

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Заремба Поліна Юріївна

УДК: 578:577:615.1

ДИСЕРТАЦІЯ

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ АНАЛІЗ НОВИХ АНТИВІРУСНИХ
АГЕНТІВ НАЦІЛЕНИХ НА ВІРУС ГРИПУ ТИПУ А**

091 – Біологія та біохімія

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Заремба П.Ю.

Науковий керівник: Загородня Світлана Дмитрівна, кандидат біологічних наук,
старший дослідник



Київ – 2026

АНОТАЦІЯ

Заремба П.Ю. Структурно-функціональний аналіз нових антивірусних агентів націлених на вірус грипу типу А. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія». – Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ, 2026 р.

Вірус грипу типу А (IAV), маючи високий пандемічний потенціал та мутаційну непередбачуваність, є серйозною світовою проблемою сфер охорони здоров'я та економіки. Вакцинація як найкращий спосіб профілактики наразі не сягає достатніх рівнів охоплення для створення надійного захисту осіб, що належать до груп ризику. Що ж стосується наявних на сучасному фармацевтичному ринку протигрипозних препаратів, то вони насправді обмежені лише до інгібіторів нейрамінідази та РНК-залежної РНК полімерази (RdRp). Крім того вони мають вузьке терапевтичне вікно, що зменшує їх ефективність для госпіталізованих пацієнтів з тяжкою формою інфекції або ускладненнями.

Відкриття високо активної антиретровірусної терапії за рахунок комбінації препаратів з різними мішенями дії змінило світове уявлення про противірусну терапію загалом. Для лікування вірусів грипу також було продемонстровано синергетичний ефект поєднання інгібіторів нейрамінідази та полімерази, що, крім того, значно знижує поширення резистентних штамів. Проте для повноцінного впровадження такого підходу необхідна велика кількість препаратів, націлених на різні етапи життєвого циклу, а саме на розпізнавання клітинних рецепторів, злиття мембран, синтез білків, збирання віріонів та позаклітинний вірус як окремий етап, а не тільки на реплікацію та вихід з клітини.

Відповідно, метою даної роботи був скринінг нових противірусних агентів, направлених на різні етапи репродукції штаму H1N1 вірусу грипу типу А. Для цього було використано міні бібліотеку із 17 синтетичних органічних сполук, а також

проаналізовано потенціал кількох груп наноструктур. Усі агенти були оцінені зі сторони безпечності їхнього застосування, ефективності у пригніченні репродукції вірусу грипу та потенційного механізму дії. Аналіз був проведений з використанням класичних вірусологічних методів, а також ряду розрахункових експериментів, що включали прогнозування параметрів фармакодинаміки і фармакокінетики (ADMET) та симуляцію молекулярної динаміки ліганд-рецепторних комплексів.

Усі досліджувані в роботі органічні сполуки були створені на основі популярних у медичній хімії скефолдів з добре вивченими властивостями та доступними способами синтезу, проте сама структура молекул є оригінальною. Найбільш унікальною групою сполук були флуоровмісні β -N-бензотіазоліл глікозиди, оскільки N-глікозильовані похідні бензотіазолу зустрічаються вкрай рідко. Завдяки структурній подібності представників даної групи (кодові назви речовин: 10S-52, 10S-53, 10S-54 та 10S-55) до пуринових нуклеозидів, їх противірусна активність була оцінена за впливом на реплікацію IAV H1N1 в культурі клітин MDCK. Лише одна сполука (10S-54) продемонструвала незначне пригнічення вірусної репродукції *in vitro*, а також проявила деякий рівень спорідненості до кеп-зв'язуючої ділянки (CBD) субодиниці PB2 RdRp. Враховуючи параметри ADMET та проявлену біологічну активність, 10S-54, як представник унікальних β -N-бензотіазоліл глікозидів, є вартим уваги з точки зору розробки протигрипозних агентів, з урахуванням подальших модифікацій молекули для покращення ефективності.

Наступна група досліджуваних органічних сполук була представлена галогеновмісними [1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензімідазолами: 2618, 1792, 1752, 1790, 1634, 1870, 1796 та 1782. Зважаючи на структурну подібність до пуринових нуклеозидів, противірусна активність даних речовин була оцінена зі сторони впливу на реплікацію IAV H1N1. Серед 8 представників, лише 4 проявили ефект на перебіг інфекції в клітинах, водночас, більшість мали флуор у складі галогенометильної групи та $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ у положенні 4 гетероциклу. Максимальні значення

антивірусної активності сягали близько 75%, і проявлений вплив також супроводжувався зниженням інфекційності вірусного потомства. При порівнянні напівмаксимальної цитотоксичної концентрації (CC_{50}) активних сполук та референс-препарату озельтамівіру, було відмічено, що [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензімідазоли є загалом у кілька разів більш токсичними. Це також підтверджується прогнозованими параметрами ADMET. Проте за оцінкою індексів селективності (SI), сполуки 1870 та 1796 проявили достатній рівень ефективності, щоб мати потенціал для подальших досліджень. В симуляційному експерименті було продемонстровано, що ймовірною мішенню дії сполук даної групи є CBD PB2 RdRp.

Ще одну групу аналогів нуклеозидів серед досліджуваних синтетичних органічних сполук представили флуоровмісні похідні тетрагідротіофену (10S-45, 10S-46, 10S-48 та 10S-49). Серед них 10S-46 та 10S-48 є тіонуклеозидами з тетрагідропіримідин-2,4-діоном у складі. За результатами дослідження впливу на реплікацію IAV, усі сполуки, крім 10S-49, пригнічували реплікацію вірусу з максимальними значеннями 70-78% інгібування. Серед них 10S-48 виявилась найбільш селективною. Також варто зазначити, що 10S-45 та 10S-46 були надані у вигляді стереомерів, що пояснює вищу ефективність 10S-48. З точки зору цитотоксичності та прогнозованих параметрів фармакокінетики, усі активні представники даної групи мали задовільні характеристики. За результатами симуляції молекулярної динаміки 10S-48 та 10S-46 продемонстрували високу спорідненість до CBD PB2 RdRp вірусу грипу, натомість, 10S-45 покинула сайт взаємодії. Таким чином, визначені в рамках даної роботи аналоги нуклеозидів мають значний потенціал.

Останнім представником міні бібліотеки органічних сполук був біс(5-дифлуорометил-2-(тетрагідропіран-2-іл)-2H-1,2,3-тріазол-4-іл)-сульфон або 10S-47. Дана сполука продемонструвала помірний цитотоксичний вплив на клітини, прийнятний ADMET-профіль та високий протигрипозний ефект з піком у 76,3%

активності. Зважаючи на те, що триазол-вмісні сполуки виступають в ролі інгібіторів вірусних полімераз, шляхом симуляційного експерименту було перевірено можливість 10S-47 до взаємодії з CBD PB2 RdRp. Результати розрахункового дослідження вказують на низьку ймовірність такої взаємодії, а отже на інший механізм дії. Припускається, що 10S-47 може мати потенціал до взаємодії з неструктурним білком IAV – NS1.

Підсумовуючи, в результаті пошуку серед синтетичних органічних речовин, було ідентифіковано 9 активних агентів та відібрано 5 сполук-хітів: два [1,2,6]тіадіазино[2,3-а]бензимидазоли 1870 і 1796; 10S-47 та два похідних тетрагідротіофену 10S-45 та 10S-46. Серед останніх також ідентифіковано тіонуклеозид-лід 10S-48 як найбільш перспективний кандидат для подальших доклінічних випробувань. Крім того, вперше показано потенціал β -N-бензотіазоліл глікозидів впливати на вірусну реплікацію.

Друга частина роботи була присвячена пошуку противірусних агентів серед наноструктур, а саме полігідратованих фулеренів (фулеренолів), наночастинок (НЧ) срібла та полімерних срібловмісних композитів.

В рамках даної роботи було досліджено суміш фулеренолів $C_n(OH)_{40}$ з масовим співвідношенням $>86\%$ класичних C_{60} та C_{70} та $\approx 14\%$ C_{76-86} і $C_{>86}$ на різних етапах репродукції IAV H1N1. Фулереноли продемонстрували високу ефективність у протидії вірусній адсорбції, реплікації, збиранні і виході віріонів з клітини та інактивації позаклітинного IAV, включно з новосинтезованим поколінням. Антивірусна активність суміші сягала 100% залежно від концентрації та схеми застосування. Механізм їхньої дії може бути обумовлений взаємодією з ліпідними мембранами вірусу та клітини. Останнє підтверджується морфологічними змінами клітин MDCK під час визначення цитотоксичності. На користь взаємодії фулеренолів з оболонкою IAV свідчить їхня віруліцидна активність, а також проведена симуляція молекулярної динаміки $C_{60}(OH)_{40}$ з фрагментом ліпідного бішару IAV H1N1, під час якої спостерігалась деформація останнього. Крім того,

було перевірено здатність фулеренулу C_{60} до взаємодії з RdRp IAV. Під час симуляційного експерименту він блокував ділянку, що бере участь у взаємодії петлі 5'-промотору РНК з RdRp. Це може бути ще одним механізмом впливу фулеренолів на процес репродукції вірусу.

Також в рамках даної роботи було продемонстровано активність суміші фулеренолів відносно клінічних вірусів грипу – IAV H1N1 pdm09 і IBV лінії Вікторія, та проведене дослідження гострої токсичності на мишах BALB/C. Останнє вказує на безпечність одноразової дози, адже жодна тварина не проявила ознак інтоксикації. Враховуючи ці дані, низьку цитотоксичність та комплексну дію на різні етапи репродукції вірусу, суміш фулеренолів має дуже високий потенціал для застосування у якості протигрипозних агентів.

Наступна група наноструктур була представлена НЧ срібла різного діаметру, а саме Ag10 (більшість 8-10 нм), Ag20 (10-20 нм) та Ag50 (40-50 нм). При дослідженні біологічних властивостей, дані НЧ продемонстрували відсутність цитотоксичності та противірусний вплив на IAV H1N1 за профілактичною схемою внесення (за 24 год до початку інфекції). Інтенсивність прояву антивірусного ефекту корелювала з розміром НЧ, адже найбільш активними були Ag10 та Ag20, в той час як вплив Ag50 не перевищував 7% пригнічення. Продемонстровані залежність від розміру та профілактичний ефект корелюють з існуючими літературними даними, які вказують на можливість активації генів, індукованих інтерфероном, НЧ срібла.

Остання група досліджених наноструктур була представлена срібловмісними нанокompозитами у вигляді плівок на основі поліелектролітного комплексу хітозан- Na -карбоксиметилцелюлоза. Особливістю даних зразків є отримання НЧ срібла методом зеленого синтезу з використанням природних екстрактів. Залежно від типу екстракту, було отримано НЧ різного розміру від 11 до 44 нм. Дані композити та їх окремі компоненти були досліджені з точки зору їх впливу на позаклітинний вірус. Результати експерименту демонструють, що тільки срібловмісний композит, отриманий з використанням екстракту зеленого чаю, проявив віруліцидний ефект на

IAV H1N1. Крім того, спостерігали повну втрату інфекційності вірусу, навіть при повторному використанні композиту. Враховуючи відсутність цитотоксичності, проявлений ефект відкриває потенціал дослідженого срібловмісного нанокompозиту для практичного застосування.

Таким чином, в результаті пошуку серед наноструктур, було вперше встановлено комплексний протівірусний ефект суміші полігідратованих фулеренів на різні етапи життєвого циклу вірусу грипу. Продемонстровано здатність НЧ срібла діаметром <math><20\text{ нм}</math> до активації механізмів вродженого клітинного імунітету. Та вперше показано ефективність НЧ срібла у складі композитів на основі хітозану та Na-карбоксиметилцелюлози, синтезованих з використанням рослинних екстрактів, у зниженні інфекційності позаклітинного вірусу. Серед наноструктур відібрано кандидати з перспективою впровадження їх для застосування в якості дезінфікуючих та профілактичних засобів, а саме у якості інтраназальних спреїв, інгаляцій, покриття для медичних масок або HEPA фільтрів та гідрогелевих пов'язок на основі хітозану для дезінфекції та прискорення загоєння пошкоджень шкіри.

Ключові слова: віруси, грип, інфекція, антивірусна активність, віруліцидна активність, цитотоксичність, клітинні культури, токсичність, наночастинки, вуглецеві наноматеріали, фторовані сполуки, мишача модель, молекулярний докінг.

ABSTRACT

Zaremba P.Yu. Structural and functional analysis of new antiviral agents targeting influenza A virus. – Qualification scientific work in the form of a manuscript.

The thesis for the degree of Doctor of Philosophy in specialty 091 “Biology and Biochemistry”. – D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine, Kyiv, 2026.

Influenza A virus (IAV), with its high pandemic potential and mutational unpredictability, is a serious global health and economic problem. Vaccination as the best method of prevention does not currently reach sufficient coverage levels to provide reliable protection for individuals at risk. As for the anti-influenza drugs currently available on the pharmaceutical market, they are actually limited to neuraminidase and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibitors. In addition, they have a narrow therapeutic window, which reduces their effectiveness for hospitalized patients with severe infection or complications.

The discovery of highly active antiretroviral therapy through a combination of drugs with different targets of action has changed the world's understanding of antiviral therapy in general. For the treatment of influenza viruses, a synergistic effect of a combination of neuraminidase and polymerase inhibitors has also been demonstrated, which, in addition, significantly reduces the spread of resistant strains. However, for the full implementation of such an approach, a large number of drugs are needed, targeting different stages of the life cycle, namely, recognition of cellular receptors, membrane fusion, protein synthesis, virion assembly, and extracellular virus as a separate stage, and not only replication and budding from the cell.

Accordingly, the aim of this work was the search for new antiviral agents aimed at different stages of IAV H1N1 reproduction. For this purpose, a mini-library of 17 synthetic organic compounds was used, and the potential of several groups of nanostructures was analyzed. All agents were evaluated in terms of their safety of use, effectiveness in inhibiting influenza virus reproduction and potential mechanism of action.

The analysis was carried out using classical virological methods, as well as a number of computational experiments, including prediction of pharmacodynamics and pharmacokinetics parameters (ADMET) and molecular dynamics simulation of ligand-receptor complexes.

All studied organic compounds were created on the basis of popular medicinal chemistry scaffolds with well-studied properties and accessible synthesis methods, however, the molecular structure itself was original. The most unique group of compounds were fluorine-containing β -N-benzothiazolyl glycosides, since N-glycosylated benzothiazole derivatives are extremely rare. Due to the structural similarity of representatives of this group (code names of substances: 10S-52, 10S-53, 10S-54 and 10S-55) to purine nucleosides, their antiviral activity was assessed by the effect on IAV H1N1 replication in MDCK cell culture. Only one compound (10S-54) demonstrated a slight inhibition of viral reproduction *in vitro*, and also showed some level of affinity for the cap-binding domain (CBD) of the PB2 RdRp. Considering the ADMET parameters and the demonstrated biological activity, 10S-54, as a representative of unique β -N-benzothiazolyl glycosides, is worthy of attention from the point of view of developing anti-influenza agents, taking into account further modifications of the molecule to improve efficacy.

The next group of studied organic compounds was represented by halogen-containing [1,2,6]thiadiazino-[2,3a]benzimidazoles: 2618, 1792, 1752, 1790, 1634, 1870, 1796 and 1782. Given the structural similarity to purine nucleosides, the antiviral activity of these substances was evaluated as the effect on IAV H1N1 replication. Among the 8 representatives, only 4 showed an effect on the course of infection in cells, while most had fluorine in the halomethyl group and $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ in position 4 of the heterocycle. The maximum values of antiviral activity reached about 75%, and the effect was also accompanied by a decrease in the infectivity of viral progeny. When comparing the half-maximal cytotoxic concentration (CC_{50}) of the active compounds and the reference drug oseltamivir, it was noted that [1,2,6]thiadiazino-[2,3a]benzimidazoles are generally

several times more toxic. This is also confirmed by the predicted ADMET parameters. However, according to the assessment of selectivity indices (SI), compounds 1870 and 1796 showed a sufficient level of efficacy to have the potential for further studies. In a simulation experiment, it was demonstrated that the probable target of action of the compounds of this group is CBD PB2 RdRp.

Another group of nucleoside analogues among the studied synthetic organic compounds was represented by fluorine-containing derivatives of tetrahydrothiophene (10S-45, 10S-46, 10S-48 and 10S-49). Among them, 10S-46 and 10S-48 are thionucleosides with tetrahydropyrimidine-2,4-dione in the composition. According to the results of the study of the effect on IAV replication, all compounds, except 10S-49, suppressed the reproduction of the virus with maximum values of 70-78% inhibition. Among them, 10S-48 turned out to be the most selective. It is also worth noting that 10S-45 and 10S-46 were provided in the form of stereomers, which explains the higher efficiency of 10S-48. In terms of cytotoxicity and predicted pharmacokinetic parameters, all active representatives of this group had satisfactory characteristics. According to the results of molecular dynamics simulations, 10S-48 and 10S-46 demonstrated high affinity for the CBD of the PB2, while 10S-45 left the interaction site. Thus, the nucleoside analogs identified in this work have significant potential.

The last representative of the mini library of organic compounds was bis(5-difluoromethyl-2-(tetrahydropyran-2-yl)-2H-1,2,3-triazol-4-yl)-sulfone or 10S-47. This compound demonstrated a moderate cytotoxic effect on cells, an acceptable ADMET profile and a high anti-influenza effect with a peak of 76.3% inhibition. Given that triazole-containing compounds act as inhibitors of viral polymerases, the possibility of 10S-47 interacting with the CBD of RdRp PB2 was tested by a simulation experiment. The results of the computational study indicate a low probability of such an interaction, and therefore a different mechanism of action. It is assumed that 10S-47 may have the potential to interact with the non-structural protein of IAV – NS1.

In summary, as a result of the search among synthetic organic substances, 9 active

agents were identified and 5 hit compounds were selected: two [1,2,6]thiadiazino[2,3-a]benzimidazoles 1870 and 1796; 10S-47 and two tetrahydrothiophene derivatives 10S-45 and 10S-46. Among the latter, thionucleoside-lead 10S-48 was also identified as the most promising candidate for further preclinical testing. In addition, the potential of β -N-benzothiazolyl glycosides to affect viral replication was shown for the first time.

The second part of the research was devoted to the search for antiviral agents among nanostructures, namely polyhydrated fullerenes (fullerenols), silver nanoparticles (NPs) and polymeric silver-containing composites.

In the framework of this work, a mixture of fullerenols $C_n(OH)_{40}$ with a mass ratio of >86% classical C_{60} and C_{70} and $\approx 14\%$ C_{76-86} and $C_{>86}$ was studied at different stages of IAV H1N1 reproduction. Fullerenols demonstrated high efficiency in counteracting viral adsorption, replication, assembly and budding of virions from the cell as well as inactivation of extracellular IAV, including the newly synthesized progeny. The activity of the mixture reached 100% depending on the concentration and application scheme. The mechanism of their action may be due to the interaction with the lipid membranes of the virus and the cell. The latter is confirmed by the morphological changes of MDCK cells during the determination of cytotoxicity. In favor of the interaction of fullerenols with the IAV envelope, their virucidal activity is evidenced, and a molecular dynamics simulation of $C_{60}(OH)_{40}$ with a fragment of the IAV H1N1 lipid bilayer was also performed, during which the deformation of the latter was observed. In addition, the ability of fullereneol C_{60} to interact with the IAV RdRp was tested. During the simulation experiment, it blocked the site involved in the interaction of the 5'-promoter RNA loop with RdRp. This may be another mechanism of the effect of fullerenols on the process of virus reproduction.

Also within the framework of this work, the activity of the fullereneol mixture was demonstrated against clinical influenza viruses – IAV H1N1pdm09 and IBV Victoria, and an acute toxicity study was conducted on BALB/C mice. The latter indicates the safety of a single dose, since no animal showed signs of intoxication. Given these data, low cytotoxicity and complex effect on various stages of virus reproduction, the fullereneol

mixture has a very high potential for use as anti-influenza agents.

The next group of nanostructures was represented by silver NPs of different diameters, namely Ag10 (mostly 8-10 nm), Ag20 (10-20 nm) and Ag50 (40-50 nm). When studying the biological properties, these NPs demonstrated the absence of cytotoxicity and antiviral effect on IAV H1N1 according to the prophylactic administration scheme (24 h before the onset of infection). The intensity of the manifestation of the antiviral effect correlated with the size of the NPs, since the most efficient were Ag10 and Ag20, while the activity of Ag50 did not exceed 7%. The demonstrated size dependence and prophylactic effect correlate with existing literature data indicating the possibility of activation of interferon-induced genes by silver NPs.

The last group of studied nanostructures was represented by silver-containing nanocomposites in the form of films based on the polyelectrolyte complex chitosan-Na-carboxymethylcellulose. A special feature of these samples is the production of silver NPs by the method of green synthesis using natural extracts. Depending on the type of extract, NPs of different sizes from 11 to 44 nm were obtained. These composites and their individual components were studied from the point of view of their effect on the extracellular virus. The experimental results demonstrate that only the silver-containing composite obtained using green tea extract exhibited virucidal effect on IAV H1N1. In addition, a complete loss of virus infectivity was observed, even with repeated use of the composite. Given the lack of cytotoxicity, the effect demonstrated opens up the potential of the studied silver-containing nanocomposite for practical application.

Thus, as a result of the research among nanostructures, the complex antiviral effect of a mixture of polyhydrated fullerenes on different stages of the influenza virus life cycle was established for the first time. The ability of silver NPs with a diameter of <20 nm to activate the mechanisms of innate cellular immunity was demonstrated. And for the first time, the effectiveness of silver NPs in composites based on chitosan and Na-carboxymethylcellulose synthesized using plant extracts, in reducing the infectivity of the extracellular virus was shown. Among the nanostructures, candidates were selected with

the prospect of introducing them for use as disinfectants and prophylactic agents, namely as intranasal sprays, inhalations, coatings for medical masks or HEPA filters and chitosan-based hydrogel dressings for disinfection and accelerated healing of skin lesions.

Key words: viruses, influenza, infection, antiviral activity, virucidal activity, cytotoxicity, cell cultures, toxicity, nanoparticles, carbon nanomaterials, fluorinated compounds, mouse model, molecular docking.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові статті за основною темою наукової роботи

(* – особистий внесок здобувачки)

1. Demchenko, V., Zaremba, P., Rybalchenko, N., Zahorodnia, S., Artiukh, L., Rybalchenko, T., Demchenko, O., Sytnyk, I., Zeng, D., Kobylinskyi, S., Goncharenko, L., and Iurzhenko, M. (2025). Structural peculiarities of the silver-containing nanocomposites based on carboxymethyl cellulose-chitosan polyelectrolyte complexes and their antimicrobial and antiviral applications. *Scientific reports*, 15(1), 35087. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-18932-9>. (*виконано дослідження протівірусної активності відносно вірусу грипу типу А, проаналізовано результати та підготовано їх до публікації)

2. Guzyr, O. I., Potikha, L. M., Shishkina, S. V., Fetyukhin, V. N., Shermolovich, Y. G., Bas, J. P., Kulyk, I. B., Zaremba, P. Y., and Zahorodnia, S. D. (2025). Synthesis, structure, and antiviral activity 4(6)- β -d-glucopyranosylamino-2-R-1,3-benzothiazoles. *Carbohydrate research*, 558, 109700. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2025.109700>. (*виконано дослідження цитотоксичності та протівірусної активності відносно вірусу грипу типу А, проаналізовано результати та підготовано їх до публікації)

3. Zaremba, P., Zaremba, A., Siry, S., and Zahorodnia, S. (2024). Antiviral activity of low-molecular-weight fluorinated compounds against influenza A (H1N1) virus. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*, 86(2), 51-64. <https://doi.org/10.15407/microbiolj86.02.051>. (*виконано всі експериментальні дослідження та їх аналіз, проведено аналіз результатів симуляційних експериментів, підготовано рукопис до публікації)

4. Zaremba, P., Zaremba, A., Naumenko, K., Yelipashev M., and Zahorodnia, S. (2023). In vitro and in silico studies of the antiviral activity of polyhydrated fullerenes against influenza A (H1N1) virus. *Scientific Reports*, 13, 10879. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38128-3>. (*виконано всі експериментальні дослідження та їх аналіз, проведено аналіз результатів симуляційних експериментів, підготовано рукопис до публікації)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

5. Zaremba P., Zaremba A., and Zahorodnia S. Biocompatible polyhydroxylated fullerenes demonstrate complex anti-influenza activity. 13th International Conference "Nanotechnologies and Nanomaterials" NANO-2025, 20-23 August 2025, Bukovel, Ukraine, P.251
6. Заремба П.Ю., Ниженець А.П., Заремба А.А., Загородня С.Д. Інактивуюча дія полігідратованих фулеренів на ліпідну оболонку вірусів. XVI З'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, 2-6 червня 2025, Тернопіль, Україна, С.278
7. Zaremba P., Zaremba A., Zahorodnia S., and Shalimov O. Dependence of anti-influenza activity of [1,2,6]thiadiazino[2,3-a]benzimidazoles on the composition of the halogenomethyl group. The V Scientific Conference "Youth and Modern Problems of Microbiology and Virology, 19-20 November 2024, Kyiv, Ukraine, P.49
8. Nyzhenets A., Zaremba P., and Zahorodnia S. Virucidal activity of fullerenols against influenza A virus, Modern Problems of Biology, Biotechnology and Biomedicine, 3-4 July 2024, Odesa, Ukraine, P.32
9. Zaremba P., Baranova G., and Zahorodnia S. Toxicity of polyhydrated fullerenes with anti-influenza activity in both in vitro and in vivo systems, Modern aspects of microbiology, virology and biotechnology in wartime and post-war period, 15-16 November 2023, Kyiv, Ukraine, P.276-277
10. Zaremba P., Demchenko V., and Zahorodnia S. Virucidal activity of polymer silver-containing nanocomposites obtained by the green synthesis, X International Conference „Bioresources and Viruses“, 11-13 September 2023, Kyiv, Ukraine, P.91
11. Zaremba P., Artiukh L., Demchenko V., and Zahorodnia S. Virucidal activity of polymer silver-containing films against enveloped viruses, 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 1-30 November 2023, online

12. Zaremba P., Mucha Yu., Zahorodnya S. The influence of silver nanoparticles on different stages of reproduction of influenza A virus (H1N1), The IV Young Scientists Conference “Youth and modern problems of microbiology and virology”, 15-17 November 2022, Kyiv, Ukraine, P.30

13. Zaremba P., Naumenko K., Zahorodnya S., and Yelipashev M. Antiviral activity of polyhydrated fullerenes against influenza A virus H1N1, 7th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 01-30 November 2021, online

14. Zaremba A., Zaremba P., Zahorodnya S. In vitro and in silico study of anti-influenza activity of 2-dioxypyrimidin-5-trifluoromethyl-tetrahydrothiophene with subsequent increase in its affinity for the target protein, 7th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 01-30 November 2021, online

15. Zaremba P., Zaychenko O., Zaremba A., Shermolovych Yu., Naumenko K., and Zahorodnya S. Antiviral activity of fluorine-containing compounds against influenza virus A H1N1, Youth and Progress in Biology: XVI International Scientific Conference, 27-29 April 2020, Lviv, Ukraine, P.170

16. Naumenko K., Zaremba P., Zahorodnya S., Siryi S., Borodkin Ya., and Shermolovych Yu. Antiviral activity of fluorinated compounds against DNA- and RNA-containing viruses, 5th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 01-30 November 2019, online

