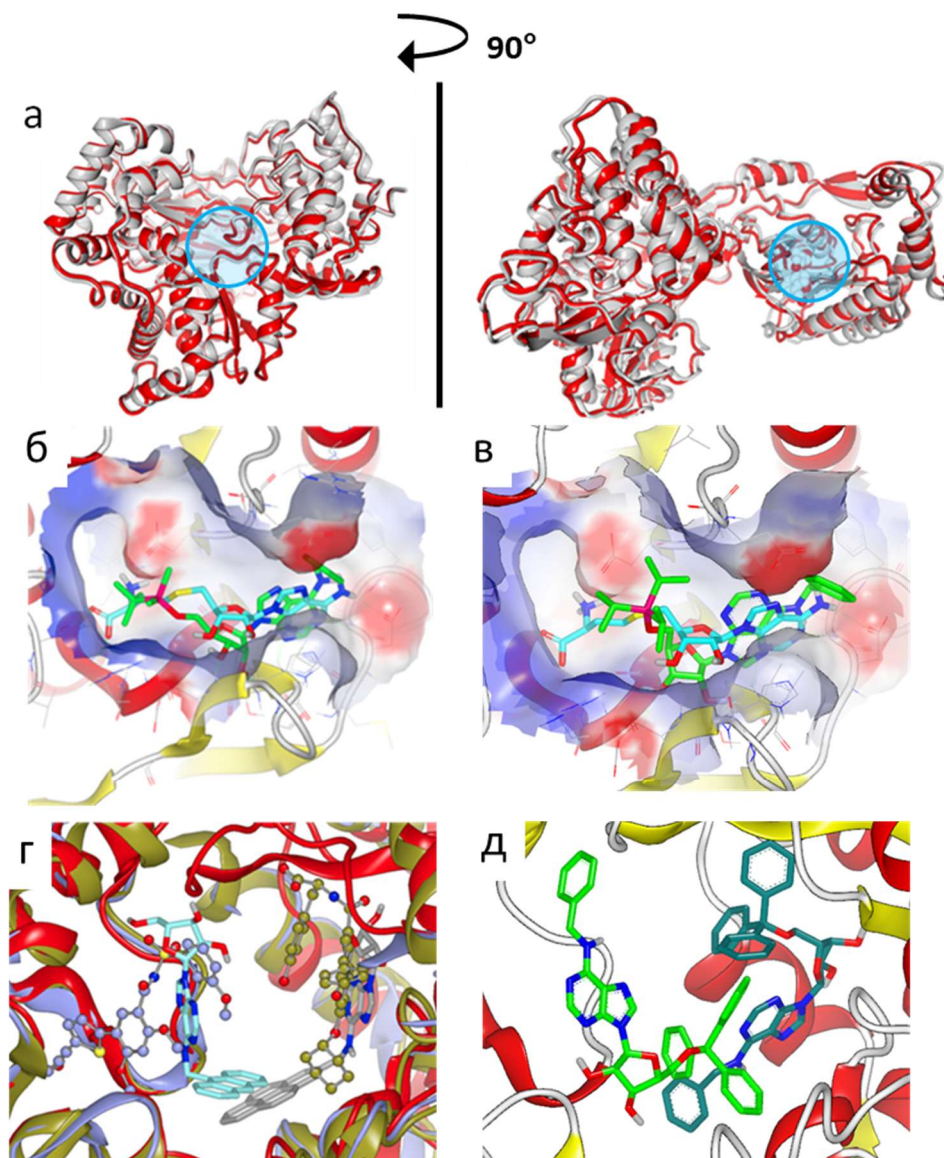
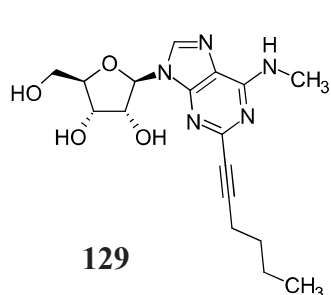


Рисунок 5. а) Выравнивание модели структуры белка NS5 ВКЭ, построенной по гомологии (красный), и шаблона NS5 ВЯЭ (серый). RMSD по α -атомам составляет 1.6 Å. Расположение сайтов связывания в модели белка NS5 показано голубым цветом. б) Докинг **97** в метилтрансферазный домен модели NS5 ВКЭ. Соединение **97** – голубой, SAM – зелёный. в) Докинг **98** в метилтрансферазный домен модели NS5 ВКЭ. Соединение **98** – голубой, SAM – зелёный. г) Докинг **94**, **95** в полимеразный домен белка NS5 ВКЭ. Показано выравнивание модели NS5 ВКЭ со структурами RdRp ДЕНВ 3 с ингибиторами (PDB ID 5IQ6 (коричневый), 5K5M (фиолетовый)). д) Докинг **96** в полимеразный домен NS5 ВКЭ (разные расположения **96** показаны светло- и тёмно-зелёным).

Действие соединений, содержащих тритильные заместители в 2'-*O*-, 3'-*O*- и 5'-*O*-положениях, может реализовываться через ингибирование функционирования полимеразного домена белка NS5 (RdRp). Для оценки возможности связывания соединений **94-96**, которые также предположительно способны взаимодействовать с NS5, был проведён молекулярный докинг в RdRp ВКЭ. Сайт связывания был выбран на основе анализа структур RdRp ДЕНВ в комплексе с нуклеозидными ингибиторами (идентификаторы PDB ID: 5IQ6, 5K5M). Объём большинства известных аллостерических сайтов на поверхности RdRp ДЕНВ не очень большой, в то время как сайты, расположенные недалеко от области связывания РНК и НТФ, больше и могут вместить аналоги нуклеозидов, содержащие объёмные заместители. Ориентации соединений **94-96** в выбранном сайте связывания перекрываются с известными способами связывания ингибиторов RdRp ДЕНВ (Рисунок 5 г, д). Значительный объём сайта связывания также согласуется с отсутствием активности меньших нуклеозидов: только пирен и антрацен достаточно велики, чтобы занять значительную часть полости и предотвратить связывание РНК (Рисунок 5г, д). Таким образом, противовирусная активность соединений, содержащих объёмные заместители в положении 5'-*O*, может быть обусловлена как взаимодействием с метилтрансферазным, так и взаимодействием с полимеразным доменами NS5 ВКЭ.

