

А.С.Кабанов¹, Ал.А.Сергеев¹, Л.Е.Булычев¹, Н.И.Бормотов¹, Л.Н.Шишкина¹, Ар.А.Сергеев¹, С.А.Боднев¹, М.О.Скарнович¹, А.Р.Шевцов¹, Б.А.Селиванов², А.Я.Тихонов², А.П.Агафонов¹, А.Н.Сергеев¹

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ХИМИЧЕСКИ СИНТЕЗИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ОТНОШЕНИИ ОРТОПОКСВИРУСОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO*

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Российская Федерация; ²ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н.Ворожцова» СО РАН, Новосибирск, Российская Федерация

Протестировано более 200 химических соединений – конденсированных производных пирролидин-2,5-диона, а также их предшественников и ближайших аналогов, синтезированных в Новосибирском институте органической химии Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН), на наличие противовирусной активности в отношении суррогатных ортопоксвирусов *in vitro*. На основании полученных данных были выбраны наиболее эффективные соединения для исследования их противовирусной активности в отношении вируса оспы обезьян (ВОО) и вируса натуральной оспы (ВНО). В качестве положительного контроля использовали противооспенный химический препарат ST-246, разработанный компанией SIGA Technologies Inc. (США), синтезированный в НИОХ СО РАН по описанной авторами методике. Было показано, что соединение НИОХ-14 (7-[N'-(4-Трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновая кислота) обладает сравнимой с ST-246 50 % токсической концентрацией (TC₅₀) и противовирусной активностью в отношении ортопоксвирусов, в том числе ВОО и ВНО, по показателям 50 % ингибирующей концентрации (IC₅₀) и терапевтического индекса (TI=TC₅₀/IC₅₀). Так, в отношении ВНО IC₅₀ для ST-246 и НИОХ-14 находились в диапазоне от 0,001 до 0,004 мкг/мл, а IS для обоих препаратов были >100000. Кроме того, эффективность химических соединений ST-246 и НИОХ-14 в концентрациях 0,0125; 0,025 и 0,05 мкг/мл в профилактических схемах влияния на инфекционность вируса экстремелии (ВЭ) *in vitro* была соответственно на 0,6; 3 и 1 lg выше, чем при их внесении через 1 час после заражения ВЭ клеток Vero.

Ключевые слова: ортопоксвирусы, вирус оспы обезьян, вирус натуральной оспы, культура клеток Vero, токсичность, противовирусная активность, конденсированные производные пирролидин-2,5-диона.

A.S.Kabanov¹, Al.A.Sergeev¹, L.E.Bulychev¹, N.I.Bormotov¹, L.N.Shishkina¹, Ar.A.Sergeev¹, S.A.Bodnev¹, M.O.Skarnovich¹, A.R.Shevtsov¹, B.A.Selivanov², A.Ya.Tikhonov², A.P.Agafonov¹, A.N.Sergeev¹

Studies of Anti-Viral Activity of Chemically Synthesized Compounds against Orthopoxviruses *in vitro*

¹State Research center of Virology and Biotechnology “Vector”, Kol'tsovo, Russian Federation; ²N.N.Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry, RAS SB, Novosibirsk, Russian Federation

Screened are more than 200 chemical compounds – condensed derivatives of pyrrolidine-2.5-dion – as well as their precursors and close-in analogues, synthesized at the Novosibirsk Institute of Organic Chemistry of the RAS Siberian Branch (NIOC RAS SB), for the presence of anti-viral activity against surrogate Orthopoxviruses *in vitro*. Based on the results obtained selected have been the most effective compounds for studies of their anti-viral activity in reference to Monkeypox virus (MPV) and variola virus (VV). Chemical preparation ST-246, developed by SIGA Technologies Inc (USA) and synthesized at NIOC RAS SB in accordance with vendors' technique, has been utilized as positive control. Demonstrated is the fact that NIOC-14 compound (7-[N'-(4-trifluoromethylbenzoyl)-hydrazinecarbonyl]-tricyclo[3.2.3.0^{2,4}]non-8-EN-6-carboxylic acid) possesses comparable with those of ST-246 50 % toxic concentration (TC₅₀) and anti-virus activity as regards Orthopoxviruses, including MPV and VV against 50 % inhibiting concentration (IC₅₀) and therapeutic index (TI=TC₅₀/IC₅₀). Thus, for instance, in respect of VV, IC₅₀ for ST-246 and NIOC-14 is within the range of 0,001-0,004 µg/ml, and IS for both of them is > 100000. In addition, ST-246 and NIOC-14 chemical compound efficacy, concentrated up to 0,0125; 0,025 and 0,05 µg/ml, in accordance with prophylactic charts describing an impact on ectromelia virus (EV) infectivity *in vitro*, is consequently 0,6; 3 and 1 lg higher than in case of compound application after an hour of Vero cells infection with EV.