ЗМІСТ

| | |
|---|----|
| Перелік умовних позначень..... | 20 |
| ВСТУП | 22 |
| РОЗДІЛ 1 Характеристика вірусу грипу типу А Н1N1..... | 29 |
| 1.1 Серотипи вірусу грипу типу А..... | 30 |
| 1.2 Будова віріона..... | 31 |
| 1.2.1 Суперкапсид та мембранні білки..... | 31 |
| 1.2.2 Капсид та геном..... | 34 |
| 1.3 Неструктурні білки..... | 37 |
| 1.4 Життєвий цикл вірусу..... | 41 |
| 1.4.1 Проникнення у клітину..... | 41 |
| 1.4.2 Транскрипція та трансляція вірусних білків..... | 43 |
| 1.4.3 Реплікація вірусного геному..... | 46 |
| 1.4.4 Ядерний експорт та транспорт новосинтезованих РНП у цитоплазмі..... | 48 |
| 1.4.5 Збирання віріонів та їх вихід з клітини..... | 49 |
| 1.4.6 Тривалість стадій життєвого циклу..... | 50 |
| РОЗДІЛ 2 Сучасний стан розвитку протигрипозних препаратів..... | 52 |
| 2.1 Ситуація на світовому фармацевтичному ринку..... | 53 |
| 2.1.1 Зареєстровані препарати-інгібітори нейрамінідази..... | 54 |
| 2.1.2 Зареєстровані препарати-інгібітори вірусної полімерази..... | 58 |
| 2.2 Протівірусні агенти на стадії розробки..... | 59 |
| 2.2.1 Органічні сполуки з протигрипозним потенціалом..... | 60 |
| 2.2.2 Наноструктури з протигрипозним потенціалом..... | 62 |
| РОЗДІЛ 3 Матеріали і методи..... | 65 |

| | | |
|-----------------|---|-----------|
| 3.1 | Матеріали..... | 65 |
| 3.1.1 | Культура клітин та віруси..... | 65 |
| 3.1.2 | Досліджувані органічні сполуки..... | 65 |
| 3.1.3 | Досліджувані наноструктурні матеріали..... | 68 |
| 3.2 | Методи <i>in vitro</i> | 69 |
| 3.2.1 | Культивування клітин..... | 69 |
| 3.2.2 | Визначення цитотоксичності за МТТ-методом..... | 69 |
| 3.2.3 | Накопичення вірусу в культурі клітин..... | 70 |
| 3.2.4 | Визначення інфекційного титру вірусу..... | 71 |
| 3.2.5 | Визначення антивірусної активності..... | 72 |
| 3.2.6 | Визначення віруліцидної дії..... | 73 |
| 3.3 | Методи <i>in silico</i> | 73 |
| 3.3.1 | Підготовка лігандів та цілей..... | 73 |
| 3.3.2 | Молекулярний докінг..... | 74 |
| 3.3.3 | Симуляція молекулярної динаміки..... | 74 |
| 3.3.4 | Розрахунок вільної енергії зв'язування..... | 76 |
| 3.3.5 | Аналіз результатів, отриманих <i>in silico</i> | 76 |
| 3.3.6 | Прогнозування фармакокінетичних параметрів..... | 76 |
| 3.4 | Визначення гострої токсичності <i>in vivo</i> | 80 |
| 3.5 | Статистична обробка даних..... | 80 |
| РОЗДІЛ 4 | Результати експериментальних досліджень..... | 81 |
| 4.1 | Оцінка потенціалу кандидатів у противірусні агенти з класу органічних сполук..... | 81 |
| 4.1.1 | Дослідження флуоровмісних β -N-бензотіазоліл глікозидів..... | 81 |

| | |
|--|-----|
| 4.1.2 Дослідження галогеновмісних [1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензимидазолів..... | 90 |
| 4.1.3 Дослідження флуоровмісних похідних тіофену та аналогів нуклеозидів на їх основі..... | 103 |
| 4.1.4 Дослідження флуоровмісної сполуки на основі тетрагідропіран-2-тріазолу | 113 |
| 4.2 Оцінка потенціалу кандидатів у противірусні агенти з класу наноструктур.... | 118 |
| 4.2.1 Дослідження суміші полігідратованих фулеренів..... | 118 |
| 4.2.1.1 Активність суміші полігідратованих фулеренів на клінічні штами вірусів грипу..... | 132 |
| 4.2.1.2 Визначення гострої токсичності суміші полігідратованих фулеренів <i>in vivo</i> | 134 |
| 4.2.2 Дослідження наночастинок срібла різного діаметру..... | 138 |
| 4.2.3 Дослідження срібловмісних нанокompatитів на основі поліелектролітного комплексу карбоксиметилцелюлоза-хітозан..... | 142 |
| 4.3 Дослідження активності озельтамівіру як референс-препарату на вірус грипу типу А H1N1..... | 146 |
| РОЗДІЛ 5 Обговорення результатів роботи..... | 150 |
| ВИСНОВКИ | 176 |
| Перелік використаних джерел..... | 177 |
| Додатки..... | 209 |

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

| | |
|-------------------|--|
| в.п.і. | - від початку інфекції |
| ВГС | - вірус гепатиту С |
| ВІЛ | - вірус імунодефіциту людини |
| ВПГ-1 | - вірус простого герпесу 1 типу |
| вРНК | - вірусна РНК |
| ЗЧ | - зелений чай |
| Імб | - імбир |
| ІФН | - інтерферон |
| КВ | - контроль вірусу |
| КМЦ | - карбоксиметилцелюлоза |
| КК | - контроль клітин |
| кРНК | - комплементарна РНК |
| М1/2 | - матриксний білок 1/2 |
| МТТ | - 3,(4,5-диметилтріазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум бромід |
| НЧ | - наночастинки |
| ОЗ | - озельтамівір |
| ОЩ | - оптична щільність |
| Пр | - прополіс |
| РНП | - рибонуклеопротейновий комплекс |
| ФВП | - фавіпіравір |
| ХНММ | - хітозан низької молекулярної маси |
| ЦПД | - цитопатична дія |
| СК | - сіалова кислота |
| ТЦД ₅₀ | - доза, необхідна для інфікування культури клітин з цитопатичною дією в 50% моношару |
| ADMET | - Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity |

| | |
|------------------|---|
| BXA | - baloxavir acid |
| BZI | - benzimidazole |
| BZT | - benzothiazole |
| CBD | - cap-binding domain |
| CC ₅₀ | - half-maximal cytotoxic concentration |
| DANA | - N-acetyl-2,3-dehydro-2-deoxyneuraminic acid |
| EC ₅₀ | - half-maximal effective concentration |
| FBS | - fetal bovine serum |
| HA | - hemagglutinin |
| IAV | - influenza A virus |
| IBV | - influenza B virus |
| MDCK | - Madin-Darby canine kidney cells |
| MW | - molecular weight |
| NA | - neuraminidase |
| NLS | - Nuclear Localization Signal |
| NP | - nucleoprotein |
| NS1/2/3 | - non-structural protein 1/2/3 |
| PA | - polymerase acidic protein |
| PB1/2 | - polymerase basic protein 1/2 |
| PBS | - phosphate buffered saline |
| RBD | - receptor-binding domain |
| RdRp | - RNA-dependent RNA polymerase |
| RMSD | - Root mean square deviation |
| ROS | - reactive oxygen species |
| SI | - selectivity index |
| THP | - tetrahydropyran |
| THT | - tetrahydrothiophene |

ВСТУП

Актуальність роботи

Поширеність гострих респіраторних вірусних захворювань створює постійну загрозу епідемії та пандемії. Вірус грипу типу А, маючи схильність до антигенної варіації та, як наслідок, високий пандемічний потенціал, є серйозною світовою проблемою сфер охорони здоров'я та економіки. Хоча більшість людей одужує не потребуючи медичного втручання, Всесвітня організація охорони здоров'я зазначає, що щорічні епідемії призводять до 5 мільйонів випадків важкої інфекції і до 650 тисяч смертельних випадків від ускладнень [1]. США, наприклад, як капіталістична країна, оцінює середній щорічний економічний тягар грипу для системи охорони здоров'я та суспільства у (в середньому) 11,2 мільярда доларів [2]. Їхня логіка доволі проста: чим швидше пересічний громадянин одужує, тим раніше зможе вийти на роботу, а якщо ще й хвороба пройде без ускладнень, то державі не доведеться платити за дороге лікування та перебування в медичних закладах. Тому для запобігання збитків усіх типів станом на сьогоднішній день є два варіанти рішення: вакцинація – як спосіб профілактики, та противірусні препарати – як спосіб скоротити тривалість хвороби, її поширення та ризику розвитку ускладнень.

Наразі вакцинація вважається найкращим методом запобігання захворюваності та смертності від вірусів грипу. Проте на її ефективність впливає багато факторів: відповідність до циркулюючого в конкретний епідемічний сезон штаму, наявний імунітет, вік, стать, вага та загальний стан здоров'я людини тощо. І знову ж таки, антигенна варіабельність вірусу робить універсалізацію вакцини неможливою (принаймні, за сучасного розвитку науки і техніки). Тому пошук альтернативних підходів для вирішення питань, які не охоплюються вакцинацією, є окремим напрямком досліджень.

Ще одним способом боротьби з грипом є терапія противірусними препаратами, що особливо актуально під час сезонних спалахів та епідемії. Наразі

на глобальному фармацевтичному ринку зареєстровано три типи протигрипозних препаратів, спрямованих на проникнення, реплікацію, вивільнення та поширення вірусу: інгібітори іонних каналів M2 (адаманти), інгібітори нейрамінідази та інгібітори РНК полімерази. Однак кожна група препаратів все ж має свої недоліки. Зокрема, адаманти не рекомендуються до використання з 2006 року через високу стійкість штамів вірусу грипу А [3]. Застосування інгібіторів нейрамінідази, незважаючи на те, що вони є найпоширенішими серед усіх типів протигрипозних препаратів, також призводить до розвитку вірусної резистентності. Хоча це відбувається не так швидко та інтенсивно, як у випадку з адамантами. Останнім із схвалених терапевтичних засобів є інгібітор вірусної полімерази балоксавір марбоксил, мішенню дії якого є субодиниця PA, яка має ендонуклеазну активність. Загалом, він наразі є найбільш перспективним препаратом з високою ефективністю та оптимальною дозою (одноразовий прийом), проте водночас уже було зареєстровано доволі стрімкий розвиток резистентності за умови широкого застосування.

Найбільшим недоліком, що об'єднує усі протигрипозні препарати на ринку, є вузьке терапевтичне вікно. Через малий інкубаційний період та стрімкий розвиток інфекції, ефективність ліків дуже сильно залежить від часу їх застосування. Гостро стоїть потреба у препаратах, які будуть ефективні на усіх етапах інфекції, особливо для госпіталізованих пацієнтів у тяжкому стані.

Крім того, віруси грипу типу А вирізняються своїм широким спектром хазяїв і мають схильність влаштовувати зоонозні пандемії (чого тільки вартувала людству «Іспанка»). У випадку нового антигенного шифту, існуючі препарати можуть виявитися неефективними, тому, крім збільшення кількості протигрипозних агентів, потрібно розширювати спектр їхніх мішеней, орієнтуючись на більш консервативні вірусні фактори.

Ще однією стратегією боротьби з вірусами, що успішно себе показала у випадку таких РНК-вмісних патогенів, як вірус імунодефіциту людини та вірус

гепатиту С, є комбінована терапія. Вона дозволяє націлитись одночасно на різні вірусні компоненти, що запобігає стрімкому розвитку резистентності. Проте, для застосування цього підходу потрібно мати повноцінний арсенал з препаратів, що наразі є доволі мізерним для протигрипозних ліків. Через це, багато вчених у всьому світі працюють над пошуком нових агентів та стратегій їх використання серед усіх доступних синтетичних та природних сполук, наноматеріалів та різноманітних фізичних способів впливу.

Мета, об'єкт і предмет роботи

Метою даної дисертаційної роботи є ідентифікація та структурно-функціональний аналіз нових противірусних агентів серед органічних сполук та наноструктур, направлених на різні етапи репродукції вірусу грипу типу А, що включають адсорбцію, проникнення, реплікацію, збирання та вихід віріонів з клітини, а також позаклітинний вірус як окремий стан життєвого циклу.

Об'єкт дослідження: фактори та етапи життєвого циклу вірусу грипу типу А як мішені для противірусних агентів.

Предмет дослідження: зв'язок між хімічною структурою, токсичністю та антивірусною активністю кандидатів у противірусні препарати.

Завдання роботи:

1. Оцінити цитотоксичність та специфічну противірусну активність бібліотеки синтетичних органічних сполук та трьох груп наноструктур відносно вірусу грипу типу А H1N1 в культурі клітин MDCK.

2. Провести аналіз залежності біологічної активності від структури агентів з протигрипозним потенціалом. Спрогнозувати можливі мішені їх противірусної дії. Перевірити висунуті припущення за допомогою симуляції молекулярної динаміки ліганд-рецепторних комплексів.

3. Визначити фармакотоксикологічний профіль досліджуваних агентів з класу органічних сполук. Оцінити їхній потенціал для подальшого дослідження як кандидатів у противірусні препарати.

4. Провести визначення гострої токсичності *in vivo* відібраних найбільш перспективних наноструктур.

5. Оцінити активність суміші полігідратованих фулеренів відносно клінічних вірусів грипу порівняно з лабораторним штамом.

6. Здійснити порівняльний аналіз механізмів дії різнокласових інгібіторів вірусу грипу типу А.

Методи дослідження: культивування клітин MDCK; накопичення вірусу грипу типу А у культурі MDCK; визначення інфекційного титру вірусу через розрахунок ТЦД₅₀/мл; аналіз життєздатності клітин за допомогою МТТ-тесту; визначення антивірусної активності препаратів шляхом додавання їх до інфікованої культури клітин в різні часові періоди; визначення віруліцидної активності; дослідження гострої токсичності; гематологічний аналіз; розрахунок параметрів ADMET за допомогою ADMETlab3.0; молекулярний докінг; симуляція молекулярної динаміки.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами

Дисертаційна робота була виконана в межах наукових проєктів відділу репродукції вірусів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України: «Закономірності впливу хімічних, природних та фізичних вірусінактивуючих агентів на біологічні процеси в системі вірус-клітина» (реєстраційний номер 0115U004127, 2019-2024 рр.), «Прогнозування біоактивності та створення сучасних підходів до синтезу гетероциклічних сполук для потреб фарміндустрії» (реєстраційний номер 0123U10137, 2023-2024 рр.), «Срібловмісні нанокompозити на основі поліелектролітних комплексів за участю полісахаридів з ефективною антимікробною та противірусною дією» (реєстраційний номер 0122U002103, 2023 р.) «Особливості взаємодії наночастинок з вірусами та мікроорганізмами різних типів. Імплементация до антивірусної та антимікробної терапії» (реєстраційний номер 0121U111202, 2020-2022 рр.).

Наукова новизна одержаних результатів

Ідентифіковано ряд синтетичних органічних сполук з оригінальними скефолдами, що впливають на репродукцію вірусу грипу типу А в клітинах MDCK. Вперше показано потенціал β -N-бензотіазоліл глікозидів впливати на вірусну реплікацію. Встановлено закономірності структура-активність галогеновмісних [1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензimidазолів та продемонстровано їх активність залежно від складу галогенометильної групи. Вперше встановлено високу ефективність флуоровмісних тіонуклеозидів у пригніченні репродукції вірусу грипу типу А H1N1 та розширено уявлення про протівірусну активність похідних тетрагідротіофену. Серед досліджуваних сполук з протигрипозним потенціалом визначено похідне тетрагідропірану та тріазолу з механізмом антивірусної дії, відмінним від решти активних молекул.

Вперше встановлено комплексний антивірусний ефект суміші полігідратованих фулеренів на різні етапи життєвого циклу вірусу грипу типу А H1N1, що забезпечується взаємодією з ліпідною мембраною вірусу та клітини, а також з РНК-залежною РНК полімеразою. Доведено їх ефективність у пригніченні репродукції клінічного штаму H1N1 pdm09 та вірусу грипу типу В лінії Вікторія.

Розширено уявлення про залежність активності наночастинок срібла від їх розміру. Продемонстровано здатність наночастинок срібла діаметром <20 нм до активації механізмів вродженого клітинного імунітету для успішної протидії репродукції вірусу грипу типу А.

Вперше показано ефективність наночастинок срібла у складі композитів на основі хітозану та Na-карбоксиметилцелюлози, синтезованих з використанням рослинних екстрактів, у зниженні інфекційності позаклітинного вірусу.

Практичне значення отриманих результатів

Було відібрано п'ять органічних сполук-хітів в результаті пошуку нових протівірусних агентів: дві на основі 5H-[1,2,6]тіадіазино[2,3-a]бензimidазол-4-карбоксилат-1,1-діоксидного скефолду, біс(5-дифлуоро-метил-2-(тетрагідропіран-2-

іл)-2Н-1,2,3-тріазол-4-іл)-сульфон, та дві молекули серед похідних тетрагідротіофену. Серед останніх також ідентифіковано тіонуклеозид-лід як найбільш перспективний кандидат для подальших доклінічних випробувань. Усі шість обраних синтетичних органічних сполук вирізняються оптимальними параметрами ADMET разом з достатнім рівнем протигрипозної активності та селективності *in vitro* для переходу в кандидати у противірусні препарати.

Серед агентів з класу наноструктур відібрано кандидати з перспективою впровадження їх для застосування в якості дезинфікуючих та профілактичних засобів, направлених на віруси грипу. Запропоновано можливі способи використання обраних агентів, залежно від механізму їх дії.

Особистий внесок здобувачки

Усі дослідження були проведені безпосередньо за участі здобувачки. Експерименти *in vitro*, прогнозування параметрів ADMET, обробку і аналіз усіх отриманих результатів виконано особисто авторкою. Дослідження *in vivo*, а саме визначення гострої токсичності та гематологічний аналіз, було проведено у співпраці з пров.інж. відділу репродукції вірусів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Галиною Василівною Барановою. Проведення розрахункових експериментів з докінгу та симуляції молекулярної динаміки відбувалося у співпраці з м.н.с. відділу репродукції вірусів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Андрієм Анатолійовичем Зарембою. Розробка стратегій досліджень, планування експериментів та обговорення результатів відбувалися спільно з науковою керівницею здобувачки к.б.н., ст.д. Світланою Дмитрівною Загородньою.

Апробація результатів роботи

Результати досліджень, описані в дисертаційній роботі, були представлені на наступних конференціях: міжнародна електронна конференція «5th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry» (01-30 листопада 2019); XVI міжнародна наукова конференція «Молодь і поступ біології» (27-29 липня 2020);

міжнародна електронна конференція «7th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry» (01-30 листопада 2021); IV конференція молодих вчених «Молодь і сучасні проблеми мікробіології та вірусології» (15-17 листопада 2022); X міжнародна конференція «Біоресурси та віруси» (11-13 вересня 2023); міжнародна електронна конференція «9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry» (01-30 листопада 2023); міжнародна науково-практична конференція «Сучасні аспекти мікробіології, вірусології та біотехнології у воєнний та післявоєнний час» (15-16 листопада, 2023); конференція для молодих учених «Modern Problems of Biology, Biotechnology and Biomedicine» (3-4 липня 2024); V конференція молодих вчених «Молодь і сучасні проблеми мікробіології та вірусології» (19-20 листопада 2024); XVI З'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (2-6 червня 2025); XIII міжнародна конференція "Nanotechnologies and Nanomaterials" NANO-2025 (20-23 серпня 2025).

Публікації за результатами дисертаційної роботи

Результати досліджень дисертаційної роботи опубліковано сумарно у 16 наукових працях, що включають: 2 статті в міжнародному науковому журналі Q1, 1 статтю у виданні Q3 і одну – Q4, а також 12 тез доповідей у збірках міжнародних та всеукраїнських наукових конференцій. На момент подання дисертаційної роботи індекс Гірша здобувачки становить 4, а загальна кількість цитувань дорівнює 41, за даними Scopus.

Структура та обсяг дисертації

Загальний обсяг дисертації становить 232 сторінки комп'ютерного тексту. Рукопис складається з анотації, вступу, двох розділів огляду літератури, розділу матеріали та методи, розділу з результатами експериментальних досліджень, розділу обговорення результатів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Роботу проілюстровано 50 рисунками, 13 таблицями та 6 додатками. Перелік використаних джерел містить 247 найменувань.

РОЗДІЛ 1

ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСУ ГРИПУ ТИПУ А Н1N1

Вірус грипу типу А (ІАV) Н1N1 є представником родини РНК-вмісних вірусів *Othomyxoviridae*, в межах якої відноситься до роду *Alphainfluenzavirus* та має відповідну видову назву *Alphainfluenzavirus influenzae* [4].

Віріони плеоморфні, вкриті суперкапсидом, середній діаметр сферичних становить 100-120 нм. Вірусні частинки витягнутої ниткоподібної форми мають діаметр 80-100 нм і довжину до кількох мкм [5]. Геном представлений 8 сегментами одноланцюгової РНК негативної полярності, яка знаходиться у комплексі з нуклеопротеїнами та РНК-залежною РНК полімеразою. Кожен сегмент кодує мінімум один вірусний білок, при чому їх кількість варіює в залежності від штаму (10 – 14 білків). За допомогою власного полімеразного комплексу вірус реплікується у ядрі клітини з подальшою трансляцією у цитоплазмі та процесингом синтезованих білків в ендоплазматичному ретикулумі (ЕПР) та комплексі Гольджі.

Віруси грипу типу А людини тропні до епітелію верхніх дихальних шляхів (наприклад, штами Н1N1 та Н3N2 уражують тканини трахеї та бронхів) та потребують сіалової кислоти (СК) в якості рецептора.

Передача відбувається повітряно-крапельним шляхом, додатково можливий також контактний. Вірус грипу викликає гостру інфекцію з однойменною назвою. У більшості людей спостерігається перебіг захворювання без ускладнень за повного одужання через 5 – 7 діб. Тяжка форма характеризується первинним вірусним запаленням легень, яка за відсутності належного лікування може призвести до смерті протягом доби після появи перших симптомів ускладнення [6]. Окремі категорії населення (діти, люди похилого віку, імунокомпроментовані особи) є більш вразливими до важкого перебігу та вторинних ускладнень, тому вони потребують лікування противірусними препаратами.

1.1 Серотипи вірусу грипу типу А

Класифікація вірусів грипу типу А на серотипи або штами базується на їхніх двох поверхневих антигенах гемаглютиніні (НА) та нейрамінідазі (НА), необхідних для проникнення та виходу з ураженої клітини, відповідно.

На сьогоднішній день виділяють 18 різних підтипів НА (Н1-Н18) та 11 підтипів НА (N1-N11). Підтипи НА у свою чергу ділять на 2 групи: перша включає Н1, Н2, Н5, Н6, Н8, Н9, Н11-Н13, Н16-Н18, а до другої, відповідно, належать Н3, Н4, Н7, Н10, Н14 та Н15. З точки зору структури усі підтипи дуже схожі між собою, проте основна відмінність між групами полягає у субдомени F гемаглютиніну, що відповідає за злиття вірусної та клітинної мембран [7].

Підтипи НА (крім N10 та N11) також поділяються на 2 групи: до першої відносять N1, N4, N5, N8, а до другої – N2, N3, N6, N7 та N9. Подібно до гемаглютиніну, підтипи нейрамінідази є схожими структурно, проте відрізняються будовою петлі каталітичного домену, що утворює частину активного центру. Підтипи першої групи, на відміну від другої, мають додаткову порожнину поруч з активним центром [8]. Ця відмінність також відіграє важливу роль у розробці протигрипозних препаратів, оскільки інгібітори нейрамінідази були створені на основі кристалів НА другої групи [9]. Відповідно, порожнина НА першої групи вважається перспективною мішенню для нових інгібіторів.

Серотипи Н1-16 та N1-9 зустрічаються у диких водних птахів, які є природним резервуаром для вірусу грипу. Н17N10 та Н18N11 були виділені з кажанів, та, на відміну від пташиних НА та НА, не використовують залишки сіалової кислоти як рецептори [10]. Загалом можливо 144 комбінації НА та НА (не рахуючи підтипи, що зустрічаються у кажанів), і, за даними GenBank, більше 120 із них було зафіксовано у природі [11].

Віруси грипу типу А, крім птахів, часто заражають інші види, включаючи людей, свиней, коней, собак та диких ссавців. Серотипи Н1N1 і Н3N2 на сьогоднішній день є ендемічними для людського населення, сюди також раніше

можна було віднести штаму H2N2, що був причиною пандемії Азійського грипу 1957 року, але зараз вважається, що він зник з переліку циркулюючих вірусів грипу [12]. До інших серотипів, здатних викликати захворювання дихальних шляхів у людей відносять: H5N1, H6N1, H7N3, H7N7, H7N9 та H10N8.

Серотип H1N1 є найрозповсюдженішим серед людей, та відомий найбільш масштабними спалахами захворювання. Він став причиною двох пандемій – Іспанського грипу 1918 року та Свинячого грипу 2009 року.

1.2 Будова віріона

1.2.1 Суперкапсид та мембранні білки

Усі віруси, що містять суперкапсид, отримують ліпідну оболонку від клітини-хазяїна під час виходу віріонів у позаклітинний простір (цей процес також називають брунькуванням). Для вірусів грипу брунькування відбувається на апікальній стороні плазматичної мембрани поляризованих клітин у місцях, збагачених холестеролом та сфінгомієліном [13]. Тому очищені вірусні частинки містять високий рівень холестеролу, який може становити до 12% загальної маси віріона [14]. Склад ліпідів суперкапсиду може варіювати в залежності від клітини. Наприклад, віріони IAV, що були синтезовані у культурі клітин MDCK мають наступне співвідношення ліпідів у складі мембрани: ~52% стеролів (з переважною часткою холестеролу), ~29% глікосфінголіпідів (з переважанням серед них фосфатидилсерину і фосфатидилетаноламіну) та ~19% сфінголіпідів. Такий склад є ближчим до саме апікальної частини мембрани MDCK, ніж до загальної плазмалеми [15]. Холестерол у суперкапсиді вірусу грипу є важливим для процесу злиття вірусної та клітинної мембран [14].

Ліпідна оболонка вірусу грипу містить 3 типи інтегральних мембранних білків: HA, NA та іонний канал M2 (матриксний білок 2). Переважну більшість складає гемаглютинін: середній віріон діаметром 120 нм містить 300-400 HA, 40-50 NA та до 68 M2 [16, 17]. За своєю структурою гемаглютинін – це гомотример,

субодиниці якого складаються з двох глікополіпептидів HA1 і HA2. Субодиниці в свою чергу складаються з чотирьох субдоменів: рецептор-зв'язуючий (R) і рудиментарний субдомен естерази (E) HA1; субдомен злиття мембран (F), що складається з частин HA1 і HA2; та субдомен мембранного якоря (M) HA2 [7]. HA1 і HA2 утворюються шляхом обмеженого протеолізу білка-попередника HA0 клітинними протеазами, який до цього не має активності [18].

R-субдомен містить сайт зв'язування рецептора за допомогою якого відбувається приєднання до залишків СК на клітині. Разом з E-субдоменом вони утворюють так звану глобулярну головку гемаглютиніну. Саме в ній розташовані високочутливі до нейтралізації антигенні ділянки, які власне знаходяться безпосередньо в та навколо сайту зв'язування рецептора [19]. E-субдомен з'єднує R-субдомен із частиною HA1 F-субдомену і не має естеразної активності. Він отримав свою назву завдяки структурній схожості з частиною глікопротеїну вірусу грипу типу С, у якого естераза функціонує як аналог нейрамідідази вірусів типу А та В [7]. Більша частина F-субдомену утворена HA2, а 23 термінальні залишки амінокислот називають білком злиття, через безпосередню участь у цьому процесі. Основну частину M-субдомену формує потрійна спіральна структура. Крім власне функції мембранного якоря, він також бере участь у злитті мембран, припускається, що на фінальних етапах [20]. Разом F- та M-субдомени утворюють ніжку HA. Таким чином гемаглютинін вірусу грипу відносять до білків злиття I класу на основі вищеописаної будови [21].

Наступний поверхневий білок вірусу – нейрамідідаза – є тетрамером, кожен мономер якого складається з чотирьох частин: голівки, ніжки, трансмембранного домену та цитоплазматичного хвоста [17]. На поверхні віріона HA може бути розташована як у вигляді кластерів, так і поодинокі в оточенні HA. Також, залежно від довжини ніжки, головка HA може розташовуватися вище або нижче HA, що, у свою чергу, може впливати на загальну ферментативну активність вірусу [22].

Голівка тетрамеру нейрамідідази містить на кожному мономері каталітичний

сайт, спрямований у бік для ефективного відщеплення сіалових кислот від сусідніх глікопротеїнів [16]. Активний центр NA містить 8 внутрішніх високо консервативних залишків амінокислот, які безпосередньо взаємодіють із СК, а також 11 зовнішніх залишків, які не беруть участі у взаємодії, але мають важливу структурну роль. Консервативність каталітичного центру (як просторова, так і з точки зору складу) робить його гарною мішенню для противірусних агентів, хоча мутації можуть виникати та сприяти резистентності до інгібіторів [23]. Амінокислотна послідовність хвостових доменів NA варіює в залежності від серотипів вірусу грипу, проте кожен містить щонайменше один залишок цистеїну, необхідний для стабілізації тетрамеру [24]. Довжина хвоста може впливати не тільки на механічну здатність NA взаємодіяти із залишками СК, а і на конформаційні перебудови у активному центрі головки [25]. Трансмембранний домен, крім очевидної функції приєднання NA до суперкапсиду, є необхідним для формування всього тетрамеру. Також детермінанти цього домену важливі для транспорту NA до апікальної частини клітинної мембрани, адже транслокація може відбуватися навіть без наявних ніжки та голівки [26]. Цитоплазматичний хвіст є важливим для вірусу з точки зору кількох аспектів. По-перше, він також бере участь у вищезазначеному транспорті до апікальної мембрани [16]. Також, було продемонстровано, що точкові мутації у хвостовому домені призводять до зміненої морфології віріонів та зниженої реплікативної активності. Це може бути обумовлено відсутністю взаємодії з білком M1, що в результаті призводить до порушення процесу брунькування [27].