В ряду замещённых уридинов наличие тройной связи оказалось определяющим для проявления противовирусной активности (**124**). Несмотря на наличие гибкой гидрофобной части, связанной с азотистым основанием, соединение **128** не проявляло активности. Механизм действия **124**, по-видимому, связан с ингибированием проникновения вируса в клетку, поскольку наличие гибкой гидрофобной части обуславливает возможность связывания с липидными мембранами вируса и клетки. Поиск структурных аналогов соединения в ViralChEMBL позволил найти соединение **129**, которое ингибировало проникновение вируса Ласса



в клетку при самой высокой использованной концентрации. Необходимость наличия жёсткого линкера между нуклеозидной частью молекулы и гидрофобным фрагментом согласуется с данными для другого класса ингибиторов репродукции оболочечных вирусов - жёстких амфифильных ингибиторов слияния (*англ.* rigid amphipatic fusion inhibitor, RAFI).


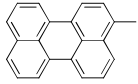
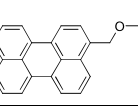
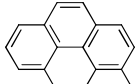
2.2. Жёсткие амфифильные ингибиторы слияния

RAFI представляют собой специфический класс производных нуклеозидов, содержащих объёмные ароматические заместители, связанные с нуклеозидным остовом (Таблица 3). Первоначально RAFI были предложены как флуоресцентные аналоги нуклеозидов для мечения РНК и ДНК, а затем было установлено,

что они являются эффективными ингибиторами репродукции оболочечных вирусов, в том числе вируса гриппа А, вируса гепатита С, вируса Синдбис и др.

Ранее были предложены два механизма действия RAFI. Согласно одному из них, RAFI взаимодействуют с мембранами вирионов и клеток и механически препятствуют слиянию мембран посредством ингибирования возникновения отрицательной кривизны мембраны вируса, необходимой в процессе слияния. Альтернативный механизм подразумевает фотосенсибилизацию липидных мембран вируса и клетки. Предполагается, что RAFI способствуют генерации синглетного кислорода 1O_2 , который окисляет двойные связи в ненасыщенных фосфолипидах мембран, что приводит к изменению физико-химических свойств мембран, в частности, текучести, и препятствует их изгибанию, происходящему при слиянии мембран вируса и клетки. Таким образом, нарушается репликативный цикл вируса, который, в отличие от метаболически активных клеток, не имеет механизмов репарации липидных мембран. В рамках настоящей работы первоначально была изучена противовирусная активность четырёх известных RAFI (соединения **130-133**, Таблица 3). Эти соединения ингибировали репродукцию ВКЭ в экспериментах *in vitro* при одновременном добавлении вируса и соединения к клеткам (EC_{50_sim}). Соединения с гибким линкером (**132**) и с пиреновым заместителем (**133**) были менее эффективны, чем соединения, содержащие периленовый заместитель в положении 3' уридина (**130** и **131**).

Таблица 3. Ингибирование репродукции ВКЭ и цитотоксичность нескольких RAFI.

№	Заместитель		CC ₅₀ (24ч) мкМ	CC ₅₀ (7д) мкМ	EC ₅₀ , мкМ	EC _{50_sim} , мкМ	EC _{50_cel} , мкМ
	R ¹	R ²					
130		ОН	>50	4.4	0.04±0.03	0.018±0.010	2.7±0.8
131		Н	>50	>50	0.04±0.03	0.024±0.013	1.56±0.22
132		Н	>50	>50	н.о.	0.5±0.4	>50
133		Н	>50	>50	0.6±0.4	0.98±0.03	42±8

Наличие жёсткого линкера между периленом и фрагментом нуклеозида является важным для высокой эффективности ингибирования, что согласуется с проявлением активности у 5-додецилнуклеотида **124**. Однако в отличие от соединений **124**, **128**, замена этинила на другой жёсткий линкер в случае перилена-содержащих нуклеозидов не приводила к уменьшению активности (**136**, **138**) (Рисунок 6). Нуклеозидный остов и положение присоединения фрагмента перилена (2' или 3', **136**, **138**, **140**) также не оказались критически важными факторами для проявления активности (Рисунок 6).

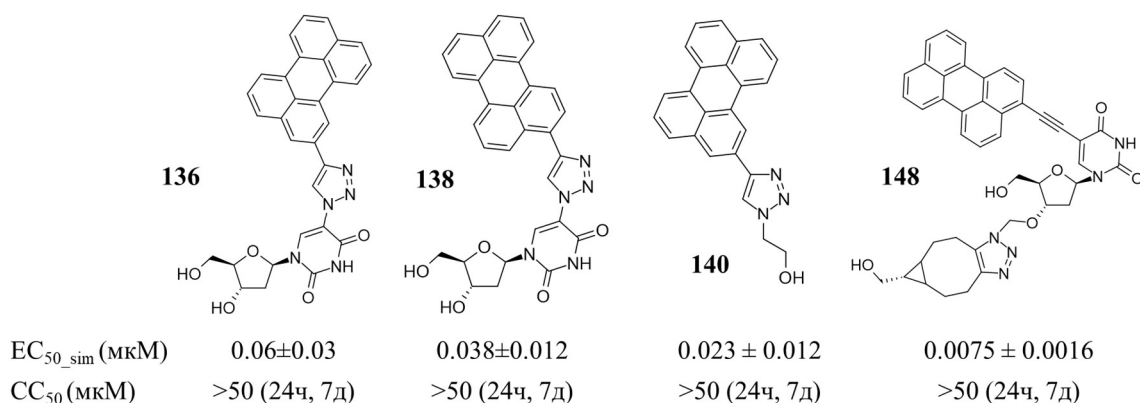


Рисунок 6. Влияние химической структуры RAFI на эффективность ингибирования репродукции ВКЭ *in vitro*.