Key words: Orthopoxviruses, Monkeypox virus, variola virus, Vero cell culture, toxicity, anti-viral activity, condensed derivatives of pyrrolidine-2.5-dion.

Широкомасштабные мероприятия, предпринятые мировым сообществом под эгидой Всемирной организации здравоохранения по вакцинопрофилактике населения Земного шара против оспы – одного из самых тяжелых заболеваний человека с летальностью в среднем 30 %, привели к ликвидации этого заболевания на планете. В результате повсеместного прекращения после 1980 г. иммунизации против

натуральной оспы доля населения, чувствительного к вирусу натуральной оспы (ВНО), постоянно увеличивается [9]. Нельзя отрицать, что угроза возникновения оспы существует и в настоящее время, поскольку невозможно, например, исключить наличие нелегального хранения ВНО или реконструкции жизнеспособного вируса на основе данных первичной структуры ДНК и их преднамеренного использова-

ния против населения. Противовирусные препараты, эффективные в отношении ВНО и других патогенных для человека ортопоксвирусов, прежде всего вируса оспы обезьян (ВОО), могли бы существенно снизить последствия возможного возникновения вспышек оспы и были бы полезны при лечении и профилактике поствакцинальных осложнений, неизбежных при проведении массовой вакцинации населения.

Спектр лечебно-профилактических препаратов, используемых для экстренной профилактики и лечения заболеваний, вызываемых ортопоксвирусами, чрезвычайно ограничен. За последние 50 лет определено несколько субстанций, пригодных для лечения ортопоксвирусных инфекций. К этим средствам относятся тиосемикарбазоны, аналоги нуклеозидов, нуклеотидов, ациклические нуклеозиды и нуклеотиды, интерфероны и их индукторы [10]. Например, сидофовир (Cidofovir, НРМРС, Vistide), нуклеозидный аналог, который применяется в клиниках США при терапии герпесвирусных инфекций, и ряд его производных показали себя как перспективные противооспенные препараты в экспериментах на мышах и низших приматах [8]. Появились также сообщения о разработке нового препарата ST-246, проявившего высокую активность в экспериментах с использованием низших приматов, инфицированных штаммом вируса оспы обезьян Zaire-79 (V79-I-005) [7, 12]. Однако поскольку в геноме ортопоксвирусов могут появляться мутации, обуславливающие их устойчивость к лекарственным препаратам, необходим поиск новых химических соединений с различными механизмами действия и разработка на их основе новых противовирусных лекарств. В связи с этим целью настоящего исследования являлось определение противовирусной активности новых химически синтезированных соединений в отношении ортопоксвирусов в экспериментах *in vitro*.

Материалы и методы

Химические соединения. В работе были использованы химические соединения, синтезированные в Новосибирском институте органической химии (НИОХ) им. Н.Н.Ворожцова СО РАН. В НИОХ СО РАН разработаны методы получения соединений, которые близки по химической структуре ST-246 (4-трифторметил-N-(3,3а,4,4а,5,5а,6,6а-октагидро-1,3-диоксо-4,6-этенциклопроп[f]изоиндол-2(1H)-ил)-бензамид), но при этом обладают патентной чистотой [2]. Они являются конденсированными производными пирролидин-2,5-диона, а также их предшественниками и ближайшими аналогами. Полученным соединениям было дано название НИОХ с соответствующими номерами. На все лабораторные образцы были представлены паспорта, содержащие не менее 12 характеристик: шифр соединения, химическая структура и формула, брутто формула, молекулярный вес, ЯМР-спектры и т.д. В качестве положительного контроля использовали химическое соединение

с установленной противооспенной активностью ST-246, синтезированное в НИОХ СО РАН по описанной методике [6].

Вирусы. В работе использовали вирусы осповакцины (штамм ЛИВП), оспы коров (штамм Гришак), оспы мышей – экстромелии (штамм К-1), натуральной оспы (штаммы 6-58, India-3a, Congo-9 и Butler) и вируса оспы обезьян (штамм V79-1-005), полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (п. Кольцово, Новосибирская обл.). Вирусы нарабатывали в культуре клеток Vero. Концентрацию вирусов в культуральной жидкости определяли путем титрования методом бляшек на культуре клеток Vero, рассчитывали и выражали в десятичных логарифмах бляшкообразующих единиц в 1 мл (lg БОЕ/мл). Концентрация вируса в использованных в работе образцах составляла от 5,6 до 6,7 lg БОЕ/мл. Нарботанные и использованные в работе серии вирусов с указанным титром хранили при –70 °С. Исследования с использованием штаммов вирусов натуральной оспы и оспы обезьян проводили в лаборатории с максимальным уровнем биологической защиты BSL-4, расположенной в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Клеточные культуры. В работе использовали клетки почки взрослой африканской зеленой мартышки (Vero), полученные из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Монослой клеток Vero выращивали в среде DMEM (ООО «БиолоТ», Россия) в присутствии 5 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота («HyClone», США) с добавлением пенициллина (100 МЕ/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). В качестве поддерживающей при культивировании клеток с вирусом использовали ту же среду, но с добавлением 2 % сыворотки.