Останнім з інтегральних мембранних білків є M2 – гомотетрамерний рН-регульований іонний канал, який відіграє вирішальну роль для репродукції IAV в клітині, забезпечуючи вихід вірусного геному у цитоплазму. Крім того, M2 також функціонує на пізніх стадіях репродукції, врівноважуючи рН апарату Гольджі з цитоплазматичним. Це запобігає конформаційним змінам новосинтезованого гемаглютиніну під час транспорту до клітинної мембрани [28]. Мономери M2,

з'єднані на N-кінці дисульфідними зв'язками та C-кінцевими амфіпатичними спіралями на іншому, складаються з 3 структурних доменів. Ектодомен (23 залишки амінокислот на N-кінці) відповідає за інтеграцію білка у віріон. Наступний трансмембранний домен, що складається з 19 залишків, забезпечує протонну провідність, тетрамеризацію білка та є мішенню для зв'язування інгібіторів. І C-кінцевий цитоплазматичний хвіст (54 залишки) є важливим для мембранної локалізації, брунькування та з'єднання з білком M1 [29]. Трансмембранна частина M2, утворена 4 α -спіралями, і являє собою канал, через який до віріона мають потрапити протони. Спіралі щільно упаковані на N-кінці, де діаметр входу у канал становить близько 2 Å, та злегка розходяться у напрямку C-кінця з найширшою точкою ~ 9 Å (G34) з наступним звуженням до виходу, діаметр якого становить 1,4 Å (H37 та T41) [30]. Власне залишки H37 виступають у ролі сенсора протонів та проводять їх шляхом протонування та депротонування бічного ланцюга імідазолу. В свою чергу T41 утворює так званий Trp-кошик, який працює як рН-залежні ворота каналу [31]. Саме залишки H37 та T4 є високо консервативними серед усіх відомих штамів IAV, власне через їхню роль функціонального ядра M2 [32].

1.2.2 Капсид та геном

Матриксний білок 1 (M1) розташовується під суперкапсидом віріона IAV, утворюючи шар, необхідний для стабільності вірусної частинки. Цей білок бере участь у більшості етапів життєвого циклу вірусу: вивільнення геному у цитоплазму інфікованої клітини, транскрипції, ядерного експорту, збирання та брунькування [33]. Важливість M1 для репродукції вірусу, а також консервативність серед різних штамів, роблять його привабливою мішенню для розробки протигрипозних препаратів.

M1 складається з 252 амінокислот та поділяється на N-кінцевий домен з 9 α -спіралей та C-кінцевий домен, який, ймовірно, складається з 3 спіралей [34]. Дані електронної мікроскопії вказують на те, що M1 утворює щільні, лінійні полімери

спірально-організовані як у сферичних, так і у ниткоподібних віріонах [35]. Дев'ята спіраль у складі N-домену видовжується за його межі та переходить у C-домен. Власне полімеризація білка пов'язана з цією дев'ятою спіраллю, розширення якої сприяє переходу C-домена в розгорнутий стан, після чого він здатний до взаємодії з N-кінцем наступної молекули M1. Отже, зв'язування M1 з полімером викликає конформаційні зміни, які сприяють зв'язуванню наступного мономера, що вказує на процесуальність процесу [35].

У віріоні M1 напряму взаємодіє з рибонуклеопротеїновими комплексами (РНП), що утворюють геном вірусу грипу. Це, а також взаємодії між комплексами, забезпечують конфігурацію «7 + 1», де сім РНП оточують один центральний [36]. Кожен РНП складається з одного сегмента РНК розміром від 890 до 2341 нуклеотидів, нуклеопротеїнів (NP), які визначають спіральну форму комплексу, та РНК-залежної РНК полімерази (RdRp) [37].

Кожен сегмент вірусної одноланцюгової РНК містить частково комплементарні консервативні 5'- і 3'-кінцеві послідовності, які не відрізняються навіть між штамми IAV; сегмент-специфічні нетрансльовані ділянки (UTRs) та щонайменше одну відкриту рамку зчитування (ORF). RdRp у межах комплексу прикріплюється саме до кінцевих послідовностей, тому РНК з мутаціями у цих ділянках не здатні формувати РНП і, як наслідок, вбудовуватись у віріони [38].

Молекула NP, що має форму півмісяця, складається з 2 основних доменів: так званих голови і тіла, між якими знаходиться борозенка для зв'язування з РНК, а також хвостової петлі з 28 амінокислотних залишків. Олігомеризація білка відбувається за рахунок взаємодії петлі однієї молекули з "тілом" іншої [39]. Один нуклеопротеїн зв'язує ~24 нуклеотиди та містить пару послідовностей сигналу ядерної локалізації (NLS) [40]. РНК у складі РНП чутлива до гідролітичного розщеплення, що свідчить про те, що вона зв'язана на зовнішній поверхні NP [41]. Також, нуклеопротеїни не розташовані вздовж РНК рівномірно, що забезпечує формування вторинних структур, що у свою чергу можуть полегшувати взаємодії

між сегментами та селективне пакування РНП під час збирання віріонів [37]. NP є важливим компонентом РНП, їхні функції включають олігомеризацію комплексу, внутрішньоклітинний транспорт та участь у переході від транскрипції мРНК до реплікації вірусної РНК [42]. Крім того, NP є високо консервативними, а також найбільш поширеними у клітині вірусними білками без ферментативної активності [43].

РНК-залежна РНК полімераза IAV це тример, що складається з наступних субодиниць: PB1 (polymerase basic protein 1), PB2 (polymerase basic protein 2) та PA (polymerase acidic protein). Разом вони формують щільну глобулярну структуру, ядром якої є PB1 [44]. Субодиниця PB1 містить субдомени, типові для полімераз: долоню (palm), пальці (fingers) та великий палець (thumb), а також петлю праймування (β -шпильку), яка виступає з субдомену великого пальця в активний центр RdRp і є необхідною для ініціації синтезу РНК *de novo*, тобто незалежно від праймера [45]. PB1 каталізує послідовне додавання нуклеотидів під час елонгації ланцюга РНК. Дана субодиниця також бере участь у зв'язуванні з 5'- та 3'-кінцевими послідовностями вірусної РНК та комплементарної їй РНК, що утворюється в процесі реплікації [46]. Субодиниця PA складається з двох частин: N-кінцевий домен має ендонуклеазну активність і з'єднаний з ядром полімерази через гнучкий лінкер; С-кінцевий домен тісно пов'язаний з PB1 і інтегрований у субдомен великого пальця. PB2 має дещо подібну структуру, її N-кінцева третина також є частиною ядра RdRp, а С-кінцеві дві третини утворюють кілька гнучких доменів, включаючи кеп-зв'язуючий домен, середню ланку і NLS [47]. Субодиниці PB2 та PA відіграють вирішальну роль в ініціації транскрипції. Вони також, ймовірно, сприяють зв'язуванню промотора, але точна природа цих взаємодій залишається невизначеною [48].

Полімераза містить кілька сайтів для зв'язування РНК. 5'-кінець вірусної і комплементарної РНК зв'язується біля вхідного каналу RdRp кишени, що складається із амінокислотних залишків субодиниць PB1 і PA. 3'-кінець РНК може

асоціюватися з двома різними місцями на поверхні полімерази (А- та В-сайт), тоді як 3'-кінець комплементарної РНК взаємодіє лише з В-сайтом [49]. Функціональне значення цих сайтів зв'язування наразі повністю не визначене, проте, ймовірно, А-сайт забезпечує місце преініціації, з якого 3'-кінець вірусної РНК входить в активний центр полімерази; у свою чергу В-сайт забезпечує те саме для комплементарної РНК або ж є місцем для розміщення 3'-кінця матриці РНК, коли вона виходить з RdRp після копіювання [47].

1.3 Неструктурні білки

Крім восьми структурних білків, необхідних для інфікування, реплікації, збирання та брунькування, вірус грипу типу А експресує також неструктурні, що не входять до складу віріона. Серед них виділяють NS1 та NS2 як основні, та ряд додаткових: PA-X, PB1-F2, PB1-N40, PA-N155, PA-N182, M42, NS3, які утворюються в результаті сплайсингу, зсуву рамки зчитування та скорочення області кодування структурних білків [50]. Усі ці вірусні фактори відіграють важливу роль у пригніченні захисних механізмів клітини, вірулентності та патогенності.

NS1 (non-structural protein 1) – це невеликий білок розміром 26 кДа, який має 3 чітко виражені частини: N-кінцевий домен зв'язування з РНК (RBD), ефекторний домен (ED) та С-кінцевий хвіст [51]. Кожна частина NS1 взаємодіє з різними клітинними факторами та сприяє широкому спектру його функцій. По-перше, цей неструктурний білок впливає на захисні механізми клітини-хазяїна. Зокрема, NS1 взаємодіє з лігазами TRIM25 та Riplet, що призводить до пригнічення убіквітинування RIG-I [52]. Також, через взаємодію з IKK α/β він порушує сигнальний шлях NF- κ B [53]. А зв'язування RBD NS1 з вірусною РНК запобігає активації 2'-5'-олігоаденілатсинтетази [54]. В усіх випадках це призводить до блокування каскаду взаємодій, необхідних для активації експресії інтерферону (ІФН). Для запобігання інгібуванню синтезу білка в інфікованій клітині, NS1

з'являється з протеїнкіназою R, яка є сенсором дЛРНК та частиною машинерії активації ІФН [55].

Крім того, NS1 “вимикає” трансляцію клітинних мРНК, включаючи експресію ІФН-I та стимульованих ІФН генів. Для цього також застосовується кілька механізмів. Насамперед NS1 через ED взаємодіє з фактором CPSF30, що блокує останній від зв'язування з клітинними пре-мРНК, це призводить до їх накопичення у ядрі та інгібування трансляції у цитоплазмі [56]. Для зупинки поліаденілування пре-мРНК, NS1 (також через ED) інгібує білок клітинної машинерії PABII, що, на додачу, впливає на експорт мРНК з ядра [50]. Ще один спосіб зупинки ядерного експорту клітинних мРНК полягає у взаємодії NS1 з факторами, необхідними для проходження мРНК через ядерно-поровий комплекс [57]. Таким чином, IAV за допомогою NS1 блокує експресію клітинних генів шляхом пригнічення транскрипції, перешкоджання процесингу пре-мРНК та інгібування ядерного експорту мРНК. Це дозволяє вірусу успішно використовувати систему трансляції інфікованої клітини для власних потреб.

По-друге, NS1 власне забезпечує трансляцію вірусних мРНК та реплікацію геному. Для цього, у першому випадку, він взаємодіє з клітинними факторами трансляції eIF4GI та PABP1 [58]. Тоді як регуляція реплікації обумовлена блокуванням гелікази DDX21, що не дає їй інгібувати субодиницю полімерази PB1, а також зв'язуванням з РНК геліказою А, що також сприяє активності RdRp [59, 60].

По-третє, даний неструктурний білок відіграє роль у запобіганні вірус-індукованого апоптозу. Для цього він, зв'язуючись з РІЗК, активує сигнальний шлях РІЗК/Akt, що сприяє виживанню і росту клітин, таким чином забезпечуючи достатньо часу для реплікації IAV. Проте, подібний вплив NS1 залежить від багатьох факторів, включаючи штам вірусу, тип клітин та інші клітинні процеси [61]. Також для зупинки апоптозу NS1 взаємодіє з p53 [62].

На додачу до вищезазначених функцій, NS1 також містить детермінанти вірулентності IAV, які визначають його патогенність, легкість міжвидової передачі

та пандемічний потенціал. Зокрема у даному білку виділяють чотири детермінанти: залишки 92E, F103, M106 та С-кінцевий PDZ-мотив з 4 залишків [50]. 92E бере участь в уникненні вірусом антивірусних цитокинових реакцій [63]. Залишки F103 та M106 необхідні для взаємодії з вищезгаданим фактором CPSF30 і є консервативними серед більшості IAV людини, через регуляцію реплікації вони забезпечують патогенність вірусу [57]. Склад PDZ-мотиву залежить від штаму та типу клітин, ймовірно він також бере участь у регуляції реплікації [64].

Наступний неструктурний білок NS2 ще називають NEP (nuclear export protein) через його роль у ядерному експорті РНП. Він, разом з попереднім білком, закодований у одному сегменті РНК (NS), проте NS1 транлюється з первинного мРНК транскрипту, а NS2 з його сплайсованої форми [65]. В загальному даний білок вважається неструктурним, проте невеликі кількості були знайдені у віріонах, де він може взаємодіяти з М1 [66]. Розмір NS2 складає 121 амінокислотні залишки, він поділяється на малодосліджений N-кінцевий домен (де знаходяться два сигнали ядерного експорту) та С-кінцевий домен з 2 α -спіралей. Для забезпечення експорту новосинтезованих РНП з ядра, білок NS2 через С-кінець взаємодіє з білком М1 зв'язаним з РНП, а через N-кінець – з клітинним фактором CRM1 [67]. Точно невідомо, чи відіграє цей білок роль у подальшому цитоплазматичному транспорті, проте на мембрані він взаємодіє з АТФазою F1Fo, що сприяє збірці та виходу віріонів з клітини [68].

Ще однією функцією NS2 є регуляція транскрипції та реплікації РНК вірусу грипу. Це відбувається за рахунок зв'язування останнього амінокислотного залишку I121 NS2 з RdRp у складі РНП [69]. Така взаємодія призводить до дисоціації клітинної РНК полімерази II та вірусної RdRp і не дає останній набути конформації транскриптази. Таким чином, NS2 функціонує як перемикач, інгібуючи транскрипцію та активуючи реплікацію [70].

Неструктурний білок PB1-F2 зустрічається виключно у вірусів грипу типу А та експресується з альтернативної відкритої рамки зчитування сегменту РНК PB1.

Його довжина варіює між між штамми та може становити від 57 до 106 (в середньому 90) амінокислотних залишків [71]. С-кінцевий домен білка містить послідовність, необхідну для його транслокації в мітохондрії через канал Tom40, що впливає на зменшення мембранного потенціалу останніх. Індукована PB1-F2 фрагментація мітохондрій бере участь у послабленні вродженої імунної відповіді та активації інфламасоми NLRP3 [72]. Подібно до інших неструктурних білків, PB1-F2 порушує шляхи активації ІФН. Його локалізація у міжмембранному просторі мітохондрій призводить до блокування сигнального шляху RIG-I та прямого зв'язування з MAVS [73], а взаємодія з білком CALCOCO2 інгібує TRAF2/3-опосередковану індукцію ІФН [74]. Для запобігання активації NF- κ B PB1-F2 зв'язується з IKK β [75].

Проте, крім пригнічення захисних механізмів клітини, було продемонстровано, що експресія PB1-F2 індукує експресію генів, пов'язаних із клітинною загибеллю, запальною реакцією та хемотаксисом нейтрофілів [76]. Активація прозапальних цитокінів характерна для високо патогенних штамів, тому PB1-F2 та його мутації є важливими для вірулентності вірусу грипу типу А. Безпосередньо детермінантою вірулентності вважається мутація N66S, яка, наприклад, притаманна штамам H1N1 (1918) та A/HongKong/156/1997(H5N1), відповідно менш патогенні штами містять N66 [77]. Дана мутація підсилює зв'язування PB1-F2 з MAVS, що частково пояснює загальний механізм вірулентності S66, який включає раннє інгібування ІФН, підвищені рівні прозапальних цитокінів та посилену інфільтрацію імунних клітин у легені [78]. Таким чином, білок PB1-F2, зважаючи на його структурну та функціональну різноманітність, насамперед забезпечує штам специфічну патогенність вірусу грипу типу А.

Ще один неструктурний білок – PA-X – експресується з PA сегменту вірусної РНК, при цьому синтез починається з того самого старт-кодону, що і для оригінального білка, а потім відбувається +1 зсув рамки зчитування. Тому, PA-X

містить перші N-кінцевих 191 амінокислотних залишки субодиниці PA RdRp та унікальний C-кінець, що становить здебільшого 61 залишок [79]. У інфікованій клітині PA-X насамперед впливає на експресію клітинних білків. Один із механізмів пов'язаний з тим, що даний білок містить N-кінцевий домен PA з ендонуклеазною активністю, відповідно, він розщеплює клітинні мРНК [80]. Більш того, PA-X використовує машинерію РНК сплайсингу для руйнування пре-мРНК одразу після синтезу [81]. В залежності від штаму IAV PA-X може бути негативним регулятором патогенності за рахунок пригнічення активності RdRp та впливу на захисні механізми клітини [82]. Цей неструктурний білок, подібно до вищеописаних, впливає на механізми активації ІФН через шлях RIG-I-MAVS, проте точний механізм взаємодії поки не визначений [83]. Також PA-X може інгібувати секрецію прозапальних факторів IL-6, TNF- α і IL-1 β одночасно зі стимуляцією синтезу протизапального IL-10 [84].

Решта неструктурних білків є малодослідженими. З невеликої кількості робіт відомо лише наступне: PB1-N40 може взаємодіяти з компонентом комплексу COP1, важливим для проникнення вірусу в клітину [85]; білки PA-N182 та PA-N155 грають певну роль у реплікації та патогенності вірусу [86]; знайдений у кількох штамів M42 може бути функціональною альтернативою каналу M2 [87]; а коротка мутована форма NS1 – NS3 – можливо відіграє роль у адаптації вірусу до різних хазяїв [88].

1.4 Життєвий цикл вірусу

1.4.1 Проникнення у клітину

Інфікування вірусом грипу чутливої клітини починається зі взаємодії гемаглютиніну з рецептором, у ролі якого виступають залишки СК на мембранних глікопротеїнах (або гліколіпідах). Найбільш поширеним типом СК є 5-ацетилнейрамінова кислота, яка зв'язана з передостаннім залишком цукру олігосахариду через α -2,3 або α -2,6 зв'язок [89]. Переважно вважається, що тип зв'язку СК визначає специфіку господаря IAV. Наприклад, HA вірусів грипу

людини, розпізнає рецептори з α -2,6, тоді як віруси грипу птахів в більшості розпізнають рецептори з α -2,3. Відповідно, α -2,6-зв'язані СК виявлено на поверхні епітеліоцитів верхніх дихальних шляхів людини, а α -2,3-зв'язані – на епітеліальних клітинах кишечника птахів та на клітинах нижніх дихальних шляхів людини. Завдяки цьому, передача пташиного грипу від людини до людини вкрай обмежена. В свою чергу у трахеї свиней містяться СК з обома типами зв'язків, забезпечуючи таким чином успішну інфекцію різних штамів та їх реасортацію [90]. Тому взаємодія НА грипу та СК є важливою для передачі вірусу, особливо міжвидової, а відмінності рецепторів клітинної поверхні є одним з основних бар'єрів для цього.

Після взаємодії з рецептором та закорення на мембрані, віріону потрібно проникнути всередину клітини. Для цього IAV використовує кілька шляхів, серед яких переважає клатрин-залежний ендоцитоз [91]. Оскільки залишки СК на клітинах не є рецепторами ендоцитозу, припускається, що активатором процесу є локалізоване впинання мембрани за рахунок взаємодії багатьох НА з трансмембранними глікопротеїнами. Таке впинання можуть розпізнавати VAR-домени білки, які рекрутують клатрин безпосередньо або через адаптерні протеїни AP-2 та Епсин 1 [92]. Клатрин, полімеризуючись, утворює решітку навколо мембрани, деформуючи її ще сильніше. Після того, як везикула повністю сформована, динамін олігомеризується навколо її шийки і за рахунок конформаційних змін відділяє везикулу від мембрани [93]. Далі клатринова решітка розпадається, а везикула з віріоном зливається з ранньою ендосоною, запускаючи наступні етапи вірусного циклу.

Наступні два можливих механізми проникнення у клітину не потребують попередньої взаємодії гемаглютиніну з СК. Кавеолін-залежний ендоцитоз відбувається у спеціалізованих мембранних впинаннях – кавеолах, та також залучає динамін для відщеплення утвореної везикули [94]. Макропіноцитоз необхідний для ниткоподібних віріонів грипу, оскільки вони занадто великі для попередніх шляхів проникнення. Він відбувається за рахунок актин-залежного

формування складок мембрани, які випинаються на зовні та можуть згинатися з наступним злиттям ліпідного бішару. Так утворюються макропіноси, подальша доля яких подібна до ендозитозних везикул [95].

Наступні етапи репродукції вірусу потребують вивільнення геному з віріона всередині везикули. Для цього потрібна зміна рН, тому спочатку відбувається злиття везикули з ранньою ендосоною, далі її дозрівання у пізню ендосоною (рН 6,0 - 4,8) за рахунок роботи V-АТФаз, і утворення ендолізосом (рН \approx 4,5) шляхом злиття останніх з лізосомами у перинуклеарній зоні [96]. Зниження рН у оточуючому віріон середовищі активує процес злиття вірусної та ендосомальної мембран, опосередкований НА2 гемаглютиніну. При рН < 5,8 відбувається розширення голівки НА (або НА1), що у свою чергу активує конформаційні перебудови НА2. Внаслідок цього НА2 занурюється у мембрану ендосоми, а втрата вторинної структури НА та його послідовна перебудова спричиняє наближення обох мембран із їх послідовним злиттям [97].

Паралельно до злиття мембран відбувається дисоціація матричного шару віріона, утвореного білком М1, що є необхідним кроком для повноцінного злиття, а також для вивільнення РНП. Цьому сприяє робота іонного каналу М2, який активується зниженням рН у ендосомі. Білок М2 закислює внутрішнє середовище віріона, що призводить до дестабілізації М1 та втрату його зв'язків з вірусною мембраною та РНП [98]. Таким чином, вірус грипу через ендозитоз та систему ендосом забезпечує необхідні умови для потрапляння власного геному у цитоплазматичний простір клітини.

1.4.2 Транскрипція та трансляція вірусних білків

Наступним кроком після вивільнення вірусного геному у цитоплазму клітини є його транспортування до ядра. Враховуючи попередньо описане формування ендолізосом, РНК вірусу вивільняється одразу у перинуклеарний простір. Імпорт в середину ядра відбувається за імпортин- α -імпортин- β транспортним шляхом з

залученням NLS на нуклеопротейнах. За рахунок того, що NLS орієнтовані назовні після дисоціації M1, комплекси РНП можуть рекрутувати адаптерний імпортин- α [99]. У свою чергу імпортин- α розпізнається транспортним рецептором імпортином- β , який направляє РНП до ядерно порового комплексу, і таким чином генем IAV потрапляє у ядро. За допомогою застосування флуоресцентних міток було показано, що усі вісім фрагментів РНК транспортуються разом, і вже потім розділяються [100].

Синтез вірусної мРНК здійснюється РНК полімеразою у складі РНП. Він також залежить від активності клітинної РНК полімерази II, оскільки для цього необхідний 5' m7G-кепований РНК-праймер, запозичений з клітинних пре-мРНК (цю подію назвали cap-snatching) [101]. Власне захоплення праймера відбувається через кеп-з'вязуючий домен субодиноці PB2, а за його відщеплення від пре-мРНК відповідає субодиноця PA. Належне функціонування обох субодиноць забезпечується через їх конформаційні перебудови, індуковані попереднім зв'язуванням 5'-кінця вірусної РНК з RdRp [102]. Каталітичний центр RdRp знаходиться у порожнині активного центру субодиноці PB1, яка містить 4 канали: 2 для входу матриці та нуклеотидів, і 2 для виходу матриці і продукту. Пре-ініціація транскрипції починається з інсерції праймерної петлі PB1 у місце виходу матриці, її часткова екструзія забезпечує місце для зв'язування перших 2 нуклеотидів вірусної РНК та розщепленого 3'-кінця клітинної мРНК. Це достатньо стабілізує дуплекс, щоб запустити процес елонгації [103]. Після утворення 9-нуклеотидного дуплексу, стабілізованого за рахунок ван-дер-ваальсових та полярних взаємодій, частина PB2 направляє РНК та мРНК у відповідні виходи. 3'-кінець вірусної РНК направляється до вторинного сайту зв'язування, а енергія, утворена транслокацією, направляється на конформаційні перебудови нуклеопротейнів, що забезпечує рух RdRp по РНК [104]. Утворена мРНК дисоціює з кеп-зв'язуючого домену PB2 і процес транскрипції продовжується до 5'-петлі матриці, з'єднаної з вірусною RdRp, яка не дозволяє подальшу транслокацію нитки. Послідовність із 5-7 урацилів перед петлею

виступає сигналом до поліаденілювання вірусної мРНК, що відбувається за рахунок сповзання матриці та повторюваного копіювання урацилу (англ. reiterative stuttering) [105]. Далі відбувається вихід новосинтезованої мРНК з РВ1. За відсутності матричного ланцюга праймерна петля знову потрапляє у місце виходу матриці, повертаючи RdRp до стану пре-ініціації [105].

Після транскрипції кеп, полі(А)хвіст та нетрансльовані ділянки вірусної мРНК асоціюються з РНК-зв'язувальними білками, які рекрутують мРНК до ядерно-порового комплексу для експорту за допомогою NXF1/NXT1. У цитозолі білки дисоціюють з мРНК для її подальшої трансляції рибосомами, рекрутування яких відбувається через полі(А)-зв'язуючий білок 1 [106].

мРНК двох сегментів геному IAV – 7 і 8, можуть трансльоватися після сплайсингу або без нього. Без сплайсингу сегмент 7 кодує білок М1, тоді як сплайсовані версії кодують іонний канал М2, а у деяких штамів вірусу грипу – М42. мРНК сегмента 8 без сплайсингу трансльується у білок NS1, а сплайсована форма – NS2. Співвідношення між сплайсованими та несплайсованими мРНК сегмента 8 залишається однаковим протягом усього інфекційного процесу, тоді як у сегмента 7 переважають сплайсовані мРНК, тобто ті, що кодують білок М2 [107].

Трансляція вірусних білків повністю залежить від клітинної машинерії та відбувається переважно цитоплазматичними рибосомами, хоча мембранні білки НА, NA та М2 синтезуються ЕПР-асоційованими рибосомами [91]. Компоненти, необхідні для РНП (нуклеопротейіни та субодиниці РНК-полімерази РВ1, РВ2, РА), після синтезу транспортуються до ядра за тим самим механізмом, що і на початку життєвого циклу IAV. Там вони беруть участь у транскрипції, реплікації та формують нові РНП. При цьому NP та РВ2 імпортуються окремо, а РВ1 та РА у комплексі [108]. Білок NS2 як регулятор транскрипції/реплікації потрапляє у ядро через ядерно-поровий комплекс без допоміжних факторів завдяки своєму розміру [99].

Трансмембранні білки вірусу грипу трансльуються рибосомами на ЕПР.

Гемаглютинін має N-кінцеву ЕПР-сигнальну послідовність, яка відщеплюється і решта білка транслюється у просвіт ретикулуму. Коли С-кінцевий трансмембранний домен потрапляє у транслокон, відбувається його переміщення у мембрану. Таким чином, ектодомен НА знаходиться у просвіті ЕПР з коротким цитоплазматичним хвостом. Уже через 7-10 хв після трансляції відбувається формування тримерів НА [97].

Нейрамінідаза також містить N-кінцеву ЕПР-сигнальну послідовність, яка одночасно є і трансмембранним доменом. Перед вбудовуванням у мембрану, НА перевертається таким чином, щоб білок знаходився у просвіті ЕПР з невеликим цитоплазматичним хвостом. Формування тетрамерів відбувається за рахунок контакту димерів через трансмембранний домен [97].

Білок М2 замість ЕПР-сигнальної послідовності використовує трансмембранний домен. В результаті трансляції його орієнтація залишається такою, як у попередніх 2 білків – з С-кінцем направленим у цитоплазму. Точний механізм тетрамеризації М2 на сьогоднішній день залишається невивченим, але припускається, що у ньому беруть участь внутрішньо спіральні водневі зв'язки [97].

1.4.3 Реплікація вірусного геному

Реплікацію вірусу грипу можна розділити на 2 етапи. Під час першого з геномної (-)РНК (або vРНК) синтезується комплементарна (+)РНК (або kРНК), відповідно другим етапом буде синтез vРНК з kРНК.