Некоторые 3'-O-производные 5-(перилена-3-илэтинил)-2'-дезоксинуридина (например, **148**) проявили ещё более высокую активность по сравнению с другими RAFI, что может объясняться как более высокой эффективностью генерирования синглетного кислорода, так и изменением физико-химических свойств соединений, приводящих к лучшему распределению в липидных мембранах вируса и клетки. В частности, активность RAFI увеличивалась при увеличении расчётной липофильности.

Для установления механизма действия соединений были проведены эксперименты с изменением порядка добавления соединений и вируса к клеткам (Таблица 3). Инкубирование соединений **130-133** вместе с вирусом в течение 1 часа перед добавлением к клеткам не влияло существенным образом на активность (Таблица 3, EC₅₀). В то же время предварительное инкубирование вируса с клетками с последующим отмытием от вируса приводит к существенному уменьшению активности (Таблица 3, EC₅₀_{cel}). Это может быть связано с тем, что некоторые вирионы, которые не смогли проникнуть в клетки в случае предварительного инкубирования вируса с соединениями либо одновременного добавления, в этом случае оказались способны проникнуть внутрь.

2.3. Определение противовирусной активности селен- и сероорганических соединений

В настоящей работе была исследована цитотоксичность и способность ингибировать репродукцию ВКЭ 9 серий селенорганических соединений и 1 род-

ственной им серии сероорганических соединений (всего 43 соединения) (Рисунок 7).

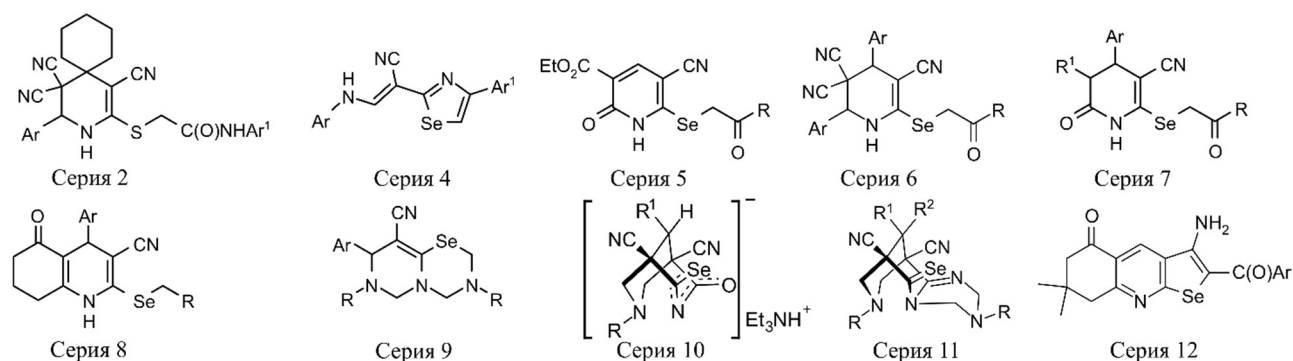


Рисунок 7. Серии исследованных селен- и сероорганических соединений.

Результаты определения противовирусной активности и цитотоксичности для нескольких соединений представлены в таблице 4. Все соединения из серий 6 и 9 были токсичны и не исследовались далее. Единственное умеренно токсичное соединение из серии 10 (**187**) не было активным при концентрации 50 мкМ. Таким образом, значения EC_{50} определялись для нетоксичных представителей семи серий: 2, 4, 5, 7, 8, 11, 12 (Таблица 4).

Таблица 4. Ингибирование репродукции ВКЭ и цитотоксичность некоторых селен- и сероорганических соединений.

№	Серия	Заместители			CC ₅₀ , мкМ		EC ₅₀ , мкМ
		R	R ¹ или Ar ¹	R ² или Ar	24 ч	7 д	
151	2	-	4-MeC ₆ H ₄	Ph	>50	>50	8±1
152		-	4-Me-3-ClC ₆ H ₃	Ph	>50	>50	4.7±0.3
153	4	-	Ph	Ph	>50	>50	8±1
154		-	Ph	4-MeC ₆ H ₄	>50	>50	7±1
157	5	4-MeC ₆ H ₄ NH	-	-	18	35	9±3
161	7	OMe	CN	2-фурил	>50	>50	9±7
168		Ph	CN	Ph	>50	<6.25	3±0
176	8	H	-	2-фурил	>50	>50	>50
178		C(O)Ph	-	2-фурил	35	31	6±2
187	10	2-тиенил	4-MeC ₆ H ₄	-	>50	35	>50
190	11	CH ₂ Ph	R ¹ +R ² = (CH ₂) ₅	-	>50	>50	2.34±0.23
191	12	-	-	Ph	>50	>50	3±1
192		-	-	4-MeC ₆ H ₄	>50	>50	0.436±0.016

Соединения из серий 2, 4 были нетоксичными. Значения EC_{50} для активных соединений (например, **151-154**) находились в диапазоне 4-8 мкМ. Оба соединения серии 5 были довольно токсичными. Соединения серии 7, содержащие

арильные заместители, были более токсичны, чем их алкильные аналоги (например, **161** и **168**). Соединения серии 8 проявили умеренную активность против ВКЭ, будучи достаточно токсичными для культуры клеток СПЭВ. Заместители в ароматическом кольце в положении 4 гексагидрохинолинового скаффолда существенно не влияли на активность. Напротив, увеличение объёма заместителя R приводило к увеличению как активности, так и токсичности (ср. **176** и **178**). Трициклические соединения из серии 11 представляют собой совершенно новый класс умеренно токсичных ингибиторов репродукции ВКЭ. Соединения серии 11 можно рассматривать как 1,3,5-триазиновые аналоги биспидинов (3,7-диазабипицикло[3.3.1]нонанов), спектр биологической активности которых достаточно хорошо изучен. Селеноло[2,3-*b*]хинолины (**191**, **192**) являются одними из наиболее эффективных ингибиторов репродукции ВКЭ среди исследованных соединений.