Метод определения цитотоксичности и противовирусной активности химических препаратов. Оценку противовирусной эффективности препаратов проводили по адаптированной и модифицированной нами методике [3]. В лунки 96-луночных планшетов, содержащих монослой клеток Vero в 100 мкл среды DMEM с 2 % эмбриональной сыворотки, сначала вносили по 50 мкл серийных разведений исследуемых соединений, а потом – по 50 мкл разведения штаммов ортопоксвирусов в дозе 1000 БОЕ/лунку. Токсическая активность соединений определялась по гибели клеток под воздействием препарата в лунках планшета, в которые вирус не вносили. В качестве контролей использовали монослой клеток в лунках планшета, в которые вносили вирус без соединений (контроль вируса) и монослой клеток в лунках, в которые не вносили ни вирус, ни соединения (контроль культуры клеток). После инкубирования в течение 4 сут, монослой клеток прокрашивали витальным красителем нейтральным красным в течение 2 ч. После удаления красителя и отмывки лунок от его несвязавшейся фракции добавляли лизирующий буфер. Количество красителя, адсорбированное живыми клетками монослоя, оценивали по

оптической плотности (ОП), которая является показателем количества неразрушенных под влиянием вируса клеток в монослое. ОП измеряли на спектрофотометре Emax (Molecular Devices, США) при длине волны 490 нм. Учет результатов проводили с использованием планшетного спектрофотометра Emax и программы SoftMax 4.0 (Molecular Devices, США), которая автоматически рассчитывала 50 % токсическую концентрацию (ТС₅₀ в мкг/мл) и 50 % ингибирующую (эффективную) концентрацию (IC₅₀ в мкг/мл) препаратов. По соотношению 50 % токсической и эффективной концентраций определяли терапевтический индекс (ТИ) (или индекс селективности – IS): $TI = TC_{50}/IC_{50}$.

Оценка изменения инфекционности вируса экстремелии (ВЭ) *in vitro* под влиянием препаратов НИОХ-14 и ST-246. Противовирусная эффективность НИОХ-14 и ST-246 оценивалась по изменению инфекционности ВЭ (титра) в монослое клеток Vero при использовании 3 схем внесения препаратов и ВЭ: профилактической, лечебной и лечебно-профилактической. В лунки 24-луночных планшетов с клетками вносили по 0,1; 0,2 или 0,4 мл раствора препарата с концентрацией 0,1 мкг/мл по трем схемам: профилактической – за 1 ч до заражения ВЭ, лечебной – через 1 ч после заражения ВЭ, лечебно-профилактической – за 1 ч до и через 1 ч после заражения ВЭ. Заражение клеточного монослоя осуществляли десятикратными разведениями ВЭ (с 1-го по 6-е) в объеме 0,1 мл. Монослой клеток культивировали в общем объеме питательной среды, равном 0,8 мл, содержащем 2 % сыворотки. При профилактической и лечебной схеме концентрация препаратов в среде культивирования была 0,0125; 0,025 и 0,05 мкг/мл, а при лечебно-профилактической – 0,025 и 0,05 мкг/мл. Каждая схема применения препаратов *in vitro* была

воспроизведена в 4 повторах. Через 6 сут культивирования с ВЭ и препаратами в монослое клеток подсчитывали количество бляшек и определяли титр ВЭ (в lg БОЕ/мл) в каждой схеме применения препаратов и в соответствующем контроле. На основании этого рассчитывали индексы нейтрализации (ИН, в lg) ВЭ в каждой схеме применения препаратов: $ИН = \text{Титр}_{\text{контроль}} - \text{Титр}_{\text{опыт}}$.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами [1]. В случаях, когда при титровании на монослое клеток ВЭ не выявлялся из-за существующего порога чувствительности метода, использовали значение минимального титра ВЭ, выявляемого при данном методе титрования (10 БОЕ/мл, т.е. 1 lg БОЕ/мл). Показатели титров ВЭ представлены как среднее значение ± ошибка среднего (M±m). Сравнение показателей средних титров ВЭ в монослое клеток Vero проводили с применением непараметрического U-критерия Манна-Уитни [1]. Различия считали достоверным при 95 % уровне надежности (p ≤ 0,05).