Синтез kРНК має відмінні механізми ініціації та термінації від тих, що використовуються для транскрипції mРНК, оскільки kРНК не має кепу на 5'-кінці та полі(А)хвоста на 3'-кінці. Також вона має іншу структуру промотора, ніж попередник, що впливає на властивості її зв'язування з РНК полімеразою [109].

Вірусна RdRp здійснює як транскрипцію, так і реплікацію. Для переключення між цими процесами відбуваються її конформаційні зміни, яким передують проміжний стан, що характеризується заблокованим кеп-зв'язуючим доменом (CBD) та

скороченим каталітичним центром. Припускається, що зв'язування з клітинною полімеразою II вивільняє CBD і стабілізує транскрипційно-компетентну конформацію. Відповідно, для реплікації необхідно зв'язування з клітинним фактором регуляції транскрипції ANP32A та вільною вірусною RdRp [110]. Друга РНК полімераза (не зв'язана з РНП) забезпечує формування кРНП з новосинтезованої кРНК [111].

Ініціація 1 етапу реплікації починається з входження 3'-кінця вРНК у вторинний сайт зв'язування на поверхні RdRp, що дозволяє праймерній петлі PB1 утворити rppArG праймер. Формування останнього стабілізує вРНК у активному центрі та дестабілізує вРНК промотор [45]. Подальший рух вРНК внаслідок елонгації виштовхує праймерну петлю через вихід для матриці. Після утворення послідовності у 9 пар нуклеотидів, за подібним до транскрипції механізмом, частина PB2 направляє вРНК та кРНК у відповідні виходи. Вихід продукту ймовірно розташований таким чином, що кРНК спрямовується основною борозенкою ANP32A до сайту зв'язування 5'-петлі на другій RdRp [112]. Для захисту кРНК від розщеплення клітинними факторами, одразу починається її енкапсуляція нуклеопротеїнами, рекрутованими білком ANP32A, тобто утворюється кРНП. Відповідно, матрична РНК також зв'язується з NP після їх попередньої дисоціації. На моменті досягнення 5'-кінця вРНК, 5'-петля дисоціює з її сайту зв'язування, потрапляє у активний центр та виходить через вихід для матриці, щоб знову потрапити у сайт зв'язування. Механізм цієї події наразі залишається невивченим [111]. Після проходження 5'-петлі через активний центр, 3'-кінець кРНК вивільняється з полімерази, яка проводила реплікацію, та зв'язується з полімеразою, яка займалася інкапсуляцією кРНК. Таким чином, формуванням повноцінного кРНП завершується перший етап реплікації [111].

Другий етап реплікацій (синтез вРНК з кРНК) також потребує другої РНК-полімерази, фактора ANP32A, rppArG праймера та має загалом схожий механізм. Найбільшою відмінністю є власне формування праймера [44]. Промотор кРНК має

альтернативну конформацію, порівняно з таким вРНК. Це призводить до того, що 3'-кінець кРНК виходить за межі кінця вРНК [45]. Для ініціації формування праймера 3'-кінець кРНК потрапляє в активний центр. Там утворюється rppApG на рівні 4-UC-5. Після зв'язування з ANP32A та другою RdRp, 3'-кінець зміщується відносно праймера, так, що той опиняється на рівні 1-UC-2 [44]. Наступні події відбуваються аналогічно до першого етапу реплікації: після утворення 9 пар нуклеотидів РВ2 направляє кРНК та вРНК у відповідні виходи, 5'-кінець новосинтезованої РНК утворює комплекс з другою РНК-полімеразою, яка інкапсулює вРНК з утворенням РНП [111].

Підтвердженням подібного механізму реплікації є дослідження за допомогою електронної мікроскопії, що виявили розгалужені утворення, в яких менший РНП бере початок з більшого. Крім того, на місці з'єднання меншого комплексу з повнорозмірним РНП була RdRp, що є доказом реплікації за допомогою другої вільної полімерази [113].

1.4.4 Ядерний експорт та транспорт новосинтезованих РНП у цитоплазмі

Для транспорту новосинтезованих РНП з ядра вірус грипу експлуатує клітинний білок ядерного експорту CRM1 (або експортин 1). Процес експорту починається з того, що вірусний білок М1 зв'язується з РНП. До нього, в свою чергу, через С-кінець приєднується білок NS2. Контакт відбувається таким чином, щоб сигнал ядерної локалізації М1 був заблокований для запобігання повторному імпорту [114]. N-кінець NS2 містить сигнали ядерного експорту, які розпізнає CRM1. Зв'язування експортину з вірусним білком відбувається лише у тому випадку, якщо CRM1 був попередньо з'єднаний з RanGTP, який і забезпечує транспорт всього комплексу через ядерно поровий комплекс [40]. У цитоплазмі RanGAP сприяє формуванню RanGDP, що призводить до дисоціації CRM1 від утвореного вірусного комплексу і поверненню експортину у ядро [115].

Експортовані з ядра РНП взаємодіють з клітинною ГТФазою Rab11 для

транспортування до плазматичної мембрани. Rab11 зв'язується з PB2 субодиницею, забезпечуючи «контроль якості», який гарантує пакування у нові віріони саме vRNP, а не cRNP [116]. На сьогоднішній день достовірно невідомо, яким саме чином RNP транспортуються від ядра, проте існує дві можливі моделі цього процесу: за рахунок мікротрубочок та за допомогою мембран ЕПР.

Перша модель побудована на процесі рециркуляції ендосом та їх зворотного транспорту до клітинної мембрани. Власне Rab11 забезпечує переміщення R-ендосом (англ. recycling) через взаємодію з молекулярними моторами [117]. Відповідно, дана модель припускає, що RNP вірусу грипу через взаємодію з Rab11 на R-ендосомах транспортуються по системі мікротрубочок до мембрани, де вони вивільнюються за невизначеним механізмом [118].

Друга модель припускає, що взаємодія вірусних RNP з Rab11 на ЕПР призводить до формування витягнутого трубчастого ретикулуму. Таким чином, після формування комплексу з усіх RNP та Rab11, він відбруньковується, утворюючи нерівномірно вкриті везикули. Останні в свою чергу доставляють вірусний геном до плазматичної мембрани [119].

1.4.5 Збирання віріонів та їх вихід з клітини

Як уже зазначалось, віруси грипу виходять з клітини у ділянках мембрани, збагачених холестеролом та сфінголіпідами (так звані рафти), відповідно у цих же місцях попередньо відбувається збирання віріонів.

Гемаглютинін, нейрамінідаза та білок M2 транспортуються до мембрани незалежно від решти компонентів. HA попередньо транслокується у комплекс Гольджі, де відбувається його протеоліз на субодиниці HA1 і HA2. Далі, завдяки послідовностям трансмембранного домену та взаємодії з факторами Rab, HA у складі везикул потрапляє до цитоплазматичної мембрани [120]. Завдяки схожим послідовностям трансмембранного домену, HA використовує той самий шлях транспортування. Білок M2 вбудовується по краях рафту, зв'язуючись з

холестеролом [91].

Далі білок М1 рекрутується у місці майбутнього брунькування віріона за допомогою взаємодій з короткими цитоплазматичними хвостами НА, НА і М2. В першу чергу це стосується М1 у комплексі з РНП, що забезпечує пакування геному, проте вільний цитоплазматичний М1 також локалізується під мембраною. Його олігомеризація забезпечує вивільнення енергії і призводить до випинання мембрани, таким чином запускаючи процес брунькування [121].

Після того, як достатня кількість рафту випинається назовні клітини (сформований віріон), кількість холестеролу навколо М2 зменшується. Це, у свою чергу, призводить до викривлення мембрани у напрямку, протилежному напрямку брунькування, що призводить до розриву ліпідного бішару [122].

Незважаючи на розділені мембрани повністю сформованого віріона та клітини, ІАВ потребує ще одного кроку, для повного вивільнення у позаклітинний простір. Одразу після брунькування віріон залишається прикріпленим до поверхні клітини за рахунок взаємодії гемаглютиніну з сіаловими кислотами. Нейрамінідаза каталізує гідроліз глікозидного зв'язку залишків СК, таким чином вивільняючи вірусну частинку [17]. На цьому цикл репродукції вірусу грипу завершується.

1.4.6 Тривалість стадій життєвого циклу

Визначення локалізації вірусу у клітині під час його циклу репродукції є дуже важливим аспектом його вивчення, проте одночасно і складним завданням, особливо для ІАВ з його сегментованим геномом. Група вчених на чолі з D. Dou провели дослідження циклу вірусу грипу в клітинах MDCK та тканині легень з використанням РНК-міток [123]. Шляхом відслідковування кожного з 8 сегментів геному вони змогли проаналізувати та відтворити динаміку прогресу репродукції ІАВ. Таким чином, було визначено, що ендоцитоз з послідовним виходом віріона з везикули триває до 30 хв від початку інфекції – далі в.п.і. (за початок вважали етап взаємодії гемаглютиніну з рецепторами на клітині). Імпорт сегментів геному у ядро

починається на 15-30 хв в.п.і. в залежності від множинності інфекції. Від останньої також залежав і початок реплікації, який спостерігали з 30-60 хв в.п.і. Експорт новосинтезованої вірусної РНК починався з 5 год в.п.і., а масовий вихід віріонів з клітини фіксували вже на 6 год в.п.і. Крім того, був визначений вміст НА і НА у позаклітинному середовищі: незначна кількість була ідентифікована вже з 4 год в.п.і., просте чітке зростання спостерігали починаючи з 7 год в.п.і.

РОЗДІЛ 2

СУЧАСНИЙ СТАН РОЗВИТКУ ПРОТИГРИПОЗНИХ ПРЕПАРАТІВ

Інфекція, спричинена вірусом грипу типу А, характеризується дуже коротким інкубаційним періодом – від 2-3 годин до 1-3 діб, та стрімким розвитком інтоксикації, що значно погіршує самопочуття хворої людини.

Залежно від ступеня тяжкості, виділяють легку, середньо тяжку, тяжку та блискавичну (гіпертоксичну) форми грипу. Найчастіше при тяжкій формі спостерігають різноманітні ускладнення, блискавична ж як правило закінчується смертю на 2-3 добу (без належної медичної допомоги). Переважна кількість випадків інфекцій (легкі та середньої тяжкості) закінчується повним одужанням, яке триває до 2 тижнів, водночас у багатьох хворих ще довго спостерігаються втомлюваність, порушення сну, пітливість та сенсорна чутливість.

Пандемічні штами вірусу грипу часто мають симптоми нетипові для сезонних штамів та низку особливостей, які і забезпечують їхню широку поширеність. Штам, що спричинив пандемію 2009 року – (H1N1)pdm09 – сильно відрізнявся від циркулюючих H1N1, оскільки вакцинація від сезонних штамів практично не забезпечувала захисту від нього. Крім того, в основному вірус уражав дітей, молодь та людей середнього віку [124]. За оцінками, у світі 80% смертей, пов'язаних з (H1N1)pdm09, сталися серед людей віком до 65 років. Це суттєво відрізняється від динаміки сезонних епідемій грипу, під час яких 70-90 % смертей припадає на людей віком >65 років. За перші 12 місяців загальносвітова смертність під час пандемії 2009 року склала в середньому 201 тис. випадків, при цьому смертність від серцево-судинних захворювань, пов'язаних з (H1N1)pdm09, становила додаткових 83 тис. смертей (в середньому) [125]. Статистично, смертність від усіх сезонних штамів вірусів грипу (включаючи типи А і В) сумарно в середньому становить 401 тис. випадків на рік [126].

Окрім впливу на систему охорони здоров'я, сезонна захворюваність разом із

пандеміями чинить значний довготривалий вплив на економіку (як окремих країн, так і світу в цілому). Зокрема, прямий ефект проявляється у витратах на медичне обслуговування та діагностику, а непрямий – у тимчасовій втраті працездатності частини населення та наслідках цієї втрати. Тому для будь-якого значного спалаху вірусу вкрай важливою є наявність протівірусних препаратів. За умови своєчасного та належного впровадження вони можуть знизити вірусне навантаження, обмежити передачу та допомогти впоратися з тяжкими інфекціями, тим самим знижуючи захворюваність та смертність. Наявність ефективних ліків є першою ланкою боротьби з пандемічними емерджентними штамами, поки не стануть доступні ефективні вакцини. Для сезонних збудників протівірусна терапія є важливою для осіб, що належать до груп ризику. Вона дозволяє знизити частоту виникнення ускладнень, полегшити перебіг захворювання та зменшити час госпіталізації.

2.1 Ситуація на світовому фармацевтичному ринку

Наразі на фармацевтичному ринку є кілька типів зареєстрованих протигрипозних препаратів в залежності від мішені дії: інгібітори білка M2 (адаманти), інгібітори нейрамінідази та інгібітори РНК-залежної РНК полімерази.

До класу адамантанів з протигрипозною активністю належать 2 речовини амантадин та римантадин. Історично амантадин був першим протівірусним препаратом для боротьби з грипом та застосовувався з 1970-х років, поки у 2006 році не було рекомендовано припинити його широке використання через велику поширеність резистентності серед різних штамів [3]. Мішенню дії адамантанів є вірусний іонний канал M2, а саме його трансмембранний домен. У межах свого сайту взаємодії сполуки не зв'язуються з високо консервативними амінокислотними залишками H37 та W4, а натомість взаємодіють з V27, A30, S31 та G34 [127]. Ці особливості зв'язування молекул сприяють швидкому розвитку резистентності тому що, навіть одна заміна амінокислоти в положенні 26, 27, 30, 31 або 34 білка M2 призводить до несприйнятливості клінічних ізолятів вірусу грипу типу А. Для

штамів H3N2 та H1N1 у 95% випадків спостерігали заміну S31N, при цьому набута стійкість не впливала на реплікативну здатність та трансмісійність вірусу [128]. Крім того, несприйнятливість вірусу до адамантанів може бути наслідком природних мутацій, оскільки мутанти S31N почали циркулювати ще до початку широкого використання амантадину [17].

2.1.1 Зареєстровані препарати-інгібітори нейрамінідази

Інгібітори нейрамінідази наразі є найбільшим та найбільш використовуваним у світі класом протигрипозних ліків. Вони включають 4 препарати: занамівір, озельтамівір, перамівір та ланінамівір. Рекомендований період застосування для всіх представників є 48 год від прояву симптомів, що пов'язано з піком реплікації вірусу у респіраторному тракті (24-72 год в.п.і.). Історично першим серед них став занамівір, який був відкритий та затверджений для використання у 1990-х роках [129].

Усі чотири представника даного класу мають в основі молекули 2,3-дегідро-2-дезоксид-N-ацетилнейрамінову кислоту (DANA), яка є інгібітором сіалідаз. Структура занамівіру, крім DANA, містить позитивно заряджену гуанідинову групу, що призводить до утворення міцних водневих зв'язків з амінокислотами активного центру NA [129]. Проте його біодоступність є невеликою (до 5% при пероральному застосуванні), тому як спосіб використання затверджено інгаляції у комбінації з моногідратом лактози. Завдяки цьому основна маса препарату дислокується у ротоглотці, що є вхідними воротами інфекції. При цьому інгаляції значно обмежують доступність препарату, зручність його застосування та не підходять для пацієнтів з алергією на лактозу та дітей молодше 5 років. Також для госпіталізованих пацієнтів з тяжким перебігом інфекції був розроблений внутрішньовенний спосіб використання занамівіру [130].

Молекула озельтамівіру створена на основі модифікацій DANA з додаванням циклогексану, аміногрупи C4 та аліфатичного бічного ланцюга. Такий склад

дозволяє перорально приймати даний препарат у вигляді озельтамівіру фосфату, який метаболізується в печінці карбоксилестеразами до своєї активної форми – озельтамівіру карбоксилату. Завдяки цьому загальна біодоступність препарату становить не менше 80% дози [129]. Крім цього для озельтамівіру було підтверджено високий рівень безпечності та відсутність репродуктивної токсичності, онкогенних і мутагенних ефектів. Він добре переноситься пацієнтами, а найпоширенішими побічними ефектами є головний біль та розлади травної системи (>10%) після першого прийому, які спонтанно проходять за пару діб. В загальному озельтамівір рекомендований Європейським агентством з лікарських засобів (ЄАЛЗ) для використання для дорослих, дітей та немовлят (від 2 тижнів) [131].

Перамівір також був створений на основі модифікацій DANA (циклопентан) і певною мірою поєднує структурні особливості занамівіру та озельтамівіру (гуанідинову групу та аліфатичний бічний ланцюг). Таким чином структура молекули дозволяє залучити обидві гідрофільні кишені нейрамідідази. Формування більшої кількості зв'язків призводить до підвищеної афінності перамівіру порівняно з іншими інгібіторами NA та надає перевагу у його використанні проти штамів, резистентних до занамівіру та озельтамівіру [132]. Проте, через низьку біодоступність ($\leq 3\%$) за умови перорального застосування, перамівір було рекомендовано до внутрішньовенного способу введення. Перевагою даного препарату є його одноразове введення, хоча сама доза є досить високою (600 мг). Це спрощує режим лікування та забезпечує альтернативу пацієнтам, у яких є проблеми з ковтанням. Здебільшого перамівір добре переноситься, а найпоширенішими побічними ефектами є нейтропенія та діарея. Він рекомендований для дорослих та дітей віком від 2 років. Також вказують на потенційний вплив перамівіру на ефективність живих атенуйованих вакцин проти грипу: введення препарату протягом 2 тижнів після вакцинації, може негативно вплинути на імуногенність вакцини [129].

Ланінамівір структурно подібний до занамівіру та відрізняється лише заміною однієї з гідроксильних груп на метиловий ефір у бічному ланцюзі тріолу. Завдяки цьому даний препарат вирізняється тривалістю дії і застосовується у вигляді 1 дози шляхом інгаляції порошку. Подібно до озельтамівіру фосфату, ланінамівір октаноат метаболізується у епітеліальних клітинах дихальних шляхів естеразами до своєї активної форми. Препарат загалом є безпечним: серед найчастіших побічних ефектів зазначають кашель, діарею та головний біль [129]. Він затверджений до використання у дорослих та дітей, в тому числі дітей молодше 5 років [133].

Серед інгібіторів нейрамінідази найбільш розповсюдженими у світі є озельтамівір та занамівір. Перамівір затверджений для використання у США, Китаї, Японії та Південній Кореї, а ланінамівір наразі лише у Японії [130]. Завдяки своїй поширеності, а також часу, проведеному на фармацевтичному ринку, занамівір та озельтамівір мають найбільшу дослідну базу, яка стосується їхньої ефективності у лікуванні грипу. Усі інгібітори нейрамінідази сприяють швидшому полегшенню стану пацієнтів з лихоманкою та осіб, що відносяться до груп ризику. Занамівір демонструє зменшення періоду поліпшення основних симптомів на 3 доби за умови прийому до 30 год від початку їх прояву, а також зменшення ризику ускладнень пов'язаних з ураженням середнього вуха у 2-4 рази. При цьому внутрішньовенний прийом занамівіру не має значних переваг у часі одужання перед озельтамівіром. Останній же сприяє зменшенню тяжкості інфекції на 38% та скорочує тривалість захворювання більш ніж на 3 доби за умови прийому у перші 12 год від початку прояву симптомів. Він також знижує ризик ускладнень пов'язаних з ураженням середнього вуха на 44%. Перамівір має незначні переваги у застосуванні для дорослих пацієнтів порівняно з озельтамівіром, але здебільшого вони стосуються виключно одноразовості дози. Проте у лікуванні дітей спостерігали зменшення часу лихоманки у 3 рази, порівняно з озельтамівіром. Ланінамівір не має переваг у лікуванні порівняно з іншими інгібіторами нейрамінідази, крім способу застосування [129].

Окрім безпосереднього лікування інгібітори нейрамінідази також рекомендовані для постконтактної профілактики. Так, за оцінками їх ефективність становить: близько 80% для занамівіру, від 70 до 90% для озельтамівіру та близько 62% для перамівіру [129].

Подібно до ситуації з адамантанами, резистентність до інгібіторів нейрамінідази може бути набута як після їх використання, так і шляхом природних мутацій. Каталітичний сайт NA утворюють 8 основних консервативних залишків амінокислот та 11 допоміжних: R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371, Y406, E119, R156, W178, S179, D198, I222, E227, H274, E277, N294, та E425. Будь-яка мутація серед них може зменшити афінність інгібіторів. Також, завдяки схожій структурі сполук, мутації, що знижують сприйнятливість вірусу до одного з інгібіторів нейрамінідази, також можуть вплинути на чутливість до іншого. Однією з найбільш розповсюджених замінів амінокислот є H275Y, відповідальна за резистентність штаму (H1N1)pdm09 до озельтамівіру під час пандемії 2009 року. При цьому вона не впливає на чутливість до занамівіру. Також, заміна R292K відповідає за знижену сприйнятливість до усіх інгібіторів нейрамінідази, крім ланінамівіру. Хоча, зважаючи на структурну подібність занамівіру з ланінамівіром, амінокислотні заміни для цих двох інгібіторів з високою ймовірністю мають перекриватися [130].

Останні дослідження частки резистентних штамів IAV до інгібіторів нейрамінідази вказують на загалом невисокий відсоток: до 0,6% за період 2018-2020 років та до 0,2% за 2020-2023 роки (усереднено для усіх штамів). Проте, варто зазначити, що за період пандемії COVID-19 циркуляція вірусів грипу значно знизилася, та почала зростати до попередніх темпів лише у сезоні 2022-2023. При цьому у 2018-2020 роках частка резистентних до озельтамівіру та занамівіру вірусів серед (H1N1)pdm09 складала 1,3% [134]. Хоча в загальному вірус грипу типу А залишається сприйнятливим до інгібіторів нейрамінідази, пандемічний потенціал штаму H1N1 та поширеність резистентності серед нього викликають занепокоєння.

2.1.2 Зареєстровані препарати-інгібітори вірусної полімерази

Інгібітори полімерази вірусу грипу є найновішою групою затверджених препаратів. Специфічний виключно до вірусу грипу препарат – балоксавіру марбоксил – був розроблений в Японії та вперше затверджений до використання там у 2018 році, а у Європі – у 2021 році [135]. Сама сполука при пероральному прийомі гідролізується у епітелії кишківника до активної форми – балоксавірової кислоти (ВХА), що є складною 6-циклічною сполукою, яка містить оксазин-піридоотриазиндіонову полярну групу та ліпофільну дифтордигідродибензотієпінову групу. ВХА блокує реплікацію вірусу грипу шляхом селективного зв'язування з РА-субодиницею RdRp [129]. Остання відповідає за відщеплення праймера від клітинних пре-мРНК, відповідно, блокування її функції унеможливорює ініціацію транскрипції. За рахунок групи, здатної до хелатування двовалентних іонів металів у складі молекули, ВХА взаємодіє з Mn_2^+ у активному центрі РА. Крім того, ВХА утворює ван-дер-ваальсові взаємодії з Ala20 і Tyr24 α -2 спіралі та K34, A37 і I38 α -3 спіралі РА; а також водневі зв'язки з M34 та L35 основного ланцюга, таким чином перешкоджаючи її ендонуклеазній активності [136]. Відповідно, було визначено, що за розвиток резистентності відповідають мутації амінокислот I38 та E23, при цьому заміни I38T/M значно знижують чутливість до балоксавіру, а E23K має менший вплив [137].

Через тривалий період напіввиведення з плазми, балоксавіру марбоксил застосовується шляхом однієї дози перорально та рекомендується до використання у перші 48 год з моменту появи симптомів. Також важливим нюансом є те, що препарат не слід приймати з речовинами, що містять полівалентні катіони (залізо, цинк, селен, кальцій або магній) [138]. Незважаючи на відносну новизну балоксавіру, він вважається безпечним, а найбільш часто зустріваними побічними ефектами є розлади шлунково-кишкового тракту. Кілька масштабних рандомізованих досліджень вказують на схожість ефективності балоксавіру з такою озельтамівіру, проте ВХА демонструє значну перевагу у зменшенні часу до

припинення виділення вірусу (на 48 год швидше у порівнянні з озельтамівіром) [139].

Спочатку застосування препарату було затверджене лише для пацієнтів старше 12 років, проте подальші дослідження встановили прийнятне співвідношення ризик/користь у дітей віком 5-11 років, хоча у пацієнтів <5 років спостерігали вищу частоту мутації I38X [139]. При цьому ЄАЛЗ допускає застосування балоксавіру для дітей віком від 3 тижнів [138].

Глобально, частка резистентних до балоксавіру штамів IAV за сезон 2022-2023 року становила 0,12%, при цьому у Японії, де даний препарат широко вживаний, вона складала 3,3%. Найчастіше за зниження чутливості відповідали заміни I38T/M/L [134].

Також в Японії (і лише там станом на 2025 рік) для лікування тяжкої інфекції вірусом грипу є затвердженим ще один інгібітор RdRp – фавіпіравір. Цей препарат є аналогом нуклеозидів, який фосфорилується клітинними кіназами та вбудовується в ланцюг вірусної РНК під час елонгації, що спричиняє численні летальні мутації та/або зупинку зростання ланцюга. Фавіпіравір є активним проти багатьох РНК-вірусів, включаючи віруси грипу типу А та В, де він діє як інгібітор субодиниці РВ1 RdRp [140]. Серед недоліків даного препарату є його порівняно висока доза застосування, а також серйозні побічні ефекти, включаючи можливу тератогенність. Але, оскільки поки не було виявлено резистентних до фавіпіравіру штамів серед клінічних зразків, він залишається запасним варіантом для можливих пандемій [140].

2.2 Протівірусні агенти на стадії розробки

Загалом сучасну розробку антивірусних препаратів, направлених на віруси грипу, можна розділити на кілька напрямків. Доволі широко розвиненим є створення нейтралізуючих моноклональних антитіл, націлених на головку (розпізнавання рецептора) і ніжку (злиття мембран) гемаглютиніну, на

нейрамінідазу, а також на білок M2. Серед них успіху досягли VIS-410, ST-P27 та TCN-032, які наразі знаходяться на стадії клінічних досліджень [140]. Популярним у всіх сферах розробки ліків є також перепрофілювання вже затверджених для використання препаратів. Наприклад, напроксен (нестероїдний протизапальний препарат) проявив здатність до блокування взаємодії нуклеопротеїну IAV з клітинним білком CRM1, що забезпечує експорт РНП з ядра [141]. Також багато дослідників використовують вже працюючі хімічні скефолди як основу для створення нових сполук. Так, на основі молекули балоксавіру був розроблений ZX-7101, що проявив активність проти багатьох штамів IAV [142]. Для боротьби з резистентністю шукають також сполуки з новими механізмами дії, націлені як на вірусні структури, так і на клітинні. Серед них потенціал мають ZSP1273 – інгібітор субодиниці PB2 RdRp та DAS181 – пептид, здатний до розщеплення залишків сіалових кислот, перешкоджаючи тим самим проникненню IAV у клітини [143, 144].

2.2.1 Органічні сполуки з протигрипозним потенціалом

Велика кількість органічних хімічних сполук наразі знаходиться на етапі доклінічних досліджень. Деякі вчені націлюють створені структури на звичні цілі (NA, NA, PA), але багато також використовують нові вірусні та клітинні мішені.

Група дослідників на чолі з Kati M. вибрали нейрамінідазу як мішень, проте вони застосували підхід пошуку нових скефолдів. Так, на основі піролідину було створено A-315675, що успішно інгібував N1, N2, та N9 вірусу грипу типу А. Крім того, його особливістю є швидкість дисоціації з активного центру NA: при дослідженні відносно штаму H3N2 час розпаду рецептор-лігандного комплексу становив 10-12 годин, порівняно з 33-60 хв для озельтамівіру карбоксилату [145]. Bauman J. та ін. запропонували ряд гідроксипіридинонів з різними замісниками, як метал-хелатуючих сполук на роль інгібіторів ендонуклеазної активності субодиниці PA RdRp. Одна із структур продемонструвала потенціал у флуоресцентному

ферментативному аналізі ($IC_{50} = 11 \text{ нМ}$), а також проявила активність відносно IAV H1N1 у клітинах MDCK ($EC_{50} = 11 \text{ мкМ}$) [146].