Важным этапом анализа данных, полученных в ходе фенотипического скрининга, является прогнозирование потенциальных мишеней действия соединений. Для этого нами были использованы алгоритмы поиска ближайших соседей и поиск по подструктуре в базах данных FlaviChEMBL, ViralChEMBL, ChEMBL, PubChem BioAssay.

Сразу для нескольких серий соединений (2,7,12) близкие аналоги проявляли активность в высокопроизводительном скрининге ингибиторов ядерного фактора 2 (Nrf2). Nrf2 играет важную роль в клеточном ответе на инфекцию ДЕНВ. Таким образом, механизм действия таких соединений может быть связан с этой мишенью. Соединения из других серий проявляли ингибиторную активность по отношению к представителям других родов вирусов, что также позволяет предположить, что их механизм действия реализуется через взаимодействие с мишенями клетки хозяина.

Сероорганические аналоги соединений из серии 12 эффективно ингибируют репродукцию ДЕНВ, взаимодействуя с капсидным белком С. Аминокислотная последовательность этого белка является довольно консервативной, поэтому механизм действия соединений этой серии может реализоваться аналогичным образом через взаимодействие с капсидным белком ВКЭ.

2.4. Виртуальный скрининг ингибиторов репродукции вируса клещевого энцефалита с использованием данных FlaviChEMBL и метода генеративного топографического картирования

Для дальнейшего исследования химического пространства ингибиторов репродукции флавивирусов и поиска новых ингибиторов репродукции ВКЭ соединения из FlaviChEMBL и библиотеки коммерчески доступных низкомолекулярных органических соединений компании InterBioScreen (IBS) были нанесены на

универсальные карты химического пространства, построенные методом генеративного топографического картирования (Рисунок 8). На карты также были нанесены данные EnteroChEMBL – части ViralChEMBL, содержащей данные об активности соединений против представителей рода *Enterovirus* (9 видов энтеровирусов, 4510 соединений, 13436 записей об активности).

Несмотря на то, что детализация универсальных карт невысокая, на них различимы области, на которые преимущественно проецируются активные соединения (Рисунок 8, синий), и области, на которые преимущественно проецируются неактивные соединения (Рисунок 8, красный).

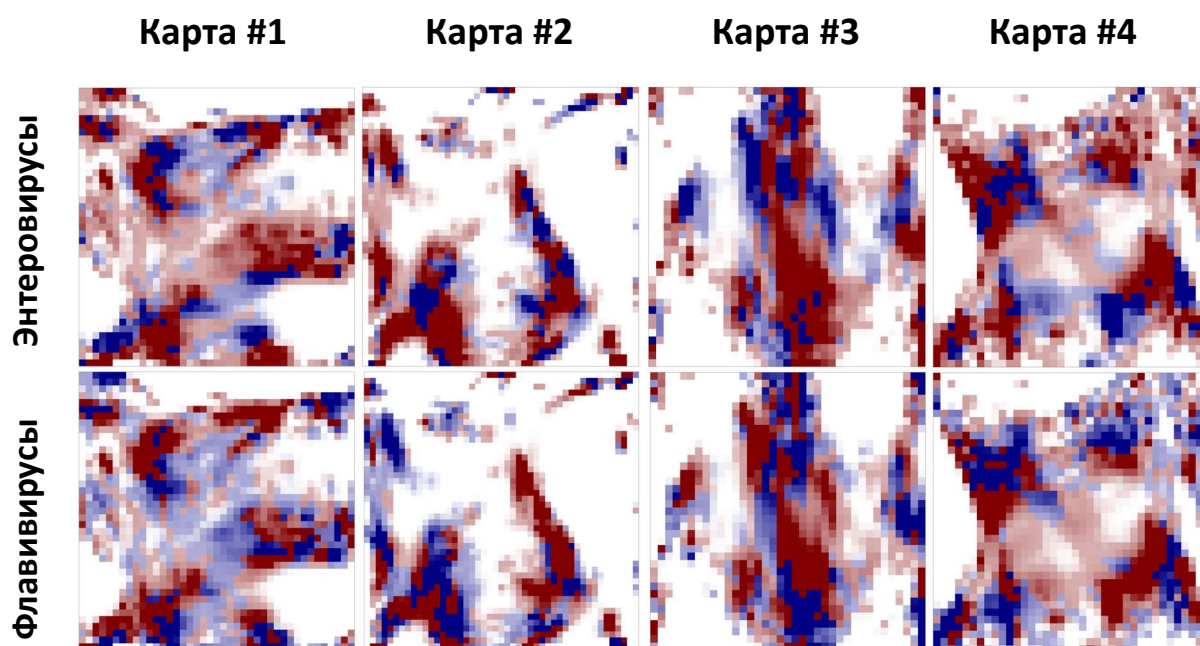


Рисунок 8. Универсальные карты химического пространства *FlaviChEMBL*, полученные методом генеративного топографического картирования, окрашенные в зависимости от активности (голубой – активные соединения, красный – неактивные и не протестированные соединения, белый – области карты, на которые соединения из *Flavi/EnteroChEMBL* не проецируются).

В рамках метода GTM структуре соединения, представленной в виде точки в исходном пространстве дескрипторов, ставится в соответствие распределение вероятности её принадлежности узлам решётки, составляющим карту GTM. В результате получается вектор, содержащий значения вероятности, который называют “вектором ответственности” (*англ.* responsibility vector). Размерность такого вектора может быть уменьшена с использованием кластеризации по клеткам (*англ.* cell-based clustering) до “паттерна ответственности” (*англ.* responsibility pattern, RP). RP может рассматриваться как кластер соединений, а доля активных соединений, имеющих определённый RP, может быть использована как мера вероятности того, что соединение с этим RP окажется активным. В рамках работы первоначально были сгенерированы RP для каждого соединения

Flavi/EnteroChEMBL для каждой карты. Всего было 20929 RP для всех карт. Общая блок-схема отбора соединений представлена на рисунке 9. Для того, чтобы оставить только области карт, на которые проецируются в основном активные соединения из Flavi/EnteroChEMBL, RP, содержащие менее 75% соединений, активных против флави- или энтеровирусов по данным Flavi/EnteroChEMBL, были отброшены (13045 RP) (Рисунок 9). После фильтрации осталось 7884 RP. Затем все соединения из библиотеки IBS были спроецированы на 4 карты для поиска соответствующих им RP (538530). Так как соединения, обладающие одним и тем же RP предположительно могут обладать схожим профилем биологической активности, для дальнейшего анализа были отобраны только соединения IBS и Flavi/EnteroChEMBL с совпадающими RP (4861). Соединения с совпадающими RP являются своего рода “соседями” в пространстве карты. Почти у каждого четвёртого соединения IBS (121558 из 484183) нашёлся хотя бы один “сосед” из FlaviChEMBL.

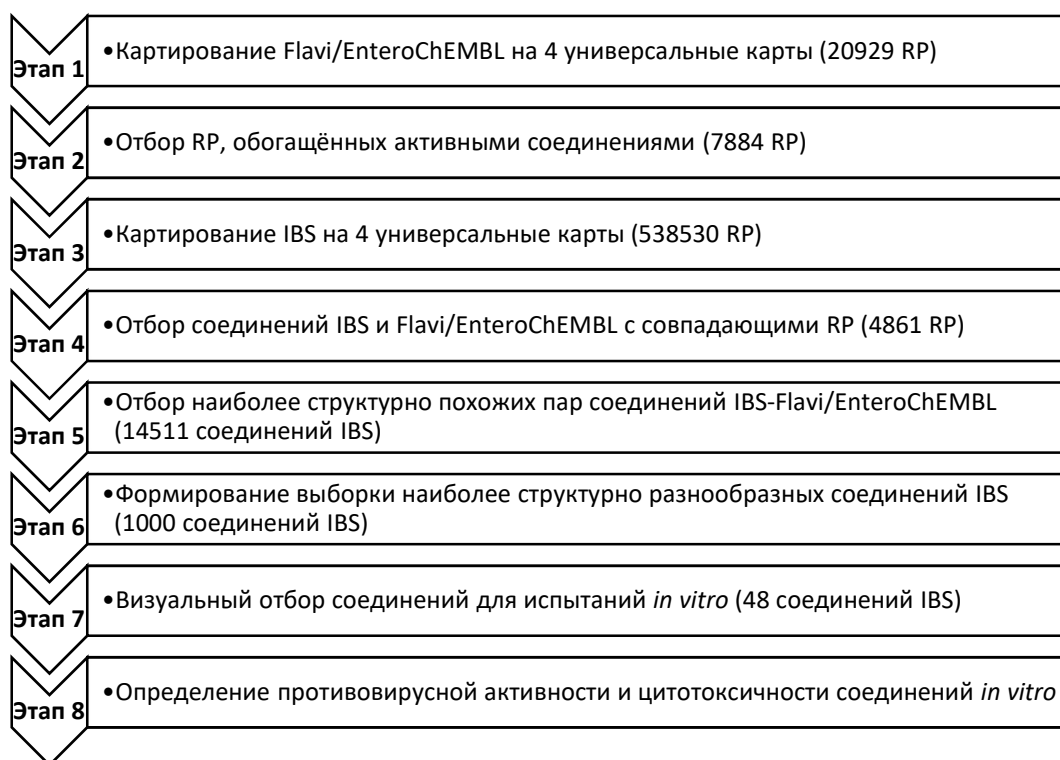


Рисунок 9. Схема виртуального скрининга.

Поскольку число отобранных таким образом соединений слишком велико для экспериментального определения противовирусной активности без использования технологий высокопроизводительного скрининга, нами были оставлены только самые ближайшие соседи в исходном пространстве дескрипторов (25% наиболее близких соседей с использованием расстояния Евклида и меры различия, коэквивалентной мере сходства Жаккара) (Рисунок 9). Таким образом, каждому соединению IBS в соответствие был поставлен уже не RP, а конкретное соединение из FlaviChEMBL, что позволило уменьшить количество соединений

до 14511. Для дальнейшего уменьшения числа соединений нами была отобрана выборка наиболее химически разнообразных соединений (1000 соединений). Эти соединения затем были рассмотрены вручную для того, чтобы отобрать соединения, не содержащих реакционноспособных и токсифорных групп, а также отбросить соединения, которые сильно отличались по своей химической структуре от “соседа” из Flavi/EnteroChEMBL. В итоге для определения противовирусной активности против ВКЭ и энтеровирусов и цитотоксичности *in vitro* было отобрано 48 соединений IBS (одно из соединений было отобрано для тестирования против ВКЭ и энтеровирусов), которым соответствовали 58 ближайших “соседей” из Flavi/EnteroChEMBL.

Ингибиторная активность отобранных соединений по отношению к репродукции ВКЭ была определена *in vitro*. Из 44 соединений, исследованных против ВКЭ, 23 соединения проявили ингибиторную активность со значениями EC_{50} менее 50 мкМ. В первую очередь нами была определена активность соединений IBS, которые присутствовали в ChEMBL (например, соединения **201**, **203**, **204**, Таблица 5). Соединения проявляли ингибиторную активность со значениями EC_{50} порядка мкМ. По данным ChEMBL все эти соединения были исследованы в качестве ингибиторов метилтрансферазного домена белка NS5 ДЕНВ (PubChem BioAssay AID 588708). Принимая во внимание сходство белков NS5 ВКЭ и ДЕНВ, активность этих соединений может быть обусловлена именно ингибированием ферментативной активности NS5 ВКЭ.

Несколько аналогов соединений, активность которых определялась в том же эксперименте PubChem BioAssay (AID 588708), также подавляли репродукцию ВКЭ (например, соединения **207**, **210**, Таблица 5). Хотя эти соединения были отобраны с использованием данных об ингибировании активности белка NS5, их механизм действия в опытах на клетках может быть связан и с ингибированием других мишеней. Так, например, серия структурно подобных аналогов соединения **209** по данным ChEMBL ингибировала репродукцию флавивирусов путём препятствования димеризации белка капсида С.

Аналоги соединений, ингибирующие цитопатическое действия ВЛЗН в эксперименте на клеточной культуре по данным PubChem BioAssay (AID 1621), также проявили активность против ВКЭ (соединения **210-221**). Два наиболее активных соединения – **213** и **214** – ингибировали репродукцию ВКЭ со значениями EC_{50} в субмикромольном диапазоне.

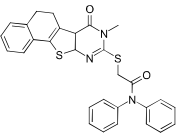
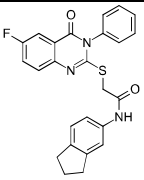
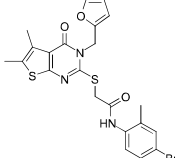
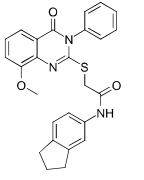
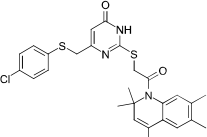
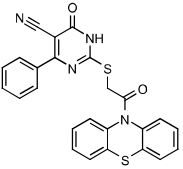
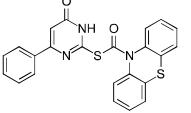
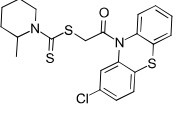
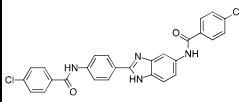
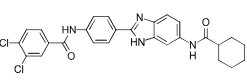
Соединение **223**, аналог соединения ChEMBL238469, механизм действия которого связан с ингибированием группы белков, осуществляющих транспорт к комплексу Гольджи и влияющих на репродукцию некоторых оболочечных вирусов, также проявил активность против ВКЭ. Поскольку ингибирование транспорта к комплексу Гольджи влияет на репродукцию ВКЭ в клетках млекопитающих, активность может быть реализовываться именно через этот механизм.

Таблица 5. Ингибирование репродукции ВКЭ и цитотоксичность некоторых соединений IBS *in vitro*.

№	Структура соединения IBS	ChEMBL compound id	Структура соединения ChEMBL	Jd ⁵	Ed ⁶	ChEMBL виды вирусов	EC ₅₀ , мкМ	CC ₅₀ , мкМ	
								24ч	7д
201		ChEMBL 195455		0	0	ДЕНВ	4.71±0.018	>50	>50
203		ChEMBL 3192665		0	0	ДЕНВ	4±1	>50	>50
204		ChEMBL 1982577		0	0	ДЕНВ	8±1	>50	60
207		ChEMBL 1329286		0.003	5.48	ДЕНВ	7±2	>50	>50
209		ChEMBL 3191525		0.011	28.14	ДЕНВ	17±8	>50	>50
210		ChEMBL 1707215		0.012	26.21	ДЕНВ (ВЛЗН)	7±1	>50	>50
213		ChEMBL 1406668		0.011	23.07	ВЛЗН	0.20±0.16	>50	>50

⁵ Мера различия, коэквивалентная мере сходства Жаккара.

⁶ Евклидово расстояние.

№	Структура соединения IBS	ChEMBL compound id	Структура соединения ChEMBL	Jd ⁵	Ed ⁶	ChEMBL виды вирусов	EC ₅₀ , мкМ	CC ₅₀ , мкМ	
								24ч	7д
214		ChEMBL 1376916		0.012	26.57	ВЛЗН	0.6±0.1	>50	>50
216		ChEMBL 1417028		0.012	23.81	ВЛЗН	3.44±0.04	>50	>50
219		ChEMBL 1376311		0.011	20.54	ВЛЗН (ДЕНВ)	1.84±0.15	35	35
220				0.010	23.13	ВЛЗН (ДЕНВ)	1.35±0.19	>50	>50
221				0.011	23.50	ВЛЗН (ДЕНВ)	11±2	>50	>50
223		ChEMBL 238469		0.0012	4.12	Вирус Модока	2±1	>50	>50

3. Заключение

В работе была проанализирована общедоступная информация о противо-флавивирусной активности. Результаты анализа были использованы для дизайна ингибиторов репродукции ВКЭ. Ингибиторная активность против репродукции ВКЭ и/или цитотоксичность была определена для 148 соединений: 41 аналога нуклеозидов и 107 ненуклеозидных низкомолекулярных органических соединений. Было найдено 67 соединений, проявляющих ингибиторную активность со значениями полуингибиторной концентрации в диапазоне 7 нМ – 34 мкМ. Для 110 соединений впервые была определена цитотоксичность на культуре клеток СПЭВ. Это позволило существенно расширить химическое пространство ингибиторов репродукции ВКЭ (Рисунок 10), установить структурные особенности активных соединений и углубить знания о зависимостях структура-активность. Активные соединения могут служить начальными структурами для поиска новых эффективных ингибиторов репродукции ВКЭ и других флавивирусов.

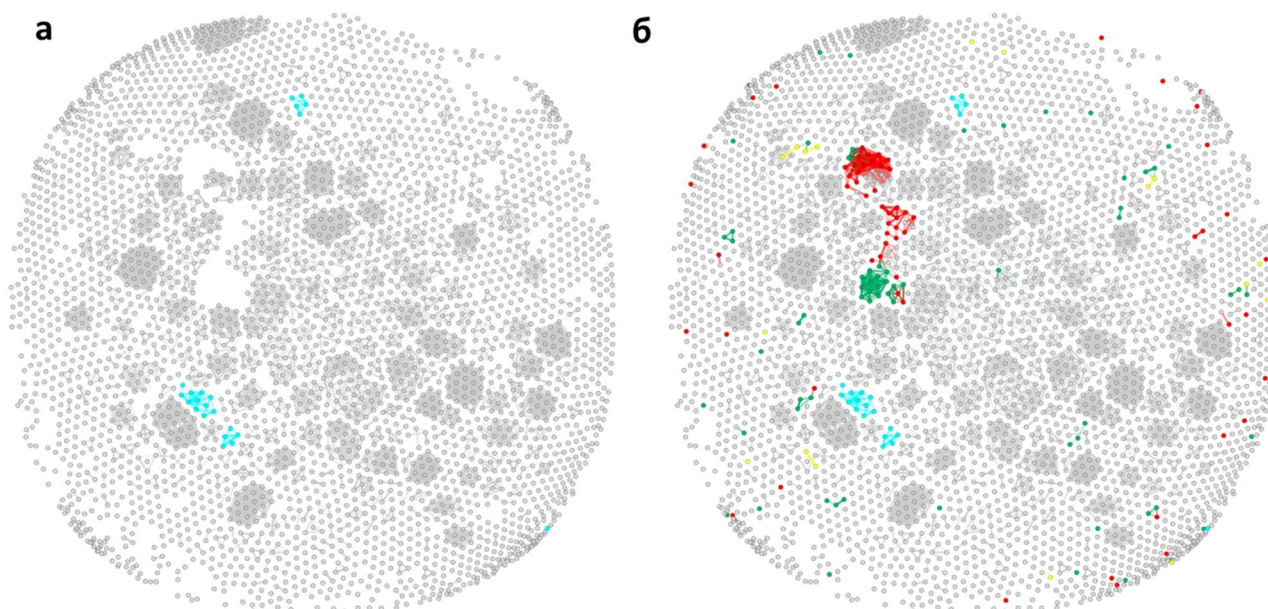


Рисунок 10. Сетевое отображение химического пространства FlaviChEMBL (а) и соединений, которые были исследованы *in vitro* в данной работе (б). Цветовое кодирование: голубой – соединения, испытанные по отношению к ВКЭ по данным FlaviChEMBL, красный – неактивные, зелёный – активные соединения, протестированные против ВКЭ *in vitro* в данной работе. Жёлтый – соединения, для которых в данной работе была обнаружена высокая цитотоксичность *in vitro*, а активность не исследовалась.

ВЫВОДЫ

1) Определены структурные особенности противофлавивирусных соединений с использованием информации, извлечённой из общедоступной базы данных ChEMBL, и методов анализа химического пространства, в том числе методов анализа главных компонент, самоорганизующихся карт Кохонена, сетей химического пространства и анализа скаффолдов.

2) Выявлены ингибиторы репродукции вируса клещевого энцефалита в ряду N^6 -замещённых аденозинов. Для активных соединений показана потенциальная возможность взаимодействия с метилтрансферазой и полимеразой вируса клещевого энцефалита на основе моделирования методом молекулярного докинга.

3) Исследован спектр активности 5-(перилен-3-илэтинил)уридинов и их производных по отношению к репродукции вируса клещевого энцефалита. Установлено, что периленовый фрагмент необходим для проявления высокой эффективности ингибирования репродукции вируса.

4) В результате скрининга *in vitro* идентифицировано шесть центральных фрагментов низкомолекулярных серо- и селенорганических соединений, обуславливающих наличие ингибиторной активности по отношению к репродукции вируса клещевого энцефалита и обладающих низкой цитотоксичностью. В результате поиска по подобию в общедоступных базах данных химических структур найдены близкие структурные аналоги активных соединений с известным механизмом действия.

5) С использованием генеративного топографического картирования проведён виртуальный скрининг библиотеки коммерчески доступных низкомолекулярных органических соединений. При экспериментальной валидации прогноза *in vitro* выявлены 23 новых ингибитора репродукции вируса клещевого энцефалита, относящихся к не изученным ранее классам.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи и патенты

1. **Orlov, A. A.** Getting to Know the Neighbours with GTM: The Case of Antiviral Compounds. / **A. A. Orlov**, E. V. Khvatov, A. A. Koruchekov, A. A. Nikitina, A. D. Zolotareva, A. A. Eletskaaya, L. I. Kozlovskaya, V. A. Palyulin, D. Horvath, D. I. Osolodkin, A. Varnek // *Molecular Informatics*. – **2019**. – V. 38. – P. 1800166.
2. **Orlov, A. A.** Probing chemical space of tick-borne encephalitis virus reproduction inhibitors with organoselenium compounds. / **A. A. Orlov**, A. A. Eletskaaya, K. A. Frolov, A. D. Golinets, V. A. Palyulin, S. G. Krivokolysko, L. I. Kozlovskaya, V. V. Dotsenko, D. I. Osolodkin // *Archiv der Pharmazie*. – **2018**. – V. 351. – P. e1700353.
3. Proskurin, G. V. 3'-O-substituted 5-(perylene-3-ylethynyl)-2'-deoxyuridines as tick-borne encephalitis virus reproduction inhibitors. / G. V. Proskurin, **A. A. Orlov**, V. A. Brylev, L. I. Kozlovskaya, A. A. Chistov, G. G. Karganova, V. A. Palyulin, D. I. Osolodkin, V. A. Korshun, A. V. Aralov // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – **2018**. – V. 155. – P. 77–83.
4. Kozlovskaya, L. I. Selective inhibition of enterovirus a species members' reproduction by furano[2,3-d]pyrimidine nucleosides revealed by antiviral activity profiling against (+)ssRNA viruses. / L. I. Kozlovskaya, A. D. Golinets, A. A. Eletskaaya, **A. A. Orlov**, V. A. Palyulin, S. N. Kochetkov, L. A. Alexandrova, D. I. Osolodkin // *ChemistrySelect*. – **2018**. – V. 3. – P. 2321–2325.
5. **Orlov, A. A.** New tools in nucleoside toolbox of tick-borne encephalitis virus reproduction inhibitors. / **A. A. Orlov**, M. S. Drenichev, V. E. Oslovsky, N. N. Kurochkin, P. N. Solyev, L. I. Kozlovskaya, V. A. Palyulin, G. G. Karganova, S. N. Mikhailov, D. I. Osolodkin // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – **2017**. – V. 27. – P. 1267–1273.
6. Aralov, A. V. Perylenyltriazoles inhibit reproduction of enveloped viruses. / A. V. Aralov, G. V. Proskurin, **A. A. Orlov**, L. I. Kozlovskaya, A. A. Chistov, S. V. Kutyaakov, G. G. Karganova, V. A. Palyulin, D. I. Osolodkin, V. A. Korshun // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – **2017**. – V. 138. – P. 293–299.
7. **Orlov, A. A.** Rigid amphipathic nucleosides suppressing reproduction of tick-borne encephalitis virus. / **A. A. Orlov**, A. A. Chistov, L. I. Kozlovskaya, A. V. Ustinov, V. A. Korshun, G. G. Karganova, D. I. Osolodkin // *MedChemComm*. – **2016**. – V. 7. – P. 495–499.
8. Osolodkin, D. I. Progress in visual representations of chemical space. / D. I. Osolodkin, E. V. Radchenko, **A. A. Orlov**, A. E. Voronkov, V. A. Palyulin, N. S. Zefirov // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – **2015**. – V. 10. – P. 959–973.
9. Патент RU2650880 Российская Федерация. Периленилтриазолы - ингибиторы репродукции вируса клещевого энцефалита / Аралов А. В., Коршун В. А., Проскурин Г. В., Чистов А. А., Осолодкин Д. И., Козловская Л. И., Карганова Г. Г., **Орлов А. А.**; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН); заявл. 30.11.17; опубл. 18.04.18.

Тезисы докладов конференций

10. **Orlov, A.** Design and antiviral activity evaluation of small molecule compounds against viruses from *Flavivirus* and *Enterovirus* genera. / **A. Orlov**, M. Drenichev, V. Oslovsky, K. Frolov, A. Nikitina, E. Khvatov, A. Eletskaaya, A. Golinec, S. Mikhailov, V. Palyulin, G. Karganova, V. Dotsenko, L. Kozlovskaya, D. Osolodkin // Abstracts of papers of the American Chemical Society. – 256th ACS National Meeting. – 19-23 August 2018, Boston, MA, USA.
11. **Orlov, A.** Analysis of anti-flavivirus and anti-enterovirus activity based on ViralChEMBL data. / **A. Orlov**, A. Nikitina, V. Palyulin, D. Osolodkin // Abstracts of papers of the American Chemical Society. – 256th ACS National Meeting. – 19-23 August 2018, Boston, MA, USA.
12. **Орлов, А. А.** Картирование химического пространства ингибиторов репродукции флавивирусов – низкомолекулярных органических соединений и компонентов гуминовых систем на основе базы данных ViralChEMBL и экспериментальных данных. / **А. А. Орлов**, А. А. Никитина, А. Я. Жеребкер, В. А. Палюлин, И. В. Перминова, Д. И. Осолодкин // Сборник материалов XXV Российского национального конгресса Человек и лекарство. Тезисы докладов. – 9-12 апреля 2018, Москва. – P. 81.
13. Osolodkin, D. I. Mapping of antiviral chemical space with ViralChEMBL: Use cases and new findings. / D. I. Osolodkin, **A. Orlov**, A. Nikitina, L. I. Kozlovskaya, V. A. Palyulin, D. Horvath, A. Varnek. // Abstracts of papers of the American Chemical Society. – 255th ACS National Meeting. – 19-23 March 2018, New Orleans, USA.
14. Osolodkin, D. I. ViralChEMBL: Enhancement of antiviral activity data from ChEMBL / D. I. Osolodkin, A. A. Nikitina, **A. A. Orlov**, L. I. Kozlovskaya, V. A. Palyulin // Book of abstracts. – 3rd Russian Conference on Medicinal Chemistry, Kazan, Russia, 28 September – 03 October, 2017, Kazan, Russia. – P. 95.
15. **Orlov, A. A.** Exploring chemical space of humic substances through ESI FTICR MS analysis and similarity searching. / **A. A. Orlov**, A. Ya. Zherebker, A. A. Eletskaaya, L. I. Kozlovskaya, I. V. Perminova, D. I. Osolodkin // Book of abstracts. – 3rd Kazan Summer School on Chemoinformatics, 5-7 July 2017, Kazan Federal University Kazan.
16. **Orlov, A. A.** Analysis of antiviral chemical space based on ChEMBL data. / **A. A. Orlov**, A. A. Nikitina, D. I. Osolodkin, V. A. Palyulin, N. S. Zefirov // Book of abstracts. – 12th German Conference on Chemoinformatics. – 6-8 November 2016, Fulda, Germany. – P. 38.
17. Osolodkin, D. I. Molecular motions and reproduction inhibitors of tick-borne encephalitis virus. / D. I. Osolodkin, E. V. Dueva, **A. A. Orlov**, V. A. Palyulin, N. S. Zefirov, L. I. Kozlovskaya, G. G. Karganova // Book of abstracts. – 21st European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationship: Where Molecular Simulations Meet Drug Discovery. – 4-8 September 2016, Verona, Italy. – P. 190.
18. **Orlov, A. A.** The prefusion and postfusion forms of the envelope protein E as targets for the development of flavivirus inhibitors. / **A. A. Orlov**, D. I. Osolodkin, L. I. Kozlovskaya, V. V. Dotsenko, K. A. Frolov, Yu. V. Rogova, G. G. Karganova, V. A. Palyulin, N. S. Zefirov // Book of abstracts. – 3rd Antivirals Congress, NH Grand Krasnaplosky, Amsterdam, The Netherlands. – 12-14 October 2014. – P. 65.