Результаты и обсуждение

С 2008 г. нами было протестировано более 200 химических соединений – конденсированных производных пирролидин-2,5-диона, а также их предшественников и ближайших аналогов, синтезированных в НИОХ им. Н.Н.Ворожцова СО РАН, на наличие противовирусной активности в отношении ортопоксвирусов. На первом этапе работы была исследована противовирусная активность препаратов НИОХ в отношении суррогатных ортопоксвирусов (вирусов осповакцины, оспы коров и оспы мышей – экстремелии) в культуре клеток Vero в сравнении с активно-

Таблица 1

Показатели тестирования противовирусной активности препаратов НИОХ и ST-246 в отношении суррогатных ортопоксвирусов в культуре клеток Vero

Препараты	ТС ₅₀ (мкг/мл)	IC ₅₀ (мкг/мл) в отношении вирусов:			ТИ (IS) (ТС ₅₀ /IC ₅₀)
		осповакцины	оспы коров	экстремелии	
НИОХ-3	>100	0,616	3,06	1,237	>160
НИОХ-4	>100	0,033	0,115	0,040	>3000
НИОХ-14	>100	0,001	0,051	0,011	>100000
НИОХ-32	>100	0,004	0,015	0,054	>25000
НИОХ-59	46,7	0,200	1,330	0,556	230
НИОХ-80	20,6	0,003	0,016	0,005	6800
НИОХ-91	16,8	0,014	0,270	0,076	1200
НИОХ-92	>100	0,003	0,520	0,114	>33000
НИОХ-98	100	0,026	0,650	0,144	3800
НИОХ-152	85,1	0,390	2,160	0,780	>200
НИОХ-162	>100	0,175	1,520	0,440	>570
НИОХ-173	>100	0,527	1,470	1,080	>180
ST-246	>100	0,001	0,002	0,003	>100000

Примечание. ТС₅₀ – токсическая концентрация препарата; IC₅₀ – ингибирующая концентрация препарата; ТИ (IS) – терапевтический индекс (индекс селективности) препарата; приведено максимальное значение ТИ.

Таблица 2

Показатели тестирования противовирусной активности препаратов НИОХ и ST-246 в отношении штамма V79-1-005 вируса оспы обезьян в культуре клеток Vero

Препараты	ТС ₅₀ (мкг/мл)	IC ₅₀ (мкг/мл)	ТИ (IS) (ТС ₅₀ /IC ₅₀)
НИОХ-3	>100	0,165	>600
НИОХ-4	>100	0,077	>1200
НИОХ-14	>100	0,013	>7700
НИОХ-32	>100	0,153	>650
НИОХ-59	46,7	0,209	220
НИОХ-80	20,6	0,004	>5000
НИОХ-91	16,8	0,021	800
НИОХ-92	>100	0,02	>5000
НИОХ-98	100	0,245	>400
НИОХ-152	85,1	0,468	>180
НИОХ-162	>100	0,324	>300
НИОХ-173	>100	0,185	>540
ST-246	>100	0,001	>100000

Примечание. ТС₅₀ – токсическая концентрация препарата; IC₅₀ – ингибирующая концентрация препарата; ТИ (IS) – терапевтический индекс (индекс селективности) препарата.

стью ST-246 (табл. 1). Было обнаружено, что ряд соединений, таких как НИОХ-4, НИОХ-14, НИОХ-32, НИОХ-80, НИОХ-91 и НИОХ-98, обладает высокой активностью в отношении исследованных вирусов, судя по показателям ТИ (или IS) (табл. 1). На основании полученных данных были выбраны наиболее эффективные соединения для исследования их противовирусной активности в отношении ВОО и ВНО.

В табл. 2 представлены результаты тестирования противовирусной активности препаратов в отношении штамма ВОО V79-1-005 в культуре клеток Vero. Было показано, что исследованные соединения проявляют практически такую же эффективность в отношении ВОО, которая ранее была выявлена в экспериментах с вирусами осповакцины, оспы коров и

эктромелии (табл. 1, 2).