З точки зору нових мішеней дії препаратів, їх можна розділити на структурні та неструктурні білки IAV. Оскільки нуклеопротеїн вірусу відіграє дуже важливу роль, Yang F. та ін. відкрили сполуку FA-6005 (ароматичний амід), націлену на нього. FA-6005, спрямований на консервативний домен NP, успішно пригнічував реплікацію різних штамів IAV, включаючи H1N1 та H1N1pdm09, зокрема порушуючи внутрішньоклітинний транспорт вірусних РНП на усіх стадіях репродукції [147]. Стосовно інгібування субодиниці PB1 RdRp наразі повідомляється про ряд молекул ненуклеозидного типу. Серед них особливо виділяється робота Liu X. та ін., де вони провели дослідження групи сполук похідних арил бензоїл гідразиду. Серед них одна речовина (11q) продемонструвала протівірусну активність проти IAV H1N1 у культурі клітин, на моделі мишей, а також мала гарну пероральну біодоступність [148]. Вірусний білок NS1, як згадувалося раніше, має багато функцій для забезпечення успішної репродукції вірусу, тому також є привабливою мішенню. Kleinpeter A. продемонстрували, що механізм дії аналогів фенілпропіламіду та бензаміду, які попередньо показали високу активність відносно IAV H1N1 у культурі клітин, полягає саме у взаємодії з NS1. Точніше, структури взаємодіють з гідрофобною кишенею NS1, необхідною для його зв'язування з клітинним фактором CPSF30, що не дозволяє вірусу зупинити ядерний експорт клітинних мРНК та ІФН-опосередковану імунну відповідь [149].

Також окремим напрямком розробки ліків наступного покоління є інгібітори білок-білкових взаємодій субодиниць RdRp, оскільки для виникнення резистентності до цього класу речовин необхідні дві або більше комплементарні мутації в обох субодиницях, частота виникнення яких є низькою. Nannetti G. та ін. продемонстрували здатність речовин на основі циклогептатіофен-3-карбоксамідного скефолду блокувати білкові взаємодії між субодиницями PA та PB1 RdRp. Деякі з досліджуваних ними сполук пригнічували репродукцію різних

штамів IAV, включаючи H1N1, у культурі MDCK та характеризувалися відсутністю цитотоксичності. Крім того, після серійних пасажувань вірусу під тиском селекції препарату не виникло жодних вірусних варіантів зі зниженою чутливістю до вибраних сполук [150].

Серед речовин, направлених не на вірусні мішені, а на клітинні досить перспективною є M85 – гетероциклічна сполука з піридиновим, тріазоловим та піридазиновим кільцями у складі. Створена O'Hanlon R та ін., вона інгібує широкий спектр вірусів, включаючи IAV H1N1, та має низьку цитотоксичність. Механізм дії M85 полягає у тому, що вона взаємодіє з рецептором епідермального фактору росту EGFR та кіназою PK3C2 β , які контролюють ранні стадії ендоцитозу, тим самим унеможлиблюючи потрапляння вірусу у клітину. Крім того, на моделі мишей було продемонстровано, що комбінація M85 з озельтамівіром має кращу ефективність, порівняно з використанням тільки озельтамівіру [151].

2.2.2 Наноструктури з протигрипозним потенціалом

Нанобіотехнологія, як відносно нова та стрімко прогресуюча галузь науки, дозволяє покращувати класичні біотехнологічні методи та створювати нові підходи до вирішення проблем сьогодення. Наноматеріали (1–100 нм) завдяки своїм унікальним властивостям, таким як малі розміри, високе співвідношення поверхні до об'єму та можливість модифікації поверхні, дуже активно впроваджується для використання у сферах здоров'я (бактерицидні/фунгіцидні препарати, біодобавки), косметології (сонцезахисні продукти, зубні пасти, пудри), сільського господарства (нанодобрива, нанопестициди) та навіть харчування (консерванти) [152]. Крім того, наночастинки (НЧ) металів, структури карбону, нанотрубки, полімери та наномембрани активно досліджуються в якості противірусних агентів та систем доставки ліків. На сьогоднішній день наноматеріали вже продемонстрували свою ефективність відносно багатьох РНК вірусів: ВІЛ, SARS-CoV-2, вірус гепатиту А, норовірус, вірус ящуру, вірус Зіка та різні штами IAV. Вони здатні пригнічувати

їхню репродукцію напряду через взаємодію з віріонами, вірусними білками та/або геномом, або опосередковано за рахунок індукції несприятливого середовища (стимуляція ІФН та ІФН-індукованих генів) [153]. Для боротьби з вірусом грипу використовують різні стратегії нанобіотехнології з застосуванням НЧ срібла, золота, міді, селену діоксидів кремнію, титану, а також карбонових наноструктур [154].

НЧ срібла здатні до зв'язування з багатьма молекулами та мають широкий спектр антивірусної дії, включаючи інгібування проникнення вірусів у клітину. Так, Fatima M. та ін. продемонстрували активність НЧ срібла діаметром 25-55 нм, отриманих за допомогою *Cinnamomum cassia*, відносно штаму H7N3 вірусу грипу типу А. НЧ пригнічували інфекцію IAV, як при інкубації з вірусом до інфікування клітин, так і після встановлення інфекції. Крім того, вони також показали відсутність цитотоксичності у культурі Vero [155]. Naumenko K. та ін. досліджували активність НЧ срібла діаметром 10 нм, покритих природними смолами, відносно штаму H1N1. Їхні результати вказують на наявність у НЧ ефекту на репродукцію вірусу, як через безпосередній вплив на віріони, так і шляхом взаємодії з вірусними структурами всередині клітини [156]. Можливість взаємодії срібла з гемаглютиніном IAV H1N1 показали Dong-xi X. та інші. Їхні НЧ діаметром 10 нм проявили інгібуючий вплив на гемаглютинацію еритроцитів курчат, а також значно пригнічували репродукцію IAV у клітинах MDCK [157]. Для НЧ срібла також була продемонстрована активність *in vivo*. Синтезовані Xiang D. та ін., НЧ діаметром 9,5 нм інгібували репродукцію IAV H3N2 не тільки у культурі MDCK, а і зменшували вірусні титри у інфікованих мишей при інтраназальному введенні [158].

Також, НЧ можуть підвищувати ефективність препаратів, а саме їхню розчинність, стабільність, збільшити період напіввиведення та забезпечити тривале вивільнення активного компонента. Так, Li та ін. успішно кон'югували амантадин та озельтамівір із НЧ срібла. В обох випадках це призвело до дестабілізації вірусних часток IAV H1N1 та вплинуло на їхню здатність до гемаглютинації курячих еритроцитів; до підвищеної виживаності інфікованих клітин; та до зменшення

частки апоптотичних клітин за рахунок зниження внутрішньоклітинних активних форм кисню (ROS) [159].

Карбонові наноструктури є привабливими для використання з точки зору безпечності та біосумісності. Серед них фулерени, як міждисциплінарний об'єкт досліджень, займають особливе місце. Класичний фулерен C_{60} є повністю вуглецевою сферичною тривимірною структурою, недоліком якого зі сторони застосування у галузях біології та медицини є гідрофобність [160]. Але при цьому його зовнішня поверхня легко піддається модифікаціям, і, до прикладу, гідроксилування вирішує вищезгадану проблему. На сьогоднішній день похідні фулеренів продемонстрували ряд активностей: антиоксидантну, протиракову, антибактеріальну та противірусну (ВІЛ, вірус гепатиту С, вірус Зіка, вірус Денге, вірус Ебола тощо) [161]. Shoji M. та ін. були одними з перших, хто показав активність похідних фулеренів на вірус грипу типу А штам H1N1. Вони досліджували 12 похідних C_{60} з різними функціональними групами на поверхні, та визначили, що 8 з них інгібували ендонуклеазну активність субодиниці PA RdRp. Також, у системі культури MDCK кілька похідних пригнічували репродукцію вірусу та експресію нуклеопротеїну і NS1 [162]. Вченим на чолі з Zhu X. вдалося синтезувати водорозчинні похідні C_{60} з циклодекстрином, що проявили низьку цитотоксичність та здатність до пригнічення репродукції IAV H1N1 у клітинах MDCK [163]. Ще одне широке дослідження водорозчинних похідних $C_{60}Cl_6$ продемонструвало їхню активність відносно кількох штамів IAV, де наноструктури успішно пригнічували репродукцію IAV [164].

Таким чином, за умов відповідної оптимізації параметрів біосумісності, токсичності та стабільності, наноструктури можуть бути використані для лікування та профілактики вірусних інфекцій. Проте найкращий їхній потенціал – це застосування у якості дезінфікуючих агентів у складі полімерів та нанокомпозитів для обмеження передачі вірусів та підвищення безпеки середовища для людини.

РОЗДІЛ 3

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

3.1 Матеріали

3.1.1 Культура клітин та віруси

Для виконання експериментів з дослідження цитотоксичності та противірусної активності використовували культуру клітин MDCK (клітини нирки собаки Мадіна-Дарбі). Дана культура є сприйнятливою до вірусів грипу і використовуються як стандартна модель інфекції. Клітини були надані Інститутом епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України.

Вірус грипу типу А (H1N1) штам A/FM/1/47 отриманий із колекції Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України.

Дослідження противірусної активності на клінічних штаммах вірусу грипу типу А (H1N1)pdm09 А/Київ/1677/2024 ($\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл} = 8,42$) та вірусу грипу типу В штам В/Київ/1860/2024 лінія Вікторія ($\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл} = 5,17$) були проведені на базі Київського міського центру контролю та профілактики хвороб МОЗ України. Віруси були виділені з носоглоткових змивів пацієнтів з діагнозом тяжке гостре респіраторне захворювання у осінньо-зимовий епідемічний сезон 2023-2024 років.

3.1.2 Досліджувані органічні сполуки

Усі досліджувані в роботі органічні сполуки були надані к.х.н. Шалімовим О.О. та д.х.н., проф. Шермолевичем Ю.Г. з Інституту органічної хімії НАН України у вигляді порошкоподібних субстанцій. Відповідно до структури, сполуки було поділено на групи: флуоровмісні β -N-бензотіазоліл глікозиди (таблиця 3.1), галогеновмісні [1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензімідазоли (таблиця 3.2), флуоровмісні похідні тіофену (таблиця 3.3), та флуоровмісна сполука на основі тетрагідропіран-2-тріазолу – біс(5-дифлуорометил-2-(тетрагідропіран-2-іл)-2H-1,2,3-тріазол-4-іл)-сульфон з кодовою назвою 10S-47 ($MW = 468,12$).

Таблиця 3.1 Флуоровмісні β -N-бензотіазоліл глікозиди

| Кодова назва | Назва за IUPAC | Молекулярна маса |
|--------------|--|------------------|
| 10S-52 | 6- β -D-глюкопіранозиламіно-2-(трифлуорометил)-1,3-бензотіазол | 380,34 |
| 10S-53 | 6- β -D-глюкопіранозиламіно-2-(пентафлуоро- λ 6-сульфаніл)-1,3-бензотіазол | 483,03 |
| 10S-54 | 4- β -D-глюкопіранозиламіно-2-(трифлуорометил)-1,3-бензотіазол | 380,34 |
| 10S-55 | 4- β -D-глюкопіранозиламіно-2-(пентафлуоро- λ 6-сульфаніл)-1,3-бензотіазол | 483,03 |

Субстанції флуоровмісних β -N-бензотіазоліл глікозидів вагою 10 мг були розчинені у 1 мл ДМСО для приготування стокових розчинів.

Таблиця 3.2 Галогеновмісні [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензimidазоли

| Кодова назва | Назва за IUPAC | Молекулярна маса |
|--------------|---|------------------|
| 2618 | 3-метил-5H-[1,2,6]тіадіазино[2,3-а]бензimidазол-4-метил-1,1-діоксид | 249,06 |
| 1792 | 3-(дифлуорометил)-2H-[1,2,6]тіадіазино[2,3-а]бензimidазол-4-нітрил-1,1-діоксид | 296,25 |
| 1752 | 3-[бромо(дифлуоро)метил]-5H-[1,2,6]тіадіазино[2,3-а]бензimidазол-4-нітрил-1,1-діоксид | 373,93 |
| 1790 | 3-(трихлорометил)-5H-[1,2,6]тіадіазино[2,3-а]бензimidазол-4-нітрил-1,1-діоксид | 361,92 |
| 1634 | етил 3-метил-5H-[1,2,6]тіадіазино[2,3-а]бензimidазол-4-карбоксилат-1,1-діоксид | 307,06 |
| 1870 | етил 3-(дифлуорометил)-5H-[1,2,6]тіадіазино[2,3-а]-бензimidазол-4-карбоксилат-1,1-діоксид | 343,04 |
| 1796 | етил 3-[бромо(дифлуоро)метил]-5H-[1,2,6]тіадіазино- [2,3-а]бензimidазол-4-карбоксилат-1,1-діоксид | 420,95 |
| 1782 | етил 3-(трихлорометил)-5H-[1,2,6]тіадіазино[2,3-а]- бензimidазол-4-карбоксилат-1,1-діоксид | 408,95 |

Для досліджень було взято по 10 мг [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензімідазолів та розчинено у 0,5 мл 100% ДМСО, таким чином концентрація робочих розчинів становила 20 мг/мл.

Таблиця 3.3 Флуоровмісні похідні тіофену

| Кодова назва | Назва за IUPAC | Молекулярна маса |
|--------------|--|------------------|
| 10S-45 | (2RS,5SR)-2-гідроксиметил-2-(трифлуорометил)тетрагідротіофен-5-ол та (2SR,5SR)-2-гідроксиметил-2-(трифлуорометил)тетрагідротіофен-5-ол | 202,03 |
| 10S-46 | 1-((2RS,5SR)-2-гідроксиметил-2-(трифлуорометил)тетрагідротіофен-5-іл)-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-2,4-діон та 1-((2SR,5SR)-2-гідроксиметил-2-(трифлуорометил)тетрагідротіофен-5-іл)-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-2,4-діон | 296,04 |
| 10S-48 | 1-((2RS,4RS,5RS)-4-гідрокси-2-гідроксиметил-2-(трифлуоро-метил)тетрагідротіофен-5-іл)-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-2,4-діон | 312,04 |
| 10S-49 | (2SR,4SR,5SR)-2-гідроксиметил-2-(трифлуорометил)тетрагідротіофен-4,5-ол та (2SR,4SR,5RS)-2-гідроксиметил-2-(три-флуорометил)тетрагідротіофен-4,5-ол | 218,02 |

Усі сполуки групи похідних тіофену, окрім 10S-48, були надані у вигляді суміші діастереомерів. Для приготування робочих розчинів було зважено 5 мг субстанцій, які були розчинені в 1 мл ДМСО.

Сполука 10S-47 була отримана у вигляді готового розчину в диметилсульфоксиді (ДМСО, неоГрохх, Німеччина) з концентрацією 20 мг/мл.

Як референс-препарат було використано озельтамівір (етил (3R,4R,5S)-5-аміно-4-ацетамідо-3-(пентан-3-ілокси)циклогекс-1-ен-1-карбоксилат, MW = 312,2) у формі озельтамівіру фосфату з торговою назвою «Таміфлю» (Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцарія). Для приготування робочого розчину вміст капсули препарату (75 мг озельтамівіру) розчиняли у 15 мл очищеної води для ін'єкцій (ARTERIUM,

Україна). Розчин очищували від домішок (крохмаль прежелатинізований, тальк, повідон К30, натрію кроскармелоза, натрію стеарилфумарат) шляхом подвійного центрифугування при 5000g протягом 10 хв (Microspin 12 high-speed mini-centrifuge, Biosan, Латвія). Отриманий надосад без домішок з концентрацією озельтамівіру 5 мг/мл використовували для проведення досліджень.

3.1.3 Досліджувані наноструктурні матеріали

Серед категорії наноструктурних матеріалів було досліджено:

1) Водний колоїдний розчин суміші полігідратованих фулеренів (фулеренолів) з масовим співвідношенням: C_{60} – 62,75%, C_{70} – 23,56%, C_{76} – 1,79%, C_{78} – 3,62%, C_{78} – 3,62% та C_{80-86} – 5,24%; виробництва Yelipashev Private research laboratory (Київ, Україна). Розчин отриманий із модифікованого фулеренолату натрію, концентрація препарату становить 4 мг/мл.

2) Наночастинки срібла різного діаметру були надані к.х.н. Мухомою Ю.П. з Інституту хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України. Дана група представлена трьома сумішами НЧ: Ag10 - суміш НЧ діаметром від 5 до 30 нм, більшість 8-10 нм; Ag20 - суміш НЧ діаметром від 5 до 40 нм, більшість 10-20 нм; та Ag50 - суміш НЧ діаметром від 5 до 100 нм, більшість 40-50 нм. Вони були отримані з розчину нітрату срібла з використанням триптофану, за допомогою опромінення ультрафіолетом ($\lambda = 278$ нм) та різних температурних режимів: 60°C для Ag10, 40°C для Ag20 та 25°C для Ag50.

3) Срібловмісні нанокompозити на основі хітозану низької молекулярної маси (ХНММ) та натрієвої солі карбоксиметлцелюлози (Na-КМЦ) у вигляді плівок товщиною 100 мкм авторства д.х.н. Демченко В.Л. були отримані з Інституту хімії високомолекулярних сполук НАН України. Дані композити синтезовані методом зеленого синтезу, де у якості відновника використано екстракти зеленого чаю, кореневища імбиру та прополісу. Відповідно до екстрактів відрізняється середній діаметр наночастинок, який становить 11 нм, 20 нм та 44 нм.

3.2 Методи *in vitro*

3.2.1 Культивування клітин

Культуру клітин MDCK вирощували у стерильних пластикових флаконах (Sarstedt, Німеччина) на поживному середовищі, що складалося з 46% DMEM (Sigma, США), 46% RPMI 1640 (Sigma, США) та 8% інактивованої прогріванням при 56° С фетальної сироватки великої рогатої худоби – FBS (Sigma, США) з додаванням 50 мкг/мл гентаміцину сульфату (Biowest, Франція). Клітини перещеплювали кожні 48 годин з кратністю розсіву 1:10, після попередньої перевірки цілісності моношару. Для зняття культури з поверхні флакона використовували 0,02% розчин Версену (Gibco, США) та 0,025% розчин трипсину (Biowest, США). Клітини тримали у термостаті при 37°С в атмосфері 5% CO₂.

Підрахунок кількості клітин проводили за допомогою лічильної камери Горяєва та світлового мікроскопу (XS-3330 LED, MICROmed, Україна). Для визначення кількості клітин відбирали ресуспендовану аліквоту в окрему ємність та додавали барвник 0,4% трипановий синій (neoFroxx, Німеччина), у співвідношенні 1:1.

При підготовці до досліду, суспензію клітин у поживному середовищі зі щільністю 2×10^5 кл/мл вносили у лунки 96-лункового планшета (Bioswisstec, Швейцарія) по 100 мкл/лунка. Після інкубування протягом 24 год (37°С, 5% CO₂) перевіряли цілісність моношару за допомогою світлового інвертованого мікроскопу (Inverted microscope MBL3200, KRÜSS Optronic GmbH, Німеччина). За наявності моношару $\geq 90\%$ та відсутності контамінації, планшет з клітинами включали в дослідження.

3.2.2 Визначення цитотоксичності за МТТ-методом

МТТ – 3,(4,5-диметилтріазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум бромід (Sigma, США) – розчиняли у стерильному натрій-фосфатному буфері (PBS, рН = 7,2: у всіх подальших методиках використовувався даний буферний розчин) до концентрації 5

мг/мл. Для визначення токсичності досліджуваних агентів брали підготовлені за добу 96-лункові планшети з клітинами, видаляли з лунок надосад і додавали по 200 мкл речовин, розведених на поживному середовищі. Для сполук, початково розчинених у ДМСО, паралельно додавали контроль впливу розчинника на культуру у відповідних концентраціях. Для виключення хибно позитивного результату паралельно ставили контроль без клітин (агент+МТТ), а також проводили візуальну оцінку стану клітинного моношару за допомогою світлового інвертованого мікроскопу. У такому вигляді планшет інкубували 48 год при 37°C та 5% CO₂. Після чого надосад з препаратом видаляли і додавали 180 мкл поживного середовища та 20 мкл розчину МТТ в кожен лунку та інкубували протягом 3 год при 37°C та 5% CO₂. Далі надосад видаляли, а осад ресуспендували у 150 мкл 96% етанолу. Значення оптичної щільності (ОЩ) вмісту лунок планшету отримували за допомогою спектрофотометра «Multiscan FC» (Thermo Fisher, США) при довжині хвилі 538 нм. На основі отриманих даних ОЩ розраховували частку живих клітин за наступною формулою:

$$\text{Частка живих клітин (\%)} = \frac{\text{ОЩ}_{\text{зразка}}}{\text{ОЩ}_{\text{КК}}} \times 100\% \quad (3.1)$$

Для розрахунку індексів CC₅₀ використовували дані ОЩ, обчислення проводили у Microsoft Excel 2016 з застосуванням рівняння лінії тренду. Як критерій підбору типу лінії використовували показник R² зі значенням >0,9 та візуальну оцінку.

3.2.3 Накопичення вірусу в культурі клітин

Для накопичення вірусу грипу використовували культуру MDCK. Для цього моношар клітин у пластиковому флаконі розміру 74,2 см² попередньо промивали 2-3 рази по 5 мл PBS. Після цього вносили 1000 ТЦД₅₀ вірусу в об'ємі 2 мл PBS, та інкубували протягом 60 хв при 37°C та 5% CO₂. Далі надосад видаляли та вносили

від 10 мл підтримуючого середовища, що складалося з 49% DMEM, 49% RPMI 1640, 2% FBS та 2 мкг/мл ТРСК-трипсину (tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone, Sigma, США). Флакони інкубували 48-72 год при 37°C та 5% CO₂ до появи вираженої цитопатичної дії вірусу (ЦПД) – деструкції моношару, яку оцінювали за допомогою інвертованого мікроскопу. Після чого середовище збирали у пробірки об'ємом 15 мл (Sarstedt, Німеччина) та центрифугували при 3000g протягом 30 хв (високошвидкісна центрифуга TGL-20MB, Zhejiang TOP Instrument Co., Китай). Отриманий надосад з вірусом розділяли на аліквоти по 0,5-1 мл та зберігали в умовах -80°C після визначення інфекційного титру (п.3.2.4). Для проведення досліджень був використаний IAV H1N1 зі значенням ТЦД₅₀/мл 6,83 lg.

3.2.4 Визначення інфекційного титру вірусу

Для визначення інфекційного титру попередньо проводили серію десятикратних розведень вірусної суспензії на PBS. Моношар клітин MDCK у 96-лунковому планшеті промивали 2-3 рази 150 мкл PBS та вносили по 50 мкл/лунка вірусної суспензії. Інкубували протягом 60 хв при 37°C в атмосфері 5% CO₂. Після цього видаляли надосад і додавали по 200 мкл підтримуючого середовища. Через 48 год при 37°C та 5% CO₂ оцінювали ЦПД за допомогою інвертованого мікроскопу та проводили візуалізацію за допомогою барвника кристалічного фіолетового. Для цього видаляли середовище і додавали по 50 мкл/лунка 5% розчину барвника (Sigma, США) на 19,2% розчині етанолу 96%. Інкубували протягом 7-10 хв при кімнатній температурі та промивали під проточною водою. Після промивки планшет залишали на 24 год при кімнатній температурі до повного висихання, після чого додавали по 150 мкл 96% етанолу та визначали ОЩ зразків при довжині хвилі 538 нм на спектрофотометрі «Multiscan FC». На основі отриманих даних ОЩ розраховували значення ТЦД₅₀/мл (доза, необхідна для інфікування культури клітин з цитопатичною дією в 50% моношару) за методом Ріда-Менча [165].

3.2.5 Визначення антивірусної активності

Визначення протигрипозної активності агентів проти вірусу грипу проводили за двома загальними схемами: профілактичною (внесення до інфікування), та пост-експозиційною (внесення в різний час після інфікування).

За профілактичної схеми спочатку вносили у 96-лунковий планшет з моношаром клітин розчини досліджуваних речовин по 50 мкл/лунка, розведених на поживному середовищі. Контролем клітин слугували клітини в лунках з середовищем, що не містило вірус та речовину, а контролем вірусу – інфіковані клітини без додавання сполук. Планшет залишали на інкубацію при 37°C і 5% CO₂ на 24 год. Далі промивали PBS та додавали вірус по 100 ТЦД₅₀ на лунку в об'ємі 50 мкл (крім КК). Після 60 хв контакту клітин з вірусом, видаляли надосад з лунок і вносили по 200 мкл підтримуючого середовища. Через 48 год інкубації (37°C, 5% CO₂) перевіряли наявність ЦПД за допомогою інвертованого мікроскопу. За умови прояву ЦПД на $\geq 80\%$, проводили візуалізацію за допомогою МТТ, відповідно до вищезазначеної методики (п. 3.2.2).

За пост-експозиційної схеми дослідження спочатку проводили інфікування моношару MDCK вірусом. Для цього попередньо промивали планшет з моношаром клітин PBS та вносили по 50 мкл/лунка (100 ТЦД₅₀) вірусної суспензії. Інкубували протягом 60 хв при 37°C в атмосфері 5% CO₂. Далі в залежності від умов експерименту додавали досліджувані агенти, розведені на підтримуючому середовищі. Для схеми 1 год в.п.і одразу після інкубації протягом 60 хв видаляли надосад, додавали по 200 мкл препарату та залишали на 48 год при 37°C і 5% CO₂.

Для схем 4 і 24 год в.п.і., після інкубації клітин з вірусною суспензією видаляли надосад, вносили по 100 мкл підтримуючого середовища та залишали на 4 і 24 год при 37°C та 5% CO₂, відповідно. Після цього знову видаляли надосад та додавали по 200 мкл речовини з подальшою інкубацією до сумарного часу 48 год.

Для 0 год в.п.і. речовину вносили одночасно з вірусною суспензією (100 ТЦД₅₀ на 20 мкл) у пропорції 1:1 (по 20 мкл/лунка кожного компоненту), інкубували

протягом 60 хв, видаляли надосад та вносили по 200 мкл підтримуючого середовища. Після цього залишали на 48 год при 37°C та 5% CO₂.

У всіх схемах після виявлення ЦПД збирали надосад в мікропробірки, вносили 180 мкл/лунка середовища та 20 мкл/лунка МТТ і визначали ОЩ зразків (п. 3.2.2). Показник антивірусної активності [166] розраховували на основі отриманих даних ОЩ за наступною формулою:

$$\text{Антивірусна активність (\%)} = \frac{(\text{ОЩ}_{\text{зразка}} - \text{ОЩ}_{\text{кв}})}{(\text{ОЩ}_{\text{кк}} - \text{ОЩ}_{\text{кв}})} \times 100\% \quad (3.2)$$

Для розрахунку індексів EC₅₀ використовували дані ОЩ, обчислення проводили у Microsoft Excel 2016 з застосуванням рівняння лінії тренду. Як критерій підбору типу лінії використовували показник R² зі значенням >0,9 та візуальну оцінку. Розрахунок індексів селективності (SI) проводили на снові отриманих значень CC₅₀ та EC₅₀, як співвідношення між ними.

3.2.6 Визначення віруліцидної дії

Щоб оцінити віруліцидний потенціал агентів, проводили їх інкубацію з вірусом поза клітинами. Для цього у мікропробірці змішували по 20 мкл вірусної суспензії та 20 мкл речовини, розведеної на PBS. У якості контролю вірусу використовували суміш 1:1 вірусу з буфером. Мікропробірки інкубували протягом 15, 30 та 60 хв при кімнатній температурі. Після цього проводили визначення інфекційного титру відповідно до методики, описаної у підрозділі 3.2.4.

3.3 Методи *in silico*

3.3.1 Підготовка лігандів та цілей

Дані тривимірної структури вірусних білків були отримані з ресурсу Protein Data Bank (PDB).

Підготовка CBD субодиниці PB2 RdRp – PDB ID: 4J2R – включала вилучення

малих молекул та другого мономера CBD за допомогою PyMOL 2.3 [167].

Для RdRp було обрано структуру PDB ID: 7NK1. У зв'язку з відсутністю координат деяких амінокислот, модель було завершено на основі шаблону з використанням онлайн-ресурсу SWISS-MODEL [168], решта даних була видалена, за винятком самого гетеротримеру RdRp.

У випадку сполук 10S-45, 10S-46, 10S-49 10S-45 та 10S-47 RDKit 2022.9.5 використовувався для генерації усіх можливих стереоізомерів з додатковим дозволом на аналіз усіх стереоцентрів та вилученням структур, що перекриваються [169].

Структура ліганду фулеренулу C_{60} була створена з використанням Avogadro molecular editor [170].

3.3.2 Молекулярний докінг

Для органічних сполук був проведений гнучкий докінг з використанням MGLTools 1.5.7 та AutoDock Vina 1.2.3 [171]. Зона докування (grid box) охоплювала сайт зв'язування m7GTP CBD і мала розміри $40 \times 40 \times 40 \text{ \AA}$ з центром у $19,817 \times -36,662 \times -29,562$ (XYZ). Амінокислоти F323, F325, F330, R332, H357, E361, F363, K376, F404, Q406 та M431 вважалися гнучкими. Значення вичерпності (exhaustiveness) становило 32.

Молекулярний докінг фулеренулу C_{60} з RdRp було проведено за подібною схемою. Однак у випадку цього дослідження зона докування включала весь гетеротримерний білок одночасно. Значення вичерпності (exhaustiveness) через передбачуваний великий сайт взаємодії білок-ліганд становило 40. Для подальших експериментів з моделювання було обрано позицію фулеренулу з найкращим балом оцінки.

3.3.3 Симуляція молекулярної динаміки

Симуляцію молекулярної динаміки для усіх лігандів та цілей було виконано у

програмі GROMACS 2020.6 [172]. Для флуоровмісних похідних тіофену, що були отримані у вигляді стереомерів, лише один оптичний ізомер був вибраний на основі балу скорингової функції. Ці та інші структурно і/або топологічно схожі до пуринів малі молекули були досліджені шляхом симуляції їх молекулярної динаміки в комплексі з CBD субодиниці PB2. Моделювання було виконано у силовому полі CHARMM27 [173]. Ліганди було параметризовано за допомогою SwissParam [174]. У процесі побудови системи комплекс CBD/ліганд було розміщено в коробці у формі усіченого октаедра, заповненого явним розчинником (третичкова модель води TIP3P) з фізіологічною концентрацією Na^+ і Cl^- (0.156 M) [175]. Відстань між комплексом та стінками коробки підтримувалася на рівні 24 Å. Використовувалися періодичні граничні умови. Електростатичну енергію розраховували за допомогою методу PME (Particle-Mesh Ewald). Кулонівська та ван-дер-Ваальсова взаємодії мали граничну відстань 1,2 нм. Енергію мінімізували за допомогою алгоритму найкрутішого спуску до значення енергії системи менше 1000 кДж/моль/нм (50 000 кроків). Врівноважування проводилося у двох послідовних фазах, кожна тривалістю 100 пс: спочатку відбувалося вирівнювання температури (300 K), потім тиску (1 атм). Моделювання молекулярної динаміки проводилося протягом 100 нс з кроком часу 2 фс.

У випадку моделювання взаємодії фулерену C_{60} з RdRp, конструювання системи було виконано за допомогою CHARMM-GUI з використанням силового поля CHARMM36m [176] та включало створення прямокутної коробки з періодичними граничними умовами, яка містила комплекс RdRp/фулерену, воду та іони K^+ та Cl^- у фізіологічній концентрації.

Побудова молекулярної системи для дослідження особливостей впливу фулерену C_{60} на вірусну мембрану також здійснювалось за допомогою CHARMM-GUI і зокрема його інструменту Membrane Builder. Дані щодо співвідношення різних ліпідів характерного саме для ліпідної мембрани віріону вірусу грипу типу А були отримані з літературних джерел [177, 178]. Безпосередня кількість молекул

кожного із складових була рівною для обох шарів бішару і становила: фосфатидна кислота – 15, фосфатидилхолін – 75, фосфатидилетаноламін – 479, фосфатидилгліцерол – 2, фосфатидилсерин – 245, фосфатидилінозитол – 3, сфінгомієлін – 176. Після побудови мембрани фулеренол був доданий окремо як ліганд, але поза бішаром. Як і у випадку RdRp бокс був заповнений явним розчинником, але в даному випадку лише з обох сторін від мембрани, що разом з періодичними граничними умовами дозволило імітувати протяжний біліпідний шар. Фізіологічна іонна сила була отримана за рахунок фізіологічної концентрації іонів Na⁺ та Cl⁻. Параметризація системи була здійснена в силовому полі CHARMM36m.

3.3.4 Розрахунок вільної енергії зв'язування

Для розрахунку вільної енергії зв'язування за допомогою методу MM/GBSA (Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area) було використано пакет gmx_MMPBSA 1.5.2. [179] Джерелом вхідних даних була траєкторія (останні 80% кадрів – загалом 800), згенерована GROMACS у процесі молекулярно-динамічного моделювання цільових комплексів. Полярний внесок сольватації оцінювався на основі моделі GB-OBC227, а неполярний – на основі SASA (solvent-accessible surface area). Внесок ентропійної складової розраховувався методом IE (interaction entropy) [180].

3.3.5 Аналіз результатів, отриманих *in silico*

Результати, отримані *in silico*, аналізували за допомогою стандартного програмного забезпечення, наданого GROMACS (rms, hbond, rmsf, trjconv, gyrate, distance), та візуалізували за допомогою XMGRACE [181] та PyMOL 2.3 [167].

3.3.6 Прогнозування фармакокінетичних параметрів

Прогнозування параметрів ADMET (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity) та медичної хімії проводилося за допомогою онлайн-ресурсу

ADMETlab 3.0 [182]. Для проведення аналізу структура кожної досліджуваної органічної сполуки будувалася у вбудованому редакторі JMSE. Оцінку сполук проводили за фізико-хімічними параметрами, параметрами Медичної хімії, абсорбції, розподілу, метаболізму, виведення та токсичності. Кожна група включала наступні складові для аналізу:

1) Фізико-хімічні параметри, що термодинамічно визначаються набором макроскопічних величин, доступних експериментальним вимірюванням та пов'язаних із законами статистичної механіки:

молекулярна маса (MW); об'єм; густина; кількість акцепторів водневих зв'язків (nHA); кількість донорів водневих зв'язків (nHD); кількість обертових зв'язків (nRot); кількість кілець (nRing); кількість атомів у найбільшому кільці (MaxRing); кількість гетероатомів (nHet); формальний заряд (fChar); кількість негнучких зв'язків (nRig); гнучкість; стереоцентри; Topological Polar Surface Area (TPSA) – сума поверхневих значень усіх полярних атомів або молекул, корелює зі здатністю сполуки проникати в клітини; logS – логарифм значення розчинності у воді; logP – логарифм коефіцієнтів розподілу у н-октанолі/воді при pH=7,4, описує ліпофільність нейтральної форми сполуки; logD – логарифм коефіцієнтів розподілу у н-октанолі/воді, описує ліпофільність нейтральної і зарядженої форм сполуки; pKa (Acid) – значення константи кислотно-основної дисоціації (pKa), відображає силу кислотності молекули; pKa (Base) – значення pKa, відображає силу основності молекули; температура плавлення, °C; температура кипіння, °C.

2) Параметри медичної хімії базуються на аналізі хімічної структури молекули (фізико-хімічних характеристик) та порівнянні її з емпірично виведеними пороговими значеннями:

Quantitative Estimate of Drug-likeness (QED) – міра схожості з існуючими лікарськими препаратами; Graph Attention-based assessment of Synthetic Accessibility (GASA) та Synth – оцінка того, як важко синтезувати молекулу;

F_{sp^3} – кількість sp^3 -гібризованих атомів C/загальна кількість атомів C, що корелює з температурою плавлення та розчинністю; Правило Ліпінського – оцінка пероральної доступності сполуки на основі MW, logP, nHA та nHD; Правило Pfizer – оцінка здатності сполуки до неспецифічного зв'язування з білками на основі logP та TPSA; Правило GlaxoSmithKline (GSK) – оцінка профілю ADMET на основі MW та logP; Правило Золотого трикутника – оцінка балансу між метаболічною стабільністю та проникністю сполуки на основі MW та logD; Promiscuous compounds – оцінка специфічності та селективності дії сполуки.

3) Параметри абсорбції вимірюють як молекула переміщується від місця введення до місця дії:

Caco-2 проникність – клітини аденокарциноми товстої кишки людини (Caco-2) використовуються для оцінки проникності ліків через епітелій кишковика людини через їх морфологічну та функціональну подібність; MDCK проникність – оцінка ефективності поглинання хімічних речовин організмом та впливу гематоенцефалічного бар'єру; Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) – моделювання пасивної абсорбції шляхом дифузії перорально введених препаратів у шлунково-кишковому тракті; Human Intestinal Absorption (HIA) – оцінка пероральної biodоступності; $F_{20/30/50\%}$ – оцінка пероральної biodоступності 20/30/50% дози препарату.

4) Параметри розподілу оцінюють як ліки переміщуються до різних тканин організму:

Зв'язування з білками плазми (PPB) – оцінка зв'язування сполуки з білками плазми, що сильно впливає на її фармакодинамічну поведінку; Volume Distribution (V_{dss}) – вимірює, наскільки ефективно молекула розподіляється по всьому організму; Проникнення крізь гематоенцефалічний бар'єр (BBB) – оцінка проникності сполуки крізь даний бар'єр; Фракція незв'язаного вмісту в плазмі (F_u) – оцінка незв'язаної фракція в плазмі.

5) Параметри метаболізму вимірюють, як спеціалізовані ферментативні системи розщеплюють ліки, і визначають тривалість та інтенсивність дії препарату:

CYP1A2/CYP3A4/CYP2C9/CYP2C19/CYP2D6/CYP2B6/CYP2C8

інгібітор/субстрат – оцінка взаємодії з основними ферментами, що метаболізують лікарські препарати, адже метаболізм, опосередкований CYP, може призвести до утворення токсичних метаболітів та виникнення небажаної взаємодії між препаратами; Метаболічна стабільність у мікросомах печінки людини (HLM) – оцінка кліренсу хімічних речовин печінкою людини.

6) Параметри виведення оцінюють процес виведення лікарських речовин з організму різними шляхами:

CL_{plasma} – виражає загальну здатність організму виводити препарат шляхом масштабування швидкості виведення (кількість за раз) на відповідний рівень концентрації в плазмі; $T_{1/2}$ – розрахунок періоду напіввиведення препарату.

7) Параметри токсичності:

hERG Blockers – оцінка здатності сполуки інгібувати калієві канали hERG або KCNH2; Drug Induced Liver Injury (DILI) – оцінка ризику ураження печінки на основі даних клінічних досліджень; AMES Mutagenicity/Toxicity – оцінка здатності сполуки викликати пошкодження ДНК; Carcinogenicity – оцінка здатності сполуки пошкоджувати геном або порушувати клітинні метаболічні процеси; Human Hepatotoxicity – оцінка ризику ураження печінки на основі змішаних даних; Drug-induced Nephrotoxicity – оцінка ймовірності нефротоксичності сполуки; Nematotoxicity – оцінка несприятливого впливу сполуки на кровотворні органи, такі як кістковий мозок, або на складові крові, включаючи тромбоцити, лейкоцити та еритроцити; Genotoxicity – оцінка здатності речовини пошкоджувати генетичну інформацію в клітинах; Drug-induced Neurotoxicity – оцінка здатності речовини впливати на центральну та периферичну нервову систему.

3.4 Визначення гострої токсичності *in vivo*

Експеримент проводили з участю дорослих (10 тижнів) мишей лінії BALB/c, яких було взято з віварію Інституту мікробіології і вірусології ім. Заболотного Національної академії наук України. Робота з тваринами проводилася відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21 лютого 2006 року №3447-IV [183] та відповідно до норм біотетики, про що є висновок комісії з біоетики Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, протокол № 76 від 08.04.2026.

Всього у дослідженні брало участь 24 тварини, розділені на 4 групи по 6 мишей. Три групи отримали перорально 1 дозу (≈ 40 мкл) суміші фулеренолів в концентраціях 40, 400 та 4000 мкг/мл, і 1 група як контрольна отримала відповідний об'єм води. Середня вага тварини становила ≈ 21 г, відповідно доза фулеренолів в перерахунку на мг/кг становила 0,0762, 0,762 та 7,62 мг/кг. Після отримання препарату тварини перебували в стандартних умовах (температура приміщення $+22^{\circ}\text{C}$). На 3 та на 21 добу з кожної групи було взято по 3 миші для отримання зразків крові. Для забору крові використовували вакуумні пробірки ЕДТА К3 4 мл (Chengdu Rich Science Industry Co., Ltd, Китай). Аналіз крові проводили з використанням гематологічного аналізатора HTI MicroCC-20 Plus (HTI, США).

3.5 Статистична обробка даних

Дані експериментів *in vitro* та *in vivo* були статистично проаналізовані за допомогою Microsoft Excel 2016 та виражені як середнє арифметичне \pm стандартне відхилення ($\pm\text{SD}$). Значення $p \leq 0,05$ вважалося статистично значущим. Кожен експеримент був проведений щонайменше у трьох незалежних повторях та передбачав використання 3 лунок для кожного зразка.

РОЗДІЛ 4

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

4.1 Оцінка потенціалу кандидатів у противірусні агенти з класу органічних сполук

4.1.1 Дослідження флуоровмісних β -N-бензотіазоліл глікозидів

Група речовин – флуоровмісних β -N-бензотіазоліл глікозидів – представлена 4 сполуками (рис. 4.1).

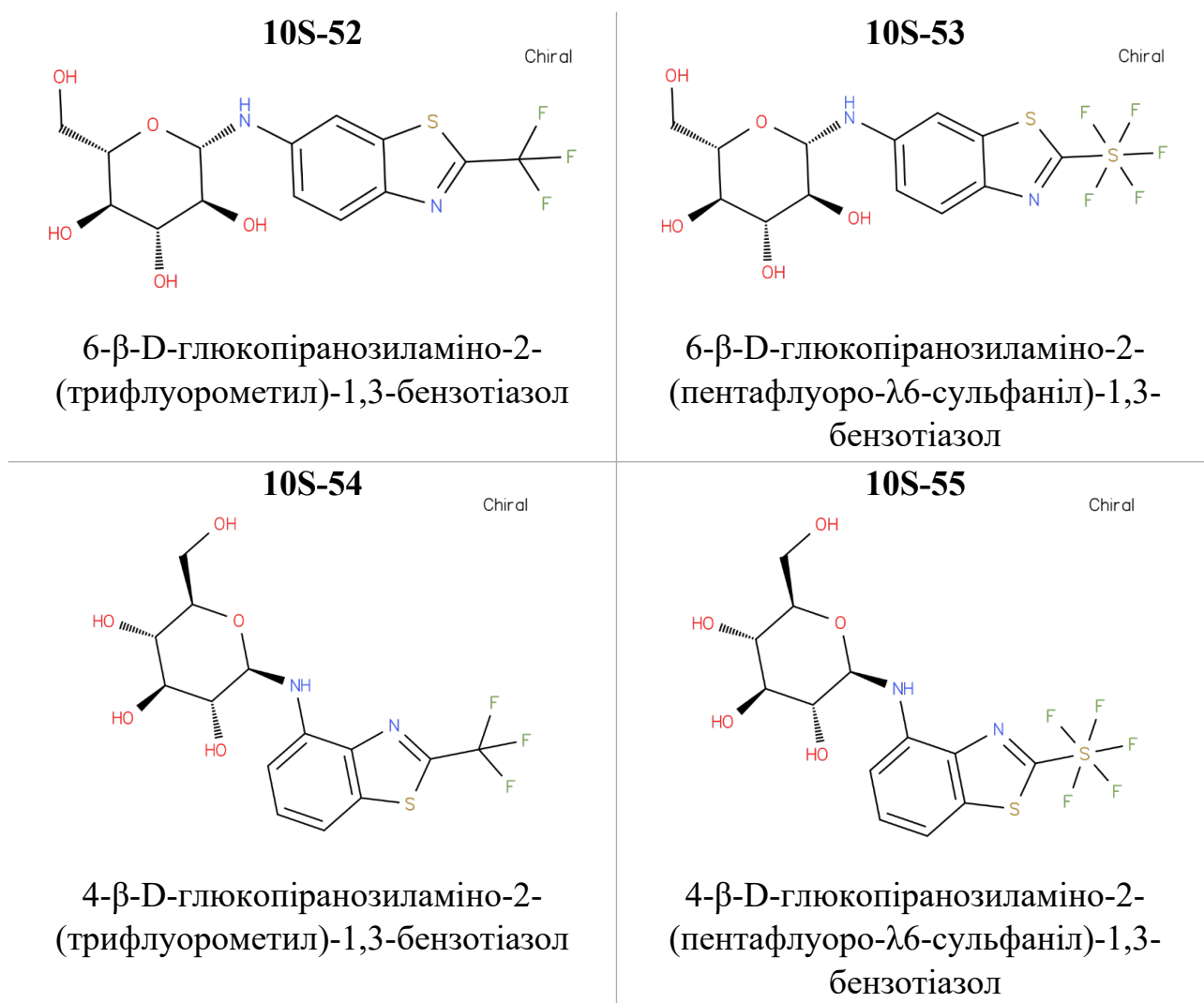


Рисунок 4.1 Структурні формули та повні назви за номенклатурою IUPAC досліджуваних флуоровмісних β -N-бензотіазоліл глікозидів

Представники даної групи містять у своєму складі бензотіазол (BZT), який складається з бензольного кільця, конденсованого з п'ятичленим тіазольним кільцем (містить нітроген у положенні 3 та сульфур в положенні 1); β -D-глюкопіранозу, приєднану до аміногрупи в 6 або 4 позиції BZT через N-глікозидний зв'язок; та флуоровмісну групу (трифлуорометил або пентафлуоро- λ 6-сульфаніл) у положенні 2 BZT. Зображення молекул, їхні повні назви за номенклатурою IUPAC та кодові скорочення представлені на рис. 4.1. Далі у тексті для опису окремих представників групи будуть використовуватися їхні кодові назви.

Усі чотири досліджувані флуоровмісні β -N-бензотіазоліл глікозиди демонстрували виражений дозозалежний ефект на культуру клітин MDCK (рис. 4.2). Також спостерігалася залежність цитотоксичного впливу від структури сполуки: молекули, глікозильовані у положенні 6, (10S-52 та 10S-53) знижували життєздатність клітин сильніше, порівняно з молекулами, глікозильованими у положенні 4 (10S-54 та 10S-55).

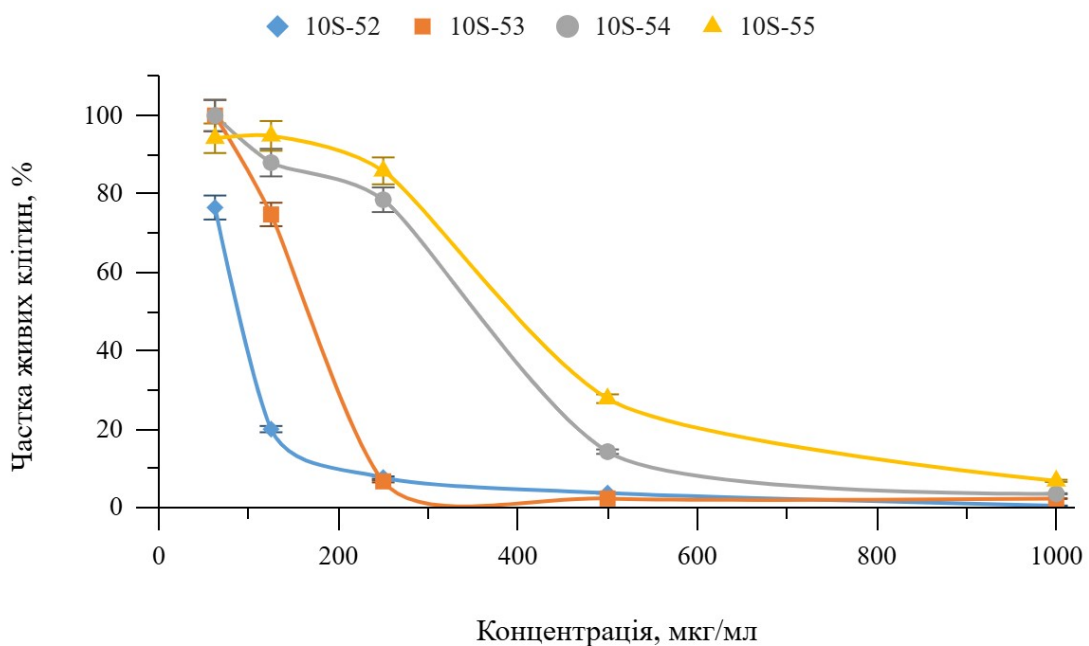


Рисунок 4.2 Вплив флуоровмісних β -N-бензотіазоліл глікозидів на життєздатність культури клітин MDCK. Дані представлені як середні значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Водночас, найтоксичнішою для клітин MDCK виявилася речовина 10S-52, для якої у найменшій досліджуваній концентрації (62,5 мкг/мл) спостерігали лише $\approx 75\%$ живих клітин. Сполука 10S-53 дещо слабше впливала на культуру, порівняно з 10S-52: така ж частка життєздатних клітин була вже за концентрації 125 мкг/мл.

Речовини 10S-54 і 10S-55 знижували життєздатність клітин більше ніж на 70% лише у діапазоні концентрацій 500-1000 мкг/мл. Серед них сполука 10S-54 сильніше впливала на культуру за використання високих концентрацій.

Таким чином, прослідковувалася також залежність цитотоксичності β -N-бензотіазоліл глікозидів від складу функціональної групи. Сполуки 10S-52 та 10S-54 з трифлуорометилом були більш токсичними, порівняно з 10S-53 і 10S-55, що містять у своєму складі пентафлуоро- $\lambda 6$ -сульфаніл. Дані закономірності відображені у розрахованих індексах напівмаксимальної цитотоксичної концентрації – CC_{50} (таблиця 4.1).

Таблиця 4.1 Індеси CC_{50} флуоровмісних β -N-бензотіазоліл глікозидів для культури клітин MDCK

| Сполука | 10S-52 | 10S-53 | 10S-54 | 10S-55 |
|--------------------|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| CC_{50} , мкг/мл | 87,42 \pm 4,28 | 154,69 \pm 7,58 | 383,27 \pm 18,78 | 410,95 \pm 20,14 |

Для досліджуваних β -N-бензотіазоліл глікозидів була проведена оцінка ADMET (абсорбція, розподіл, метаболізм, виведення та токсичність) параметрів. Відповідно до ADMETlab 3.0, всі сполуки цієї групи мали оптимальні фізико-хімічні характеристики, тобто жодна із структур не виходила за межі оптимуму, запропонованого розробниками ні за одним із 21 параметру (додаток 1).

β -N-бензотіазоліл глікозиди також мали схожі параметри групи Медичної хімії (поняття, що об'єднує моделі і правила, які спираються на фізико-хімічні характеристики), але з певними відмінностями. Зокрема, всі сполуки порушували

правило QED (Quantitative Estimate of Drug-likeness) і входили у проміжну групу «небажаних» молекул. Крім того, речовини 10S-53 та 10S-55 порушували правило GSK, що пов'язано із їх дещо менш сприйнятливим співвідношенням між молекулярною масою і ліпофільністю, порівняно з 10S-52 та 10S-54. Хоча слід зазначити, що за рештою параметрів пов'язаних із залежностями структура-активність, таких як F_{sp}^3 , правило Ліпінського, правило Pfizer і правило Золотого трикутника, всі речовини були абсолютно прийнятними.

Якщо розглядати прямо пов'язані з біологічною активністю параметри, то всі сполуки цієї групи характеризувалися потенціалом до утрудненого проникнення через біологічні бар'єри і надлишковою спорідненістю до білків плазми крові (додаток 1). При цьому абсорбційна здатність речовин 10S-53 та 10S-55 все ж потенційно може бути дещо вищою, порівняно з 10S-52 та 10S-54. Про це свідчила відповідність 10S-53 параметру $F_{30\%}$ (30% біодоступність) і 10S-55 – $F_{50\%}$ (50% біодоступність). Тобто обидві сполуки за розрахунками мали потенціал до абсорбції у кровотік за умови перорального прийому.

Натомість, прогнозований метаболізм β -N-бензотіазоліл глікозидів дещо відрізнявся. Попри те, що всі вони мали потенціал до інгібування цитохрому CYP2C8, а речовини 10S-54 і 10S-55 могли також виступати слабкими інгібіторами CYP1A2, загальний ступінь метаболічної стабільності 10S-52 і 10S-53, оцінений за допомогою моделі HLM (метаболічна стабільність у мікросомах печінки людини), потенційно був значно вищим порівняно з 10S-54 і 10S-55.

Усі чотири досліджувані сполуки також мали схожий розрахований потенціал до прояву токсичності: усі вони порушували правила DILI (Drug-Induced Liver Injury), AMES Toxicity, Human Hepatotoxicity та Genotoxicity. Водночас, жоден із β -N-бензотіазоліл глікозидів на рівні розрахунків не виявив потенціалу до канцерогенності та блокування hERG. Крім того, сполуки з групи, які містять трифлуорометил, мали підвищений потенціал до прояву нефротоксичності, що особливо цікаво в контексті того, що MDCK є клітинами нирки собаки.

Підсумовуючи, за розрахунками вищеописаних параметрів фармакокінетики, речовини 10S-52, 10S-53, 10S-54 та 10S-55 характеризуються схожими і цілком прийнятними властивостями зі сторони класичної медичної хімії, проте мають значно ускладнений профіль розподілу та токсичності. В останньому випадку, попри загальну подібність, речовини 10S-52 та 10S-54 виявили підвищений потенціал до впливу на тканини сечовидільної системи. З огляду на результати дослідження, отримані *in vitro*, можна припустити, що відносно підвищений рівень токсичності цих сполук до клітин MDCK пов'язаний з трифлуорометилом у положенні 2 ВЗТ. Однак, отримані дані не пояснюють значну різницю в токсичності, залежну від положення гексози. Таким чином, можна припустити важливість саме просторової організації конкретної молекули, що в свою чергу може свідчити про потенційний селективний вплив сполук 10S-52 та 10S-53 на певні життєво важливі клітинні фактори.

Антивірусна активність β -N-бензотіазоліл глікозидів відносно вірусу грипу типу А визначалася за пост-експозиційною схемою дослідження. Сполуки вносили у культуру клітин, попередньо інфіковану IAV H1N1, у діапазоні концентрацій від 0,24 до 62,5 мкг/мл для 10S-52 і 10S-53 та від 0,24 до 250 мкг/мл для 10S-54 і 10S-55, відповідно до попередньо отриманих даних цитотоксичності.

Результати дослідження вказували на те, що серед чотирьох β -N-бензотіазоліл глікозидів лише сполука 10S-54 проявила протівірусний ефект. Решта речовин не пригнічували репродукцію IAV за 48 годин їх присутності в культурі клітин

Проте, антивірусний ефект 10S-54 був доволі слабо виражений. Найвищий відсоток активності ($\approx 17\%$) спостерігали за концентрацій 3,91–15,625 мкг/мл (рис. 4.3). З огляду на це, хоч даний β -N-бензотіазоліл глікозид з трифлуорометилом у складі і впливав на репродукцію вірусу, напівмаксимальну ефективну концентрацію (EC_{50}) для нього розрахувати неможливо.

Була також проведена оцінка інфекційності вірусного потомства, синтезованого в присутності 10S-54, шляхом визначення їхнього інфекційного

титру (ТЦД₅₀/мл). Результати дослідження вказують на те, що новосинтезований вірус зберігає свою інфекційність, оскільки максимальне зниження ТЦД₅₀/мл становило 0,5 lg (рис. 4.4).

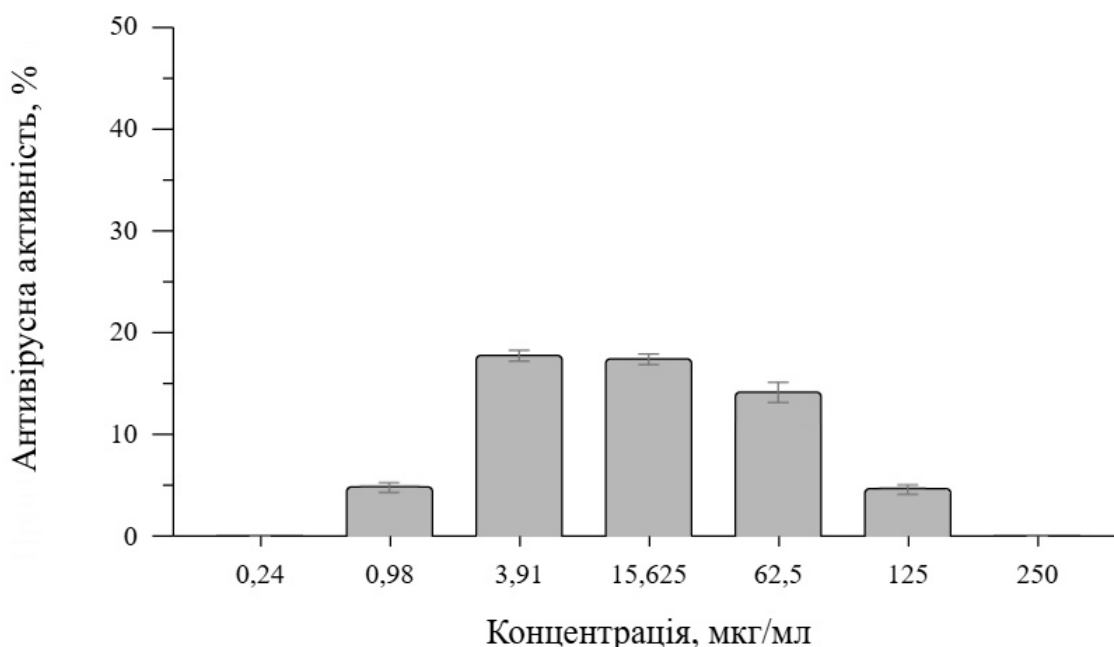


Рисунок 4.3 Вплив β -N-бензотіазоліл глікозиду 10S-54 на репродукцію вірусу грипу типу А у культурі клітин MDCK за пост-експозиційної схеми внесення. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Структурна подібність сполуки 10S-54 до пуринових нуклеозидів дозволяє припустити, що виявлений антивірусний ефект може бути частково чи повністю пов'язаний із взаємодією цієї молекули з кеп-зв'язуючим доменом (CBD) субодиниці PB2 вірусної RdRp. Задля перевірки цього припущення, 10S-54 була здокована до CBD PB2, а утворений комплекс був в подальшому досліджений в межах симуляційного експерименту.

Попри те, що 10S-54 не покинула кеп-зв'язуючої ділянки цільового домену RdRp, ця сполука виявила високий рівень лабільності, що є не характерним для

селективних конкурентних інгібіторів з високим потенціалом. Зокрема, вже з першої наносекунди симуляції вона почала змінювати своє положення відносно оригінальної зони докування з одночасним утворенням численних водневих зв'язків з S321, R332 та S337 (рис. 4.5, А). Ця конформація була відносно стабільною протягом близько 25 нс, після чого вона повторно змінилась (рис. 4.5, Б).

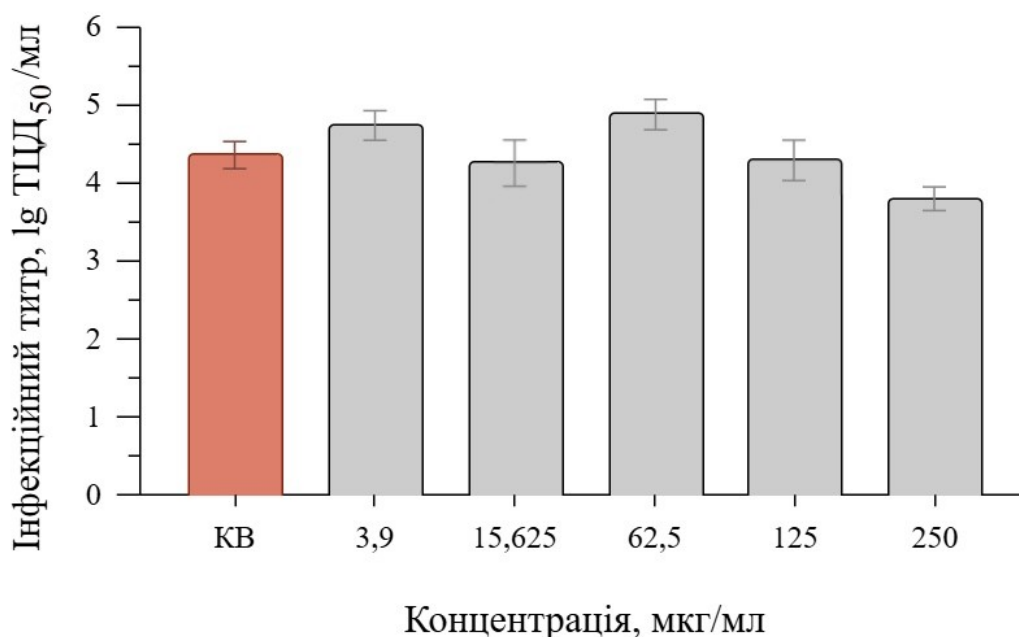


Рисунок 4.4 Інфекційні титри (ТЦД₅₀/мл) вірусу грипу типу А, що реплікувався у культурі клітин MDCK у присутності сполуки 10S-54. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

За наступної конформації 10S-54 втратила направлені взаємодії зі згаданими вище амінокислотами, сформувавши натомість стабільний стекінг з F323, H357 та F404 (рис. 4.5, В). Це положення, однак, також не було стабільним і після 120 нс симуляції ліганд значно змістився з місця початкового докування. Основною взаємодією цього випадку був лише стекінг з F325 та H432. Починаючи з даного моменту і до кінця симуляції зрідка спостерігались локальні аберації ліганду, які

однак завжди затухали з відновленням цього останнього положення 10S-54 (рис. 4.5, Г).

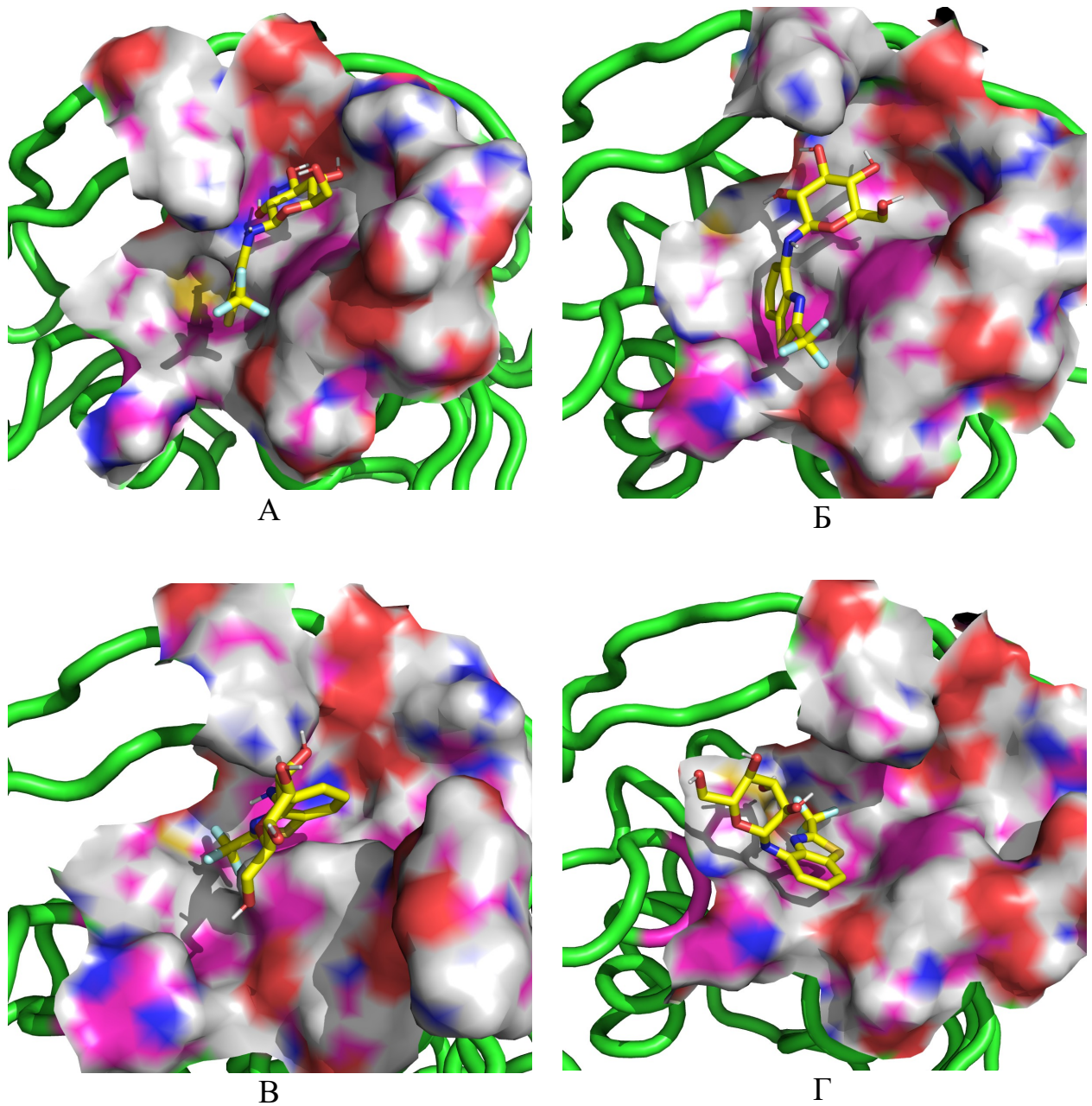


Рисунок 4.5 Зміна конформації 10S-54 у кеп-зв'язуючій ділянці PB2 вірусної RdRp під час симуляції молекулярної динаміки: А – 0 нс, Б – 20 нс, В – 50 нс, Г – 150 нс

Описані спостереження загалом відповідають розрахованому на основі траєкторії симуляції середньоквадратичному відхиленню (RMSD) цієї речовини (рис. 4.6), яке чітко демонструє відносну стабілізацію положення ліганду в межах кеп-зв'язуючої ділянки PB2 RdRp у другій половині симуляційного дослідження.

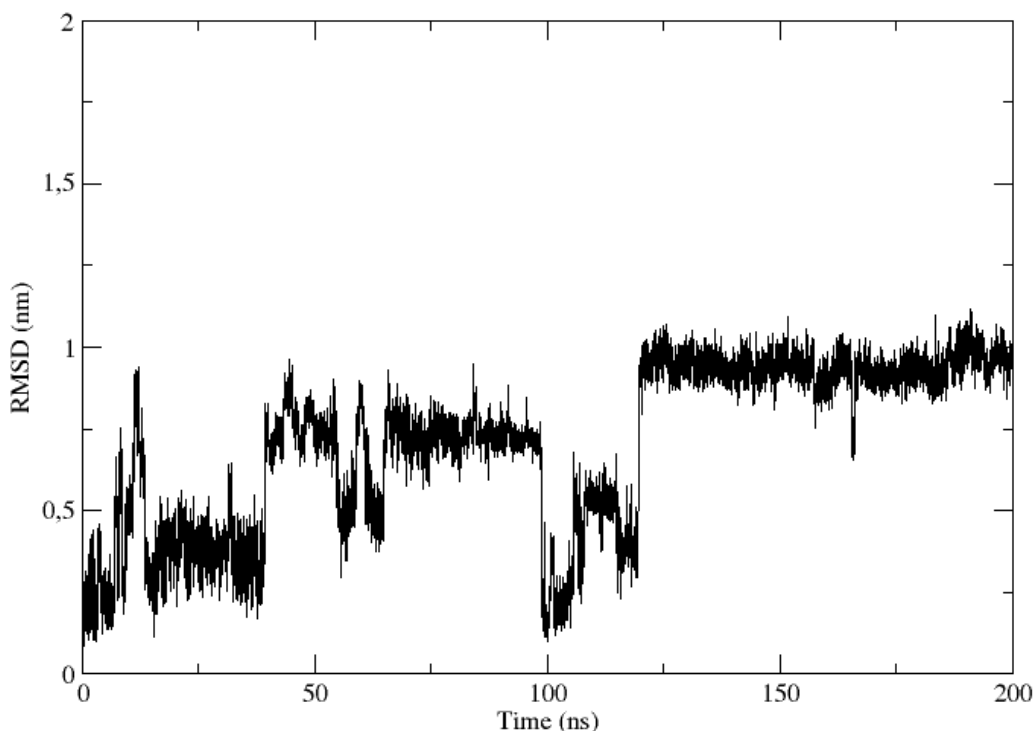


Рисунок 4.6 Графік залежності середньоквадратичного відхилення ліганду від часу симуляції для комплексу 10S-54-CBD PB2

За результатами симуляційних досліджень, речовина 10S-54, ймовірно, володіє деяким рівнем спорідненості до одного із ключових доменів РНК-залежної РНК полімерази грипу. Однак ця спорідненість не є достатньою для виразного біологічного ефекту, що цілком узгоджується з отриманими *in vitro* даними.

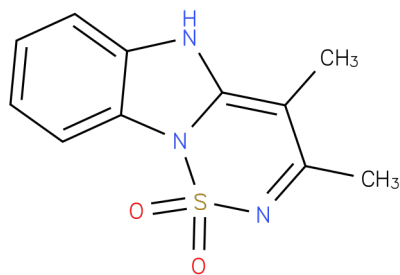
Підсумовуючи результати досліджень флуоровмісних β -N-бензотіазоліл глікозидів, виражений цитотоксичний вплив на культуру клітин MDCK даної групи органічних сполук варіює в залежності від структурних особливостей кожного окремого представника. Загалом, менш токсичними є речовини 10S-53 і 10S-55, що

містять у своєму складі пентафлуоро- λ 6-сульфанільну групу. Результати оцінки параметрів ADMET вказують на те, що дані сполуки мають оптимальні фізико-хімічні характеристики, проте їх прогнозовані профілі розподілу та токсичності є дещо ускладненими. З точки зору протигрипозного ефекту, серед 4 досліджуваних β -N-бензотіазоліл глікозидів, його проявила лише сполука 10S-54. Однак, максимальне значення антивірусної активності становило $17,75 \pm 0,71\%$, без додаткового впливу на інфекційність вірусного потомства [184]. Зважаючи на структуру молекули (N-глікозильований гетероцикл) та її подібність до пуринових нуклеозидів, за допомогою симуляції молекулярної динаміки було оцінено можливий механізм дії 10S-54, а саме взаємодію з RdRp. Сполука була здокована до CBD субодиниці PB2, проте під час симуляційного експерименту виявила високий рівень лабільності в межах CBD. На основі отриманих даних можна зробити припущення, що слабкий протигрипозний ефект 10S-54 може бути пов'язаним зі спорідненістю сполуки до певного домену RdRp.

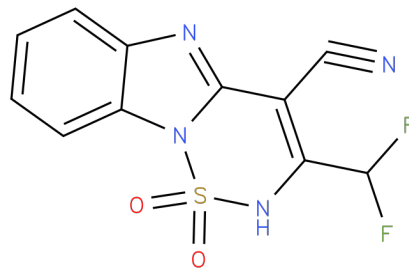
4.1.2 Дослідження галогеновмісних [1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензimidазолів

Групу речовин галогеновмісних [1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензimidазолів представляють 8 сполук (рис. 4.7 і рис. 4.8). Усі вони в основі молекули містять трициклічне ядро, що містить бензimidазол (BZI), який складається з бензолу та імідазолу (п'ятичленне кільце з двома атомами нітрогену), об'єднаний з тіадіазолом – п'ятичленне кільце з двома атомами нітрогену та одним атомом сульфуру, який входить до складу сульфонової групи. За рештою складових, молекули можна розділити на дві підгрупи.

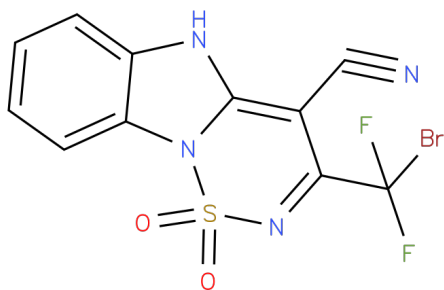
Перша підгрупа містить нітрил ($-C \equiv N$) у положенні 4 та одну із галогенометильних груп ($-CCl_3$, $-CF_2$, $-CF_2Br$) у положенні 3 гетероциклу. Також до неї було віднесено сполуку, що в обох положеннях містить $-CH_3$. Повні назви молекул за номенклатурою IUPAC, їх кодові назви та структури наведені на рис. 4.7.

2618

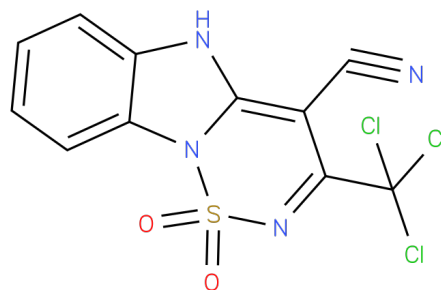
3-метил-5Н-[1,2,6]тіадіазино[2,3-а]бензімідазол-4-метил-1,1-діоксид

1792

3-(дифлуорометил)-2Н-[1,2,6]тіадіазино[2,3-а]бензімідазол-4-нітрил-1,1-діоксид

1752

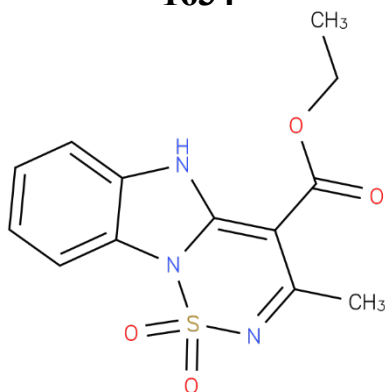
3-[бромо(дифлуоро)метил]-5Н-[1,2,6]тіадіазино[2,3-а]бензімідазол-4-нітрил-1,1-діоксид

1790

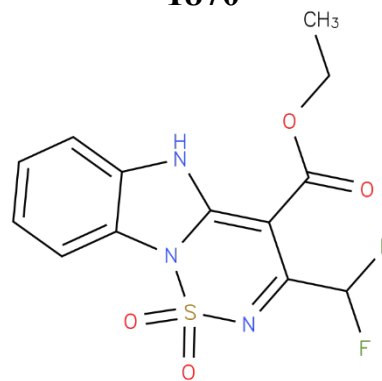
3-(трихлорометил)-5Н-[1,2,6]тіадіазино[2,3-а]бензімідазол-4-нітрил-1,1-діоксид

Рисунок 4.7 Структурні формули та повні назви за номенклатурою IUPAC підгрупи [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензімідазолів з нітрилом (або метилом) у положенні 4 гетероциклу

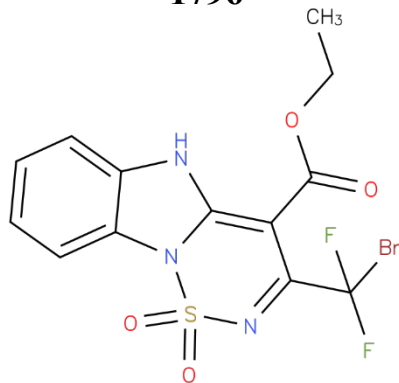
Друга підгрупа містить етил карбоксилат ($-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) у положенні 4 та одну із груп $-\text{CH}_3$, $-\text{CCl}_3$, $-\text{CF}_2$ або $-\text{CF}_2\text{Br}$ у положенні 3 гетероциклу. Структурні формули молекул, їхні повні назви за номенклатурою IUPAC та кодові назви наведені на рис. 4.8. Далі по тексту для опису окремих представників групи будуть використані їхні кодові скорочення.

1634

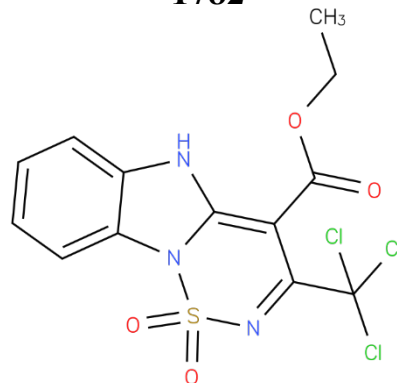
етил 3-метил-5*H*-[1,2,6]тіадіазино[2,3-*a*]бензimidазол-4-карбоксилат-1,1-діоксид

1870

етил 3-(дифлуорометил)-5*H*-[1,2,6]тіадіазино[2,3-*a*]бензimidазол-4-карбоксилат-1,1-діоксид

1796

етил 3-[бromo(дифлуоро)метил]-5*H*-[1,2,6]тіадіазино[2,3-*a*]бензimidазол-4-карбоксилат-1,1-діоксид

1782

етил 3-(трихлорометил)-5*H*-[1,2,6]тіадіазино[2,3-*a*]бензimidазол-4-карбоксилат-1,1-діоксид

Рисунок 4.8 Структурні формули та повні назви за номенклатурою IUPAC підгрупи [1,2,6]тіадіазино-[2,3*a*]бензimidазолів з етил карбоксилатом у положенні 4= гетероциклу

Результати дослідження цитотоксичності на культурі клітин MDCK демонстрували дозозалежний вплив групи [1,2,6]тіадіазино-[2,3*a*]бензimidазолів. Серед першої підгрупи речовин сполука 2618, як представник скефолду без вмісту

галогенометильних груп та нітрилу/етил карбоксилату, проявила найнижчий цитотоксичний ефект. Проте слід зазначити, що крива залежності частки живих клітин від концентрації речовини (рис. 4.9) не була лінійною, і у діапазоні від 50 до 500 мкг/мл спостерігалася близько 40-50% пригнічення життєздатності клітин.

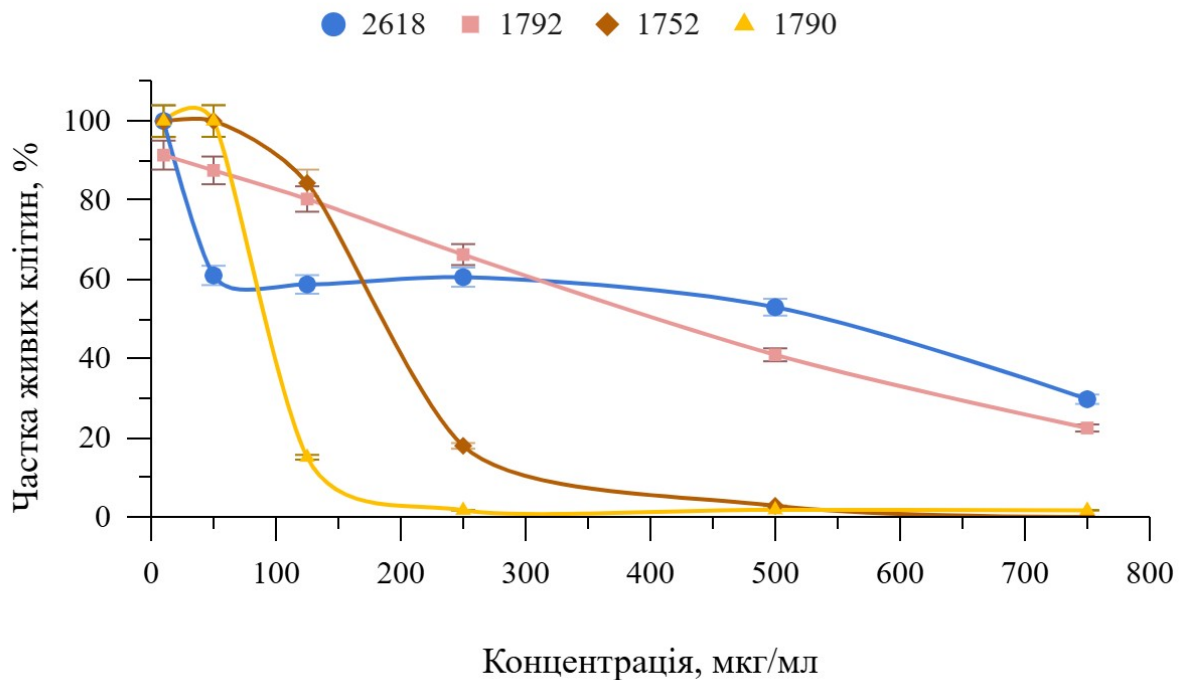


Рисунок 4.9 Вплив сполук з нітрилом (або метилом) у положенні 4 [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензимидазолу на життєздатність культури клітин MDCK. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Решта сполук з нітрилом у положенні 4 [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензимидазолу демонструвала різний вплив на культуру клітин, що обумовлено різним складом галогенометильної групи (рис. 4.9). Для речовини 1792, що містить $-\text{CF}_2$, спостерігалася лінійна залежність життєздатності клітин від концентрації зі зменшенням частки живих клітин на $>43\%$ при 250-700 мкг/мл. Сполуки 1752 і 1790 з $-\text{CF}_2\text{Br}$ та $-\text{CCl}_3$, відповідно, у складі мали схожі криві залежності, проте різний

цитотоксичний ефект. Так для 1752 частка живих клітин становила $\geq 17\%$ починаючи з 250 мкг/мл і нижче, а для 1790 відсоток живих клітин $\geq 15\%$ спостерігався з 125 мкг/мл і нижче. Таким чином, сполука 1790 була найбільш токсичною серед речовин з нітрилом (або метилом) у положенні 4 [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензimidазолу.

Серед другої підгрупи [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензimidазолів, що містять етил карбоксилат у положенні 4 гетероциклу (рис. 4.10), сполука 1634 без галогенометильної групи була найменш токсичною для культури MDCK. Так для неї частка живих клітин $\approx 50\%$ спостерігалася за концентрації 750 мкг/мл. Схожу криву залежності мала 1782 з $-\text{CCl}_3$ у складі. Проте 1782 демонструвала дещо сильніший вплив на клітини і за концентрації 750 мкг/мл знижувала їхню життєздатність на $\approx 58\%$.

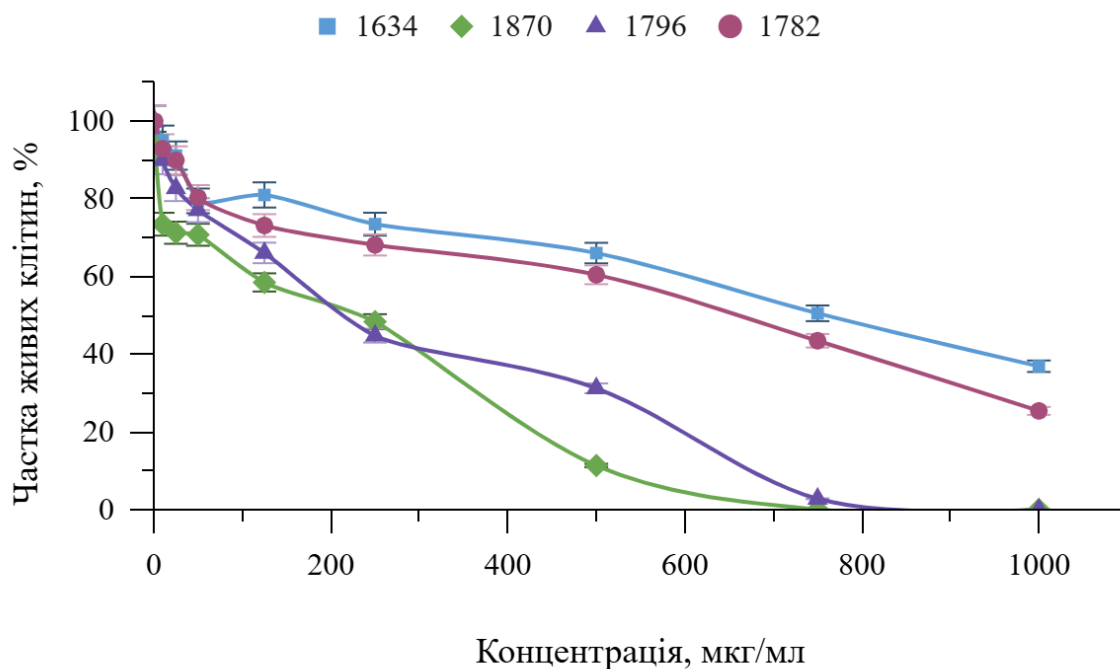


Рисунок 4.10 Вплив сполук з етил карбоксилатом у положенні 4 [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензimidазолу на життєздатність культури клітин MDCK. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Отже, якщо розташувати усі досліджувані [1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензimidазоли за розрахованими індексами CC_{50} (таблиця 4.2) у порядку збільшення цитотоксичності, то послідовність буде наступною: 1634 ($-COO-CH_2-CH_3$ і $-CH_3$), 1782 ($-COO-CH_2-CH_3$ і $-CCl_3$), 2618 ($-CH_3$ і $-CH_3$), 1792 ($-C\equiv N$ і $-CF_2$), 1752 ($-C\equiv N$ і $-CF_2Br$), 1870 ($-COO-CH_2-CH_3$ і $-CF_2$), 1796 ($-COO-CH_2-CH_3$ і $-CF_2Br$), 1790 ($-C\equiv N$ і $-CCl_3$).

Таблиця 4.2 Індеси CC_{50} [1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензimidазолів для культури клітин MDCK

| | | | | |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Сполука | 2618 | 1792 | 1752 | 1790 |
| CC_{50} , мкг/мл | 466,25±22,38 | 435,46±20,91 | 244,04±11,71 | 92,05±4,42 |
| Сполука | 1634 | 1870 | 1796 | 1782 |
| CC_{50} , мкг/мл | 752,28±36,11 | 230,87±11,08 | 216,55±10,39 | 647,58±31,08 |

Таким чином, сполуки без галогенів у складі молекули (2618 і 1634) є найменш токсичними у межах обох підгруп. Проте у розрізі усіх досліджуваних [1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензimidазолів саме 1634 має найнижчу та відносно оптимальну цитотоксичність для культури клітин MDCK, разом з 1782 (обидва містять етил карбоксилат). Сполуки 2618 та 1792 з нітрилом у складі демонструють помірну цитотоксичність. Речовини з $-CF_2$ та $-CF_2Br$ у складі (1752, 1870 та 1796) можна назвати відносно токсичними для даної культури. І сполука 1790, яка містить нітрil і $-CCl_3$ чинить найбільший вплив на клітини серед даної групи.

Відповідно до оцінки ADMETlab 3.0, усі [1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензimidазоли володіли фізико-хімічними характеристиками, які споріднюють їх з вже затвердженими лікарськими речовинами (додаток 2). Більшість сполук були схожими за параметрами Медичної хімії, зокрема всі вони порушували правило Fsp^3 , що, очевидно, було наслідком їх здебільшого планарної структури. Речовини 1796 та 1782, окрім Fsp^3 , також порушували правила QED та GSK, що пов'язано з молекулярною масою, дещо більшою за оптимум.

Здатність усіх досліджуваних [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензimidазолів проникати через фізіологічні бар'єри також була схожою. Зокрема, всі вони характеризувалися щонайменше 30% прогнозованою біодоступністю та здатністю проникати через клітинні шари Caco-2 і MDCK. Слід зазначити, що всі речовини з флуором у складі, а також 1634, потенційно є здатними виступати інгібіторами Pgp-транспортера, натомість сполуки з трихлорметильною групою порушували правило PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay), що дещо ставить під сумнів розрахований для цих сполук високий потенціал до проникності через фізіологічні бар'єри.

Порівняно з попередніми характеристиками, за параметрами розподілу більшість із цих сполук мали неоптимальні прогнози. Зокрема, більшість з них володіли надлишковою спорідненістю до альбуміну крові. Лише речовини 2618 та 1792 мали прогнозований рівень іммобілізації білками плазми крові близько 90%, що хоча і було граничним значенням, все ж теоретично дозволяє їм бути достатньо доступними для прояву цільової активності в умовах організму.

В контексті потенційного шляху метаболічного перетворення всі досліджувані [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензimidазоли в різній мірі були здатними виступати інгібіторами/субстратами різних ізоформ цитохрому P450. Зокрема, усі сполуки першої підгрупи мали потенціал бути субстратом для CYP1A2, більшість з них могли також інгібувати цей цитохром, що свідчить про однозначне його залучення, хоча ступінь і роль залишається невідомою. У випадку інших ізоформ P450 ситуація більш передбачувана. Речовини 2618 та 1790, ймовірно, є субстратами для CYP2C9 та CYP3A4, сполука 1752 може бути субстратом лише для CYP3A4, натомість 1792 має потенціал до інгібування CYP2C9. Сполуки другої підгрупи мали більший потенціал бути інгібіторами цитохрому P450. Зокрема всі вони були здатними інгібувати CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 та CYP2C8. Проте, слід зазначити, що у випадку 1782 ситуація не настільки однозначна, і ця сполука була здатна також бути субстратом для CYP1A2, CYP2C19 та CYP2C9.

Розглядаючи більш складні і загальні моделі токсичності, всі речовини цієї групи порушували правила DILI та Human Hepatotoxicity, а також мали потенціал до генотоксичності. Останні, у випадку більшості речовин, окрім 1792, доповнювались здебільшого помірним потенціалом до канцерогенності.

Таким чином, з точки зору потенційної фармакокінетики [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензimidазолів, усі вони характеризувалися схожими і відносно прийнятними показниками Медичної хімії і біодоступності. При цьому, за розрахунками, усі сполуки даної групи мали проблеми з розподілом, важко передбачуваним метаболізмом і токсичністю. При цьому, слід зазначити, що флуоровмісні форми порушували відносно менше правил. Враховуючи, що описані вище дані визначення цитотоксичності *in vitro* демонстрували відносно значну різницю між різними представниками групи, можна припустити, що деякі сполуки, як от 1790, можуть більш селективно впливати на функціонування саме клітин MDCK.

Антивірусна активність [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензimidазолів відносно вірусу грипу типу А визначалася за пост-експозиційною схемою дослідження. У попередньо інфіковану вірусом грипу культуру клітин вносили сполуки у діапазоні концентрацій, розрахованому з урахуванням результатів цитотоксичності. Так для речовин 2618, 1792 та 1782 використовували діапазон від 10 до 300 мкг/мл, для 1634 – від 10 до 600 мкг/мл, для 1752 та 1870 – від 0,1 до 200 мкг/мл, і для 1796 та 1790 від 0,1 до 100 мкг/мл.

За результатами дослідження серед усіх представників групи лише 4 проявили антивірусний ефект. Сполуки 1634 ($-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ і $-\text{CH}_3$), 2618 ($-\text{CH}_3$ і $-\text{CH}_3$), 1752 ($-\text{C}\equiv\text{N}$ і $-\text{CF}_2\text{Br}$) та 1790 ($-\text{C}\equiv\text{N}$ і $-\text{CCl}_3$) не виявили впливу на репродукцію вірусу за даної схеми визначення активності.

Серед речовин першої підгрупи тільки 1792 ($-\text{C}\equiv\text{N}$ і $-\text{CF}_2$) проявила протигрипозний ефект. Проте, її вплив обмежився лише однією концентрацією: при використанні 300 мкг/мл спостерігали $74,56\pm 2,98\%$ антивірусної активності (рис. 4.11). Серед другої підгрупи усі сполуки, що містять етил карбоксилат та галогени,

продемонстрували чітко виражений дозозалежний ефект на вірус грипу типу А (рис. 4.11).

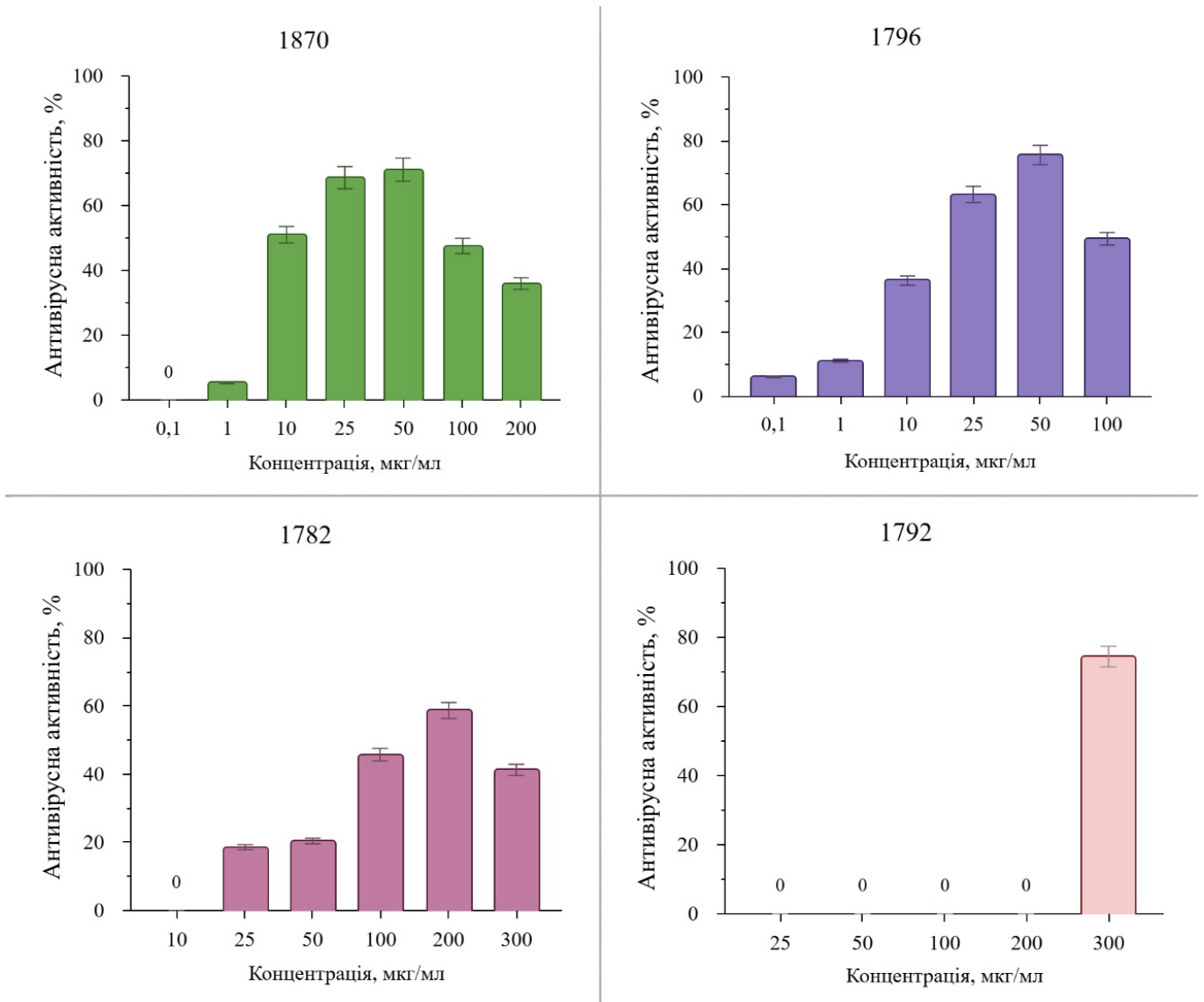


Рисунок 4.11 Вплив [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензimidазолів на репродукцію вірусу грипу типу А у культурі клітин MDCK за пост-експозиційної схеми внесення. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Послідовне визначення інфекційних титрів (ТЦД₅₀/мл) новосинтезованого ІАВ у присутності 1792 (рис. 4.12) показало, що за цієї ж концентрації відбувалося зниження ТЦД₅₀/мл на $1,90 \pm 0,09$ порядку відносно контролю вірусу.

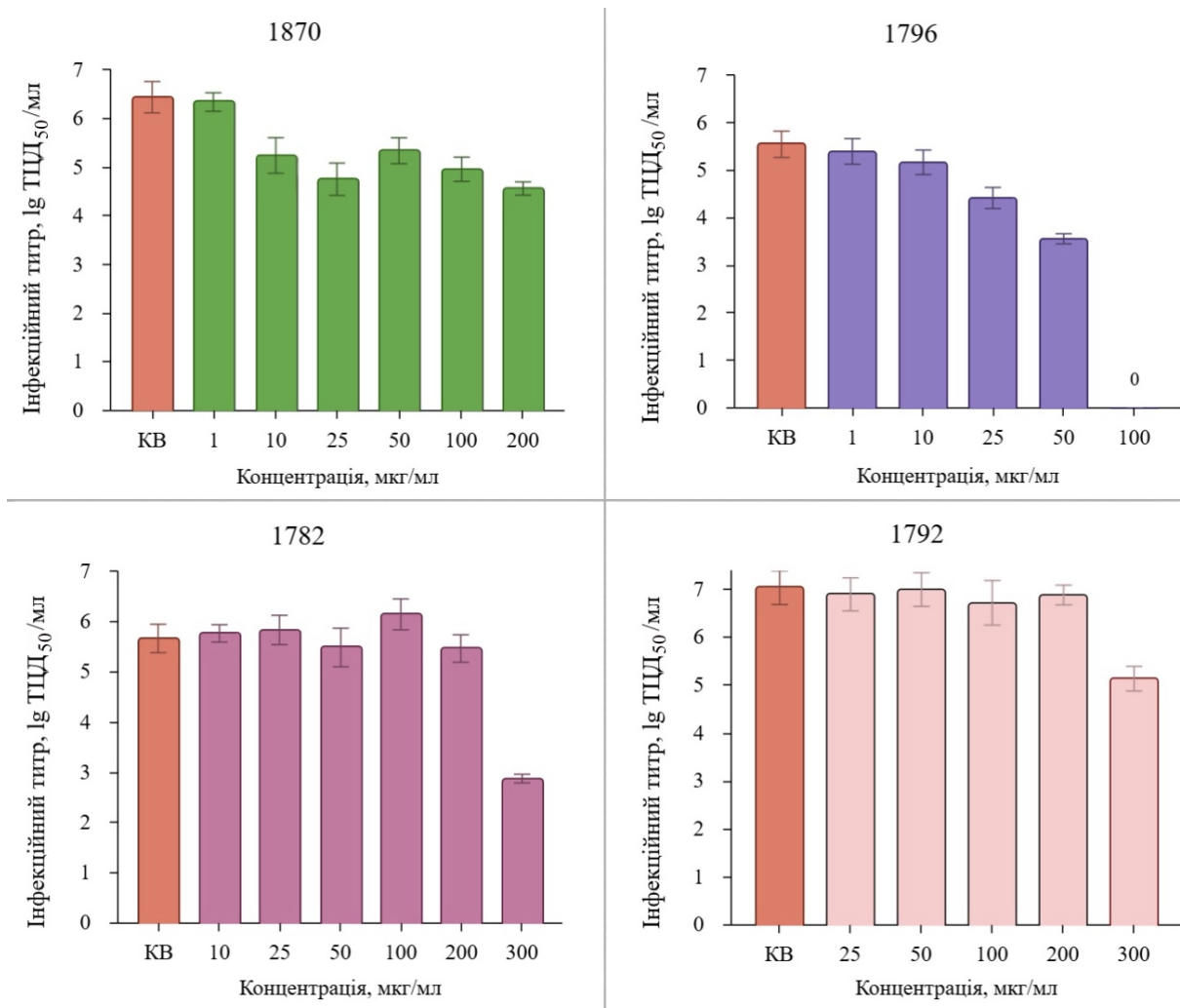


Рисунок 4.12 Інфекційні титри (ТЦД₅₀/мл) вірусу грипу типу А, що реплікувався у культурі клітин MDCK у присутності [1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензimidазолів. Дані представлені як середнє значення ± SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Серед активних сполук найвищий пік ефективності у $75,67 \pm 3,41\%$ за концентрації 50 мкг/мл мала 1796 з $-CF_2Br$ у складі. Антивірусна активність $<50\%$ для даної сполуки спостерігалось за концентрацій 100 мкг/мл, а також нижче 25 мкг/мл. Водночас, визначення інфекційних титрів показало (рис. 4.12), що при 100 мкг/мл інфекційний вірус не ідентифікувався ($lg \text{TCID}_{50}/\text{мл} = 0$), а при 50 мкг/мл титр знижувався на $1,99 \pm 0,07$ порядку відносно контролю.

Високу ефективність також проявила сполука 1870 ($-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ і $-\text{CF}_2$). Вона демонструвала 2 піка: $71,19 \pm 3,59\%$ антивірусної активності при 50 мкг/мл та $68,7 \pm 3,52\%$ при 25 мкг/мл (рис. 4.11). Подальше зниження активності до $<50\%$ спостерігалось за концентрацій нижче 10 мкг/мл та більше 50 мкг/мл. Проте, на відміну від 1796, не відбувалося значне зниження інфекційності новосинтезованого потомства IAV: зменшення ТЦД₅₀/мл на $>1,8$ порядку відносно контролю мало місце лише за концентрації 200 мкг/мл (рис. 4.12).

Найнижчу ефективність серед другої підгрупи [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензimidазолів продемонструвала сполука 1782 із $-\text{CCl}_3$ у складі. Для неї пік становив $58,70 \pm 2,99\%$ антивірусної активності при 200 мкг/мл, і, відповідно, за решти концентрацій інгібування становило $<50\%$ з повною відсутністю впливу при 10 мкг/мл (рис. 4.11). Результат визначення титру новосинтезованого вірусу вказував на те, що втрата інфекційності на $2,79 \pm 0,09$ порядку відносно контролю відбувалася лише за концентрації 300 мкг/мл (рис. 4.12).

Для [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензimidазолів, що демонструють активність відносно вірусу грипу було розраховано показники EC₅₀ та SI (індекс селективності) для оцінки їхнього потенціалу як кандидатів у протівірусні препарати (таблиця 4.3).

Таблиця 4.3 Індекси EC₅₀ та SI [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензimidазолів з протигрипозною активністю

| Сполука | 1870 | 1796 | 1782 | 1792 |
|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|
| EC ₅₀ , мкг/мл | $9,79 \pm 0,47$ | $16,62 \pm 0,79$ | $130,73 \pm 6,27$ | $267,06 \pm 12,82$ |
| SI | $23,58 \pm 1,13$ | $13,03 \pm 0,63$ | $4,95 \pm 0,23$ | $1,63 \pm 0,07$ |

Найвищий показник SI або ж співвідношення між CC₅₀ та EC₅₀ мала сполука 1870, на другому місці після неї знаходилась 1796. Речовини 1782 і 1792 в загальному можна вважати слабо перспективними, оскільки їхні SI <10 .

Таким чином, серед групи з 8 досліджуваних [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензimidазолів було визначено 2 сполуки з вираженою антивірусною

активністю відносно вірусу грипу типу А Н1N1. Обидві молекули мають у складі етил карбоксилат у положенні 4 гетероциклу та галогенометильну групу у положенні 3. Незважаючи на схожий патерн активності, сполука 1870 з дифлуорометиллом вважається найбільш перспективною за рахунок величини розрахованого SI.

Зважаючи на це, 1870 була обрана як найбільш активний представник групи для визначення можливого механізму дії [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензimidазолів. Враховуючи ароматичну природу молекули 1870 і відповідної структурної подібності до пуринів, ця сполука була здокована до кеп-зв'язуючого домену субодиниці PB2 вірусної RdRp. Подальша симуляція молекулярної динаміки 1870 у комплексі з ціллю дозволила в значній мірі підтвердити припущення про потенційний її вплив на процес кеп-снетчингу. Зокрема, досліджувана структура стабільно знаходилась в межах зони докування протягом всіх 200 нс симуляції. Її бензimidазольна частина формувала стабільні стекінгові взаємодії з F325, H357, F404 та Q406 і виступала в ролі якоря розташованого найближче до корової частини білка. Група $-COO-CH_2-CH_3$, попри стеричні обмеження створені дифлуорметиллом, здебільшого знаходилась в конформації за якої формувала внутрішньомолекулярний водневий зв'язок з нітрогеном VZ1 через його протон.

Рідкісними, але також присутніми були події за яких етил карбоксилат взаємодіяв з H357 та K339. Сульфонова група здебільшого не утворювала націлених взаємодій, однак зрідка додатково стабілізувалась через водневі зв'язки з R355 або H432. Подібна ситуація спостерігалась протягом майже всього періоду симуляції, однак на фінальних 50 нс більш полярна частина молекули зазнала тимчасової дестабілізації, за якої $-COO-CH_2-CH_3$ значно відхилився від свого вихідного положення і сформував короткотривалий водневий зв'язок з H432. При цьому, на кінець симуляції, положення 1870 у межах кеп-зв'язуючого домену субодиниці PB2 RdRp було близьким до вихідного (рис. 4.13, А).

Спостереження, отримані під час аналізу траєкторії симуляції,

підтверджуються і середньоквадратичним відхиленням ліганду (рис. 4.13, Б). Більшість періоду симуляції RMSD 1870 було стабільним і коливалось в межах 5-6 Å. Його значні коливання спостерігались лише під кінець експерименту та затихли до кінця симуляції.

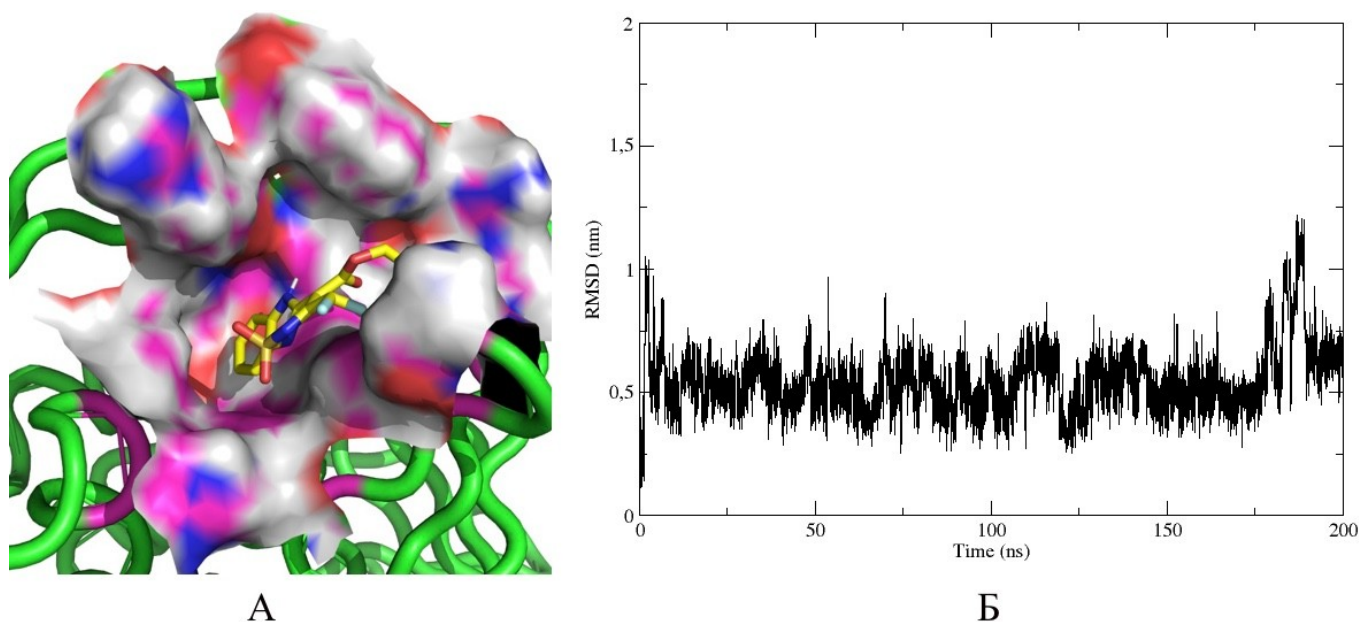


Рисунок. 4.13 Спорідненість сполуки 1870 до субодиниці PB2 RdRp вірусу грипу типу А: А – комплекс 1870 з кеп-зв'язуючою ділянкою PB2 під час симуляції молекулярної динаміки; Б – графік залежності середньоквадратичного відхилення ліганду від часу симуляції

Отже, за результатами дослідження біологічної активності, група галогеновмісних [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензімідазолів проявляє цитотоксичний ефект на культуру клітин MDCK залежно від складу молекули. Загалом, сполуки з нітрильною групою є більш токсичними, порівняно з такими з етил карбоксилатом. З точки зору складу галогенометильної групи, молекули з $-\text{CF}_2$ та $-\text{CF}_2\text{Br}$ у складі чинили найбільший вплив на клітини. Оцінка параметрів ADMET вказує на те, що усі [1,2,6]тіадіазино-[2,3а]бензімідазоли мають оптимальні фізико-хімічні параметри, проте порушують правило F_{sp^3} (частка sp^3 гібридизованих атомів

карбону). Хоча прогнозовані характеристики біодоступності є відносно прийнятними, дані сполуки потенційно можуть мати проблеми з розподілом, метаболізмом та гепатотоксичністю.

Дослідження протигрипозного впливу показало, що лише половина сполук проявили антивірусний ефект, при чому більшість із них містили у складі молекули $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ та флуор у галогенометильній групі. Максимальне значення антивірусної активності відносно IAV у культурі MDCK сягало 75,6% для речовини 1796 та 71,1% для 1870. Водночас, спостерігався вплив на інфекційність нового вірусного потомства: від повного пригнічення до зменшення титру на 1-2 порядку в залежності від сполуки та її концентрації [185]. За обрахованими SI, найбільш перспективною серед усієї групи є сполука 1870 з $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ і $-\text{CF}_2$ у складі. На основі її структурної подібності до пуринів було проведено розрахунковий експеримент, щодо здатності її взаємодії з субодиницею PB2 вірусної RdRp. Молекула 1870 стабільно взаємодіяла з CBD PB2 з утворенням стекінгових та водневих взаємодій, що може свідчити про її потенційний механізм дії.

4.1.3 Дослідження флуоровмісних похідних тіофену та аналогів нуклеозидів на їх основі

Наступна група речовин представлена 4 сполуками, в основі яких лежить тетрагідротіофен (ТНТ, п'ятичленний насичений цикл із одним атомом сірки) в положенні 2 якого знаходиться гідроксиметил ($-\text{CH}_2\text{OH}$) та трифлуорометил (рис. 4.14). Сполуки 10S-45 та 10S-49 складаються з вище перерахованих елементів та додаткових гідроксильних груп у положенні 4 та 5 тіофену.

Решта представників групи (10S-46 та 10S-48) містять тетрагідропіримідин-2,4-діон з'єднаний з атомом карбону у положенні 5 тетрагідротіофену. Водночас, 10S-48 має додаткову гідроксильну групу у положенні 4 п'ятичленного кільця.

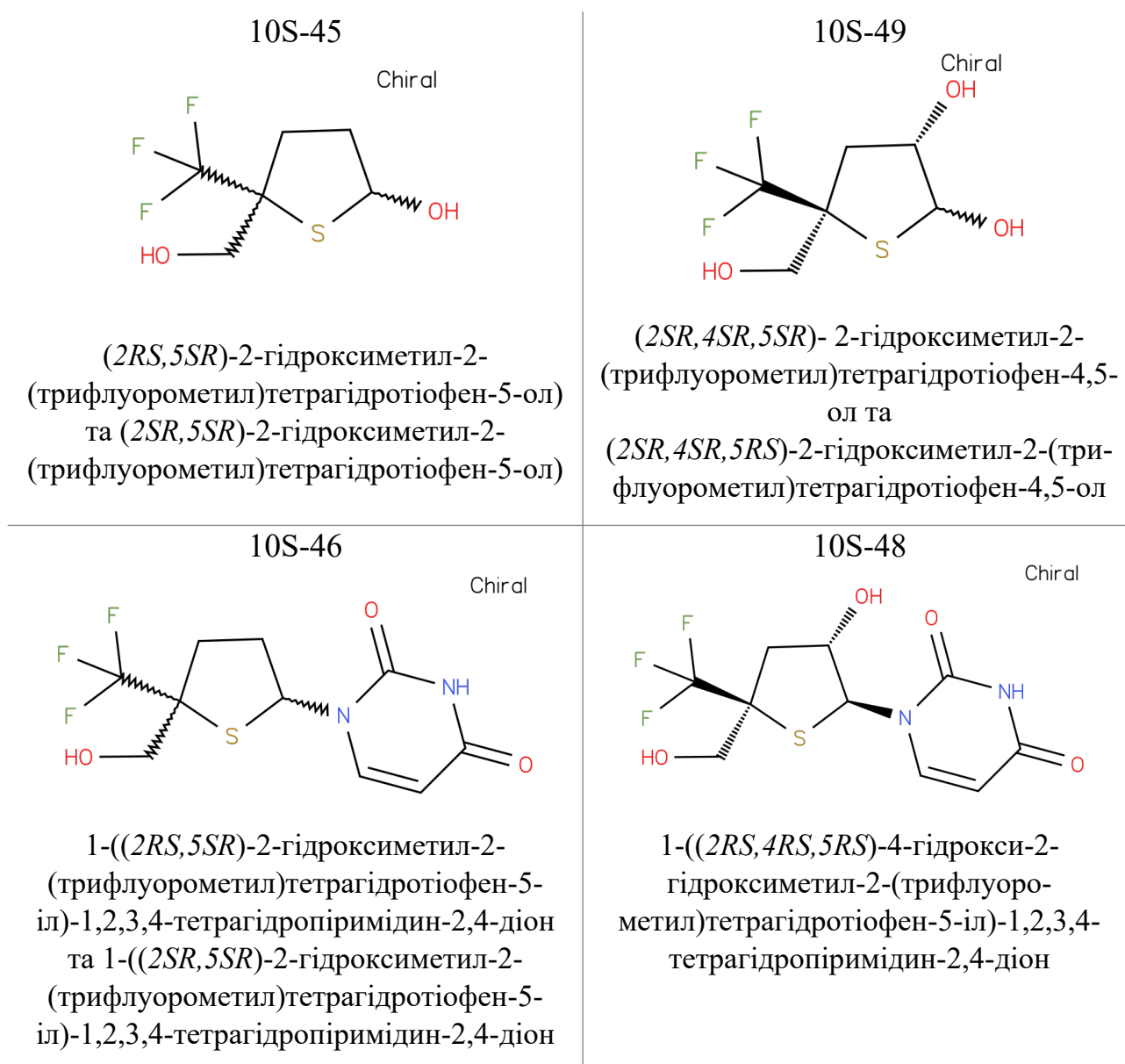


Рисунок 4.14 Структурні формули та повні назви за номенклатурою IUPAC досліджуваних флуоровмісних похідних тