

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-183

**НОВЫЙ ИНГИБИТОР НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА —  
6-ЗАМЕЩЕННОЕ ПРОИЗВОДНОЕ ПУРИНА \*****NEW 6-SUBSTITUTED PURINE DERIVATIVE AS INFLUENZA VIRUS NEURAMINIDASE INHIBITOR**Я. Л. Есаулкова<sup>1</sup>, В. В. Зарубаев<sup>1</sup>, Е. Н. Чулаков<sup>2</sup>, В. П. Краснов<sup>2</sup><sup>1</sup>Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера<sup>2</sup>Институт органического синтеза им. Постовского УрО РАН, ЕкатеринбургI. L. Esaulkova<sup>1</sup>, V. V. Zarubaev<sup>1</sup>, E. N. Chulakov<sup>2</sup>, V. P. Krasnov<sup>2</sup><sup>1</sup>Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg<sup>2</sup>Postovsky Institute of Organic Synthesis UB RAS, Yekaterinburg

✉ IanaEsaulkova@gmail.com

**Аннотация**

Вирус гриппа вызывает респираторную инфекцию, распространение которой ведет к возникновению ежегодных эпидемий. В эпидемическом процессе принимают участие вирусы гриппа одного из двух типов: А или В. Чтобы избежать появления новых штаммов вируса, резистентных ко всем доступным препаратам, необходима разработка новых противовирусных препаратов. В данном исследовании был расшифрован механизм противогриппозного действия нового производного пурина.

**Abstract**

Influenza virus causes a respiratory infection, which leads to annual epidemics. One of two influenza virus types takes part in the epidemic process: type A or type B. To avoid the emergence of new strains of the virus that are resistant to all available drugs, the development of new antiviral drugs is necessary. In this study, the mechanism of the anti-influenza activity of a new purine derivative was deciphered.

**Цель** исследования — поиск вирусной мишени нового класса противогриппозных препаратов — 6-замещенных производных пурина.

**Материалы и методы**

В работе были использованы новые производные пурина, синтезированные в Институте органического синтеза им. Постовского УрО РАН. В исследование вошла рацемическая смесь двух энантиомеров 6-замещенного производного пурина и каждый из энантиомеров по отдельности. Противовирусная активность соединений была показана нами в более ранних исследованиях.

В экспериментах использовали два вируса гриппа: вирус гриппа типа А, штамм А/Puerto Rico/8/34 (H1N1), и вирус гриппа типа В, В/Malaysia/2506/04 (Victoria lineage). Исследование проводили с использованием клеточной культуры, перmissive по отношению к вирусам гриппа — MDCK (клетки почки собаки Мадин-Дарби).

Для выявления стадии репликативного цикла вируса, на которой соединение воздействует на вирус, проводили тест на время добавления. Для этого клетки рассеивали на 24-луночные и 96-луночные планшеты. Клетки в 24-луночных планшетах заражали одинаковой дозой вируса гриппа А/Puerto Rico/8/34 (H1N1), после чего добавляли к клеткам в разных лунках препарат в соответствующих временных точках: за час до заражения, одновременно с заражением, через 2, 4 и 6 ч после заражения. В норме на 8 ч после заражения репликативный цикл вируса гриппа заканчивается выходом из клеток вирусного потомства, поэтому, чтобы зафиксировать наличие и количество новых вирионов, через 8 ч после заражения из лунок отбирали супернатант. Полученные пробы титровали в 96-луночных планшетах с клетками, титры вируса в пробах сравнивали с пробой из контрольной лунки, в которую препарат не добавляли.

Для выявления вирусного белка, который мог бы являться мишенью препарата, было проведен флюоресцентный тест с использованием реагента MUNANA [1], с помощью которого можно оценить наличие у соединений способности ингибировать вирусную нейраминидазу (NA). Принцип теста заключается в том, что NA расщепляет 2'-(4-метилумбеллиферил)- $\alpha$ -D-N-ацетилнейраминовою кислоту (MUNANA) с высвобождением флуоресцентного

\* Исследование выполнено в рамках гос. задания Министерства науки и высшего образования РФ (темы № 121030200272-6, 124020200038-6 и 124020500044-4).

© Я. Л. Есаулкова, В. В. Зарубаев, Е. Н. Чулаков, В. П. Краснов, 2024

продукта. Воздействие ингибитора на NA вируса гриппа определяют на основе 50 % ингибирующей концентрации ( $IC_{50}$ ) — концентрации ингибитора NA, необходимой для снижения 50 % активности NA [2]. Для данного теста использовали вирусы гриппа двух типов: А и В.

### Результаты и обсуждение

На каждой стадии жизненного цикла вируса задействованы конкретные вирусные белки, поэтому по результатам теста на время добавления можно предположить, какой из них ингибируется препаратом. В случае исследованных соединений вне зависимости от времени добавления препарата титр вируса снижался с 6–7 до 3,5–5,5 lgTCID<sub>50</sub>, что говорит об активности препаратов вплоть до последних стадий репликативного цикла вируса. На заключительном этапе жизненного цикла вируса задействована NA — белок вируса гриппа, обеспечивающий отпочковывание вирионов, поэтому, предположительно, препарат воздействует на активность именно этого белка.

Чтобы подтвердить ингибирующую активность соединений против вирусной NA, их протестировали с помощью флуоресцентного теста MUNANA. Было показано, что ингибирующие NA свойства проявляют рацемат CEN-1530 ( $IC_{50}$  = 26 мг/мл против A/Puerto Rico/8/34, против  $IC_{50}$  = 83 мг/мл B/Malaysia/2506/04) и один из энантиомеров CEN-1614 ( $IC_{50}$  = 18 мг/мл против A/Puerto Rico/8/34,  $IC_{50}$  = 57 мг/мл против B/Malaysia/2506/04), в то время как энантиомер CEN-1604 оказался не активен против NA ( $IC_{50}$  > 300 мг/мл против A/Puerto Rico/8/34 и против B/Malaysia/2506/04). Из этих данных следует, что антинейраминидазную активность проявляет только энантиомер CEN-1614. Это подтверждается не только отсутствием активности CEN-1604, но и почти двукратным снижением  $IC_{50}$  при выделении CEN-1614 из рацемической смеси.

### Выводы

Новые 6-замещенные производные пурина проявляют активность на поздних стадиях репликативного цикла вируса гриппа. Один из энантиомеров рацемической смеси воздействует напрямую на NA вирусов гриппа А и В.

### Литература

1. Potier M., Mameli L., Bélisle M. et al. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -d-N-acetylneuraminate) substrate // *Anal. Biochem.* 1979. Vol. 94. P. 287–296.
2. Leang S. K., Hurt A. C. Fluorescence-based Neuraminidase Inhibition Assay to Assess the Susceptibility of Influenza Viruses to The Neuraminidase Inhibitor Class of Antivirals // *J. Visualized Exp.* Vol. 122. 55570.