Кроме того, у таких соединений, как НИОХ-4 (4-{3,5-диоксо-4-азатетрацикло[5.3.2.0^{2,6},6.0^{8,10}]додец-11-ен-4-ил}-4-азатетрацикло[5.3.2.0^{2,6},6.0^{8,10}]додец-11-ен-3,5-диона), НИОХ-14 (7-[N'-(4-Трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновая кислота), НИОХ-32 (гидрат N-{3,5-диоксо-4-азатетрацикло[5.3.2.0^{2,6},6.0^{8,10}]додец-11-ен-4-ил}-2-гидроксibenзамид), НИОХ-80 (гидрат 2-гидрокси-N-{3,5-диоксо-4-азатетрацикло[5.3.2.0^{2,6},6.0^{8,10}]додец-11-ен-4-ил}-5-хлорбензамид), НИОХ-92 (2-Гидрокси-N-{3,5-диоксо-4-азатетрацикло[5.3.2.0^{2,6},6.0^{8,10}]додец-11-ен-4-ил}-5-нитробензамид) и НИОХ-98 (2-гидрокси-N-{3,5-диоксо-4-азатетрацикло[5.3.2.0^{2,6},6.0^{8,10}]додец-11-ен-4-ил}-5-метилбензамид), противовирусная эффективность, судя по ТИ (или IS), в отношении ВОО *in vitro* была только в несколько раз ниже, чем у ST-246 (табл. 2).

Изучение противовирусной активности в отношении штаммов ВНО проводили с использованием 8 соединений НИОХ. В табл. 3 представлены результаты тестирования противовирусной активности препаратов в отношении штаммов ВНО *in vitro* (в культуре клеток Vero). Было показано, что эффективность исследованных соединений в отношении штаммов ВНО соответствует ранее обнаруженной в экспериментах *in vitro* с вирусами осповакцины, оспы коров и эктромелии (табл. 1, 3). Кроме того, было обнаружено, что по показателю ТИ (или IS) ряд соединений (НИОХ-4, НИОХ-32, НИОХ-80 и НИОХ-98) были всего в несколько раз менее эффективными в отношении штаммов ВНО *in vitro*, чем ST-246, тогда как НИОХ-14 обладал такой же противооспенной активностью, как ST-246 (табл. 3).

Далее было показано, что при профилактической схеме внесения растворов ST-246 или НИОХ-14 в объеме 0,1 мл (концентрация в среде культивирования = 0,0125 мкг/мл) титры ВЭ были соответствен-

Таблица 3

Показатели тестирования противовирусной активности препаратов НИОХ и ST-246 в отношении штаммов вируса натуральной оспы (ВНО) в культуре клеток Vero

Препараты	ТС ₅₀ (мкг/мл)	IC ₅₀ (мкг/мл) в отношении штаммов ВНО:				ТИ (IS) (ТС ₅₀ /IC ₅₀)
		India-3a	6-58	Congo-9	Butler	
НИОХ-3	>100	0,243	1,190	1,490	1,317	>400
НИОХ-4	>100	0,043	0,146	0,125	0,102	>2300
НИОХ-14	>100	0,001	0,003	0,003	0,002	>100000
НИОХ-32	>100	0,032	0,064	0,078	0,075	>3100
НИОХ-80	20,6	0,009	0,020	0,042	0,014	>2200
НИОХ-91	16,8	0,016	0,011	0,025	0,010	1050
НИОХ-92	>100	0,047	-	-	-	>2120
НИОХ-98	100	0,035	0,026	0,044	0,011	9090
НИОХ-152	85,1	1,460	1,320	4,030	1,410	64
НИОХ-162	>100	0,37	-	-	-	>270
ST-246	>100	0,002	0,004	0,003	<0,001	>100000

Примечание. ТС₅₀ – токсическая концентрация препарата; IC₅₀ – ингибирующая концентрация препарата; ТИ (IS) – терапевтический индекс (индекс селективности) препарата; приведено максимальное значение ТИ.

но ($5,12 \pm 0,07$) и ($5,11 \pm 0,06$) Ig БОЕ/мл и достоверно ниже контроля – ($6,31 \pm 0,11$) Ig БОЕ/мл). При этом ИН для ST-246 был равен 1,19 Ig, а для НИОХ-14 – 1,20 Ig. Однако в лечебной схеме внесения 0,1 мл препаратов ST-246 или НИОХ-14 (концентрация в среде культивирования = 0,0125 мкг/мл) они снижали титр ВЭ относительно контроля ($6,57 \pm 0,09$) Ig БОЕ/мл достоверно – ST-246 – до ($6,03 \pm 0,14$); НИОХ-14 – до ($5,97 \pm 0,12$) Ig БОЕ/мл, но менее эффективно, чем в профилактической схеме. Так, в данной лечебной схеме ИН для ST-246 был равен 0,54 Ig, а для НИОХ-14 – 0,60 Ig.

В лечебно-профилактической схеме внесения растворов ST-246 и НИОХ-14 по 0,1 мл до и после заражения ВЭ при создании их концентрации 0,025 мкг/мл среды культивирования титры ВЭ уменьшались соответственно до ($5,29 \pm 0,09$) и ($5,23 \pm 0,11$) Ig БОЕ/мл относительно контроля ($6,41 \pm 0,13$) Ig БОЕ/мл. При этом ИН для этих препаратов были практически такими же (1,12 и 1,18 Ig), как при их внесении по 0,1 мл в профилактической схеме (0,0125 мкг/мл среды). Это свидетельствует о том, что предварительное проникновение химических соединений ST-246 или НИОХ-14 в клетки-мишени для ВЭ является существенно важным моментом для подавления его инфекционности в культуре клеток Vero.

В том случае, когда при профилактической схеме растворы ST-246 или НИОХ-14 вносили в объеме 0,2 или 0,4 мл (концентрация в среде культивирования = 0,025 или 0,05 мкг/мл) титры ВЭ, даже при концентрации 0,025 мкг/мл, были < 1 Ig БОЕ/мл – контроль ($6,49 \pm 0,01$) Ig БОЕ/мл. При концентрации препаратов 0,05 мкг/мл в профилактической схеме титры ВЭ тоже были < 1 Ig БОЕ/мл, а в контроле – ($6,57 \pm 0,02$) Ig БОЕ/мл. Соответственно ИН для ST-246 и НИОХ-14 были $> 5,49$ и $> 5,57$ Ig. Однако в лечебной схеме внесения препаратов в объеме 0,2 мл (концентрация в среде культивирования = 0,025 мкг/мл) титры ВЭ были существенно ниже, чем в контроле – ($6,50 \pm 0,05$) Ig БОЕ/мл, но выше, чем при профилактическом применении препаратов. Так, при использовании ST-246 в данной лечебной схеме титр ВЭ был равен ($4,39 \pm 0,08$) Ig БОЕ/мл (ИН = 2,11 Ig), а в присутствии НИОХ-14 – ($3,95 \pm 0,07$) Ig БОЕ/мл (ИН = 2,55 Ig).

Следует отметить, что при использовании в лечебной схеме препаратов в концентрации равной 0,025 мкг/мл титры ВЭ были на 2 порядка выше, чем при концентрации 0,05 мкг/мл. В последнем случае, когда в контроле было ($6,61 \pm 0,06$) Ig БОЕ/мл, присутствие ST-246 в концентрации 0,05 мкг/мл снижало титр ВЭ до ($2,35 \pm 0,05$) Ig БОЕ/мл (ИН = 4,26 Ig), а присутствие НИОХ-14 в такой же концентрации – до ($1,99 \pm 0,04$) Ig БОЕ/мл (ИН = 4,62 Ig).

В лечебно-профилактической схеме внесения препаратов ST-246 или НИОХ-14 по 0,2 мл до и после заражения ВЭ при их концентрации в сре-

де культивирования 0,05 мкг/мл титры ВЭ тоже были < 1 Ig БОЕ/мл, а в соответствующем контроле – ($6,45 \pm 0,01$) Ig БОЕ/мл. При этом ИН для обоих препаратов были $> 5,45$ Ig. Полученные результаты дают основание полагать, что НИОХ-14 проявляет *in vitro* сравнимую с ST-246 активность в отношении ортопоксвирусов.

По-видимому, исследованные соединения НИОХ имеют такой же механизм противовирусного действия в отношении ортопоксвирусов, что и американский препарат ST-246, аналогами которого они являются. ST-246[®] или Tecovirimat[™] {4-trifluoromethyl-N-(3,3a,4,4a,5,5a, 6,6a-octahydro-1,3-dioxo-4,6-ethenocycloprop[f]isoindol-2(1H)-yl)-benzamide} разработан компанией SIGA Technologies Inc. по лицензии ViroPharma Inc. (Corvallis, Oregon, США) [9]. Полагают, что ST-246 является ингибитором оболочечного белка р37 ортопоксвирусов и подавляет выход вирионов на поверхность инфицированной клетки за счет воздействия на ортологи белка р37 ортопоксвирусов [4, 5, 13].

Вместе с тем в наших экспериментах показано, что в профилактических схемах воздействия препаратов на инфекционность ВЭ *in vitro* противовирусная эффективность ST-246 и НИОХ-14 была выше, чем при их воздействии на клетки после заражения ВЭ. По-видимому, это обстоятельство объясняет тот факт, что приведенные в нашей работе показатели IC_{50} для ST-246 в отношении ортопоксвирусов были практически на порядок ниже (0,001–0,004 мкг/мл), чем полученные авторами при внесении этого препарата после заражения клеток ортопоксвирусами, в том числе ВОО и ВНО (0,01–0,03 мкг/мл) [9, 11].

Таким образом, проведенные исследования показали, что НИОХ-14, являясь аналогом ST-246, а точнее его предшественником по стадиям синтеза, обладает высокой противовирусной эффективностью *in vitro* в отношении всех исследованных нами ортопоксвирусов, включая ВНО и ВОО. Кроме того, противовирусная активность НИОХ-14 в отношении ортопоксвирусов, в том числе ВОО и ВНО, была сравнима с эффективностью препарата ST-246, разработанного в США, по всем аналогичным исследованным показателям *in vitro*. Это позволяет сделать заключение о перспективности дальнейшего исследования химического соединения НИОХ-14 с целью разработки на его основе нового отечественного противоязвенного препарата.

Кроме того, еще ряд соединений, (НИОХ-32, НИОХ-80, НИОХ-91, НИОХ-92 и НИОХ-98) могут представлять потенциальный интерес для более глубокого и расширенного исследования их противовирусной эффективности в отношении ортопоксвирусов, в том числе ВОО и ВНО.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках государственного контракта № 14.518.11.7035

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика. 1976. 598 с.
2. Селиванов Б.А., Беланов Е.Ф., Бормотов Н.И., Балахнин С.М., Серова О.А., Святченко В.А., Киселев Н.Н., Казачинская Е.И., Локтев В.Б., Тихонов А.Я. Производные трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6,7-дикарбоновой кислоты высокоэффективно ингибируют репликацию различных видов ортопоксвирусов. Докл. Акад. наук. 2011; 441(3):414–8.
3. Baker R.O., Bray M., Huggins J.W. Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections. *Antiviral Research*. 2003; 57(1-2):13–23.
4. Chen Y., Honeychurch K.M., Yang G., Byrd C.M., Harver C., Hruby D.E., Jordan R. Vaccinia virus p37 interacts with host proteins associated with LE-derived transport vesicle biogenesis. *Virology*. 2009; 6:44.
5. Duraffour S., Andrei G., Snoeck R. Tecovirimat, a p37 envelope protein inhibitor for the treatment of smallpox infection. *IDrugs*. 2010; 13(3):181–91.
6. Jordan R., Bailey T.R., Rippin S.R. Compounds, compositions and methods for treatment and prevention of orthopoxvirus infections and associated diseases. WO 2004/112718 A3; 2005.
7. Jordan R., Goff A., Frimm A., Corrado M.L., Hensley L.E., Byrd C.M., Mucker E., Shamblin J., Bolken T.C., Wlazowski C., Johnson W., Chapman J., Twenhafel N., Tyavanagimatt S., Amantana A., Chinsangaram J., Hruby D.E., Huggins J. ST-246 Antiviral Efficacy in a Nonhuman Primate Monkeypox Model: Determination of the Minimal Effective Dose and Human Dose Justification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(5):1817–22.
8. Parker S., Touchette E., Oberle C., Almond M., Robertson A., Trost L.C., Lampert B., Painter G., Buller R.M. Efficacy of therapeutic intervention with an oral ether-lipid analogue of cidofovir (CMX001) in a lethal mousepox model. *Antiviral Research*. 2008; 77(1):39–49.
9. SIGA Technologies Inc. Advisory Committee Briefing Book. Human BioArmor. Background Package for FDA Advisory Committee Meeting on December 14–15, 2011. Vol. 1. 114 p. USA; 2011 [cited 15 May 2012]. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/AntiviralDrugsAdvisoryCommittee/UCM283286.pdf>.
10. Smees D.F., Sidwell R.W. A review of compounds exhibiting anti-orthopoxvirus activity in animal models. *Antiviral Research*. 2003; 57(1–2):41–52.
11. Smith S.K., Olson V.A., Karem K.L., Jordan R., Hruby D.E., Damon I.K. *In Vitro* Efficacy of ST246 against Smallpox and Monkeypox. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(3):1007–12.
12. ST-246 Completely Prevents Mortality in Symptomatic Orthopox Virus Infected Primates. SIGA Technologies, Inc. Press Release. September 26, 2007 [cited 15 May 2012]. Available from: <http://investor.siga.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=286731>.
13. Yang G., Pevear D.C., Davies M.H., Collett M.S., Bailey T., Rippen S., Barone L., Burns C., Rhodes G., Tohan S., Huggins J.W., Baker R.O., Buller R.L.M., Touchette E., Waller K., Schriewer J., Neyts J., DeClercq E., Jones K., Hruby D., Jordan R. An Orally Bioavailable Antipoxvirus Compound (ST-246) Inhibits Extracellular Virus Formation and Protects Mice from Lethal Orthopoxvirus Challenge. *J. Virol.* 2005; 79(20):13139–49.
14. ylic acid inhibit replication of various Orthopoxvirus species to a maximum effect]. *Doklady Akademii Nauk*. 2011; 441(3):414–8.
15. Baker R.O., Bray M., Huggins J.W. Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infections. *Antiviral Research*. 2003; 57(1-2):13–23.
16. Chen Y., Honeychurch K.M., Yang G., Byrd C.M., Harver C., Hruby D.E., Jordan R. Vaccinia virus p37 interacts with host proteins associated with LE-derived transport vesicle biogenesis. *Virology*. 2009; 6:44.
17. Duraffour S., Andrei G., Snoeck R. Tecovirimat, a p37 envelope protein inhibitor for the treatment of smallpox infection. *IDrugs*. 2010; 13(3):181–91.
18. Jordan R., Bailey T.R., Rippin S.R. Compounds, compositions and methods for treatment and prevention of orthopoxvirus infections and associated diseases. WO 2004/112718 A3; 2005.
19. Jordan R., Goff A., Frimm A., Corrado M.L., Hensley L.E., Byrd C.M., Mucker E., Shamblin J., Bolken T.C., Wlazowski C., Johnson W., Chapman J., Twenhafel N., Tyavanagimatt S., Amantana A., Chinsangaram J., Hruby D.E., Huggins J. ST-246 Antiviral Efficacy in a Nonhuman Primate Monkeypox Model: Determination of the Minimal Effective Dose and Human Dose Justification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(5):1817–22.
20. Parker S., Touchette E., Oberle C., Almond M., Robertson A., Trost L.C., Lampert B., Painter G., Buller R.M. Efficacy of therapeutic intervention with an oral ether-lipid analogue of cidofovir (CMX001) in a lethal mousepox model. *Antiviral Research*. 2008; 77(1):39–49.
21. SIGA Technologies Inc. Advisory Committee Briefing Book. Human BioArmor. Background Package for FDA Advisory Committee Meeting on December 14–15, 2011. Vol. 1. 114 p. USA; 2011 [cited 15 May 2012]. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/AntiviralDrugsAdvisoryCommittee/UCM283286.pdf>.
22. Smees D.F., Sidwell R.W. A review of compounds exhibiting anti-orthopoxvirus activity in animal models. *Antiviral Research*. 2003; 57(1–2):41–52.
23. Smith S.K., Olson V.A., Karem K.L., Jordan R., Hruby D.E., Damon I.K. *In Vitro* Efficacy of ST246 against Smallpox and Monkeypox. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(3):1007–12.
24. ST-246 Completely Prevents Mortality in Symptomatic Orthopox Virus Infected Primates. SIGA Technologies, Inc. Press Release. September 26, 2007 [cited 15 May 2012]. Available from: <http://investor.siga.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=286731>.
25. Yang G., Pevear D.C., Davies M.H., Collett M.S., Bailey T., Rippen S., Barone L., Burns C., Rhodes G., Tohan S., Huggins J.W., Baker R.O., Buller R.L.M., Touchette E., Waller K., Schriewer J., Neyts J., DeClercq E., Jones K., Hruby D., Jordan R. An Orally Bioavailable Antipoxvirus Compound (ST-246) Inhibits Extracellular Virus Formation and Protects Mice from Lethal Orthopoxvirus Challenge. *J. Virol.* 2005; 79(20):13139–49.

References

1. Zaks L. [Statistical Evaluation]. M.: Statistika. 1976. 598 p.
2. Selivanov B.A., Belanov E.F., Bormotov N.I., Balakhin S.M., Serova O.A., Svyatchenko V.A., Kiselev N.N., Kazachinskaya E.I., Loktev V.B., Tikhonov A.Ya. [Derivatives of the tricyclo[3.2.2.0^{2,4}]non-8-EN-6,7 dicarbox-

Authors:

Kabanov A.S., Sergeev A.I.A., Bulychev L.E., Bormotov N.I., Shishkina L.N., Sergeev Ar.A., Bodnev S.A., Skarnovich M.O., Shevtsov A.R., Agafonov A.P., Sergeev A.N. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Selivanov B.A., Tikhonov A.Ya. Novosibirsk N.N.Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry, RAS SB. 9, Lavrent'eva St., Novosibirsk, 630090, Russian Federation. E-mail: seliboba@nioch.nsc.ru

Об авторах:

Кабанов А.С., Сергеев А.А., Булычев Л.Е., Бормотов Н.И., Шишкина Л.Н., Сергеев Ар.А., Боднев С.А., Скарнович М.О., Шевцов А.Р., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл, п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Селиванов Б.А., Тихонов А.Я. Новосибирский институт органической химии им. Н.Н.Ворожцова СО РАН. Российская Федерация, 630090, Новосибирск, ул. Лаврентьева, 9. E-mail: seliboba@nioch.nsc.ru

Поступила 13.09.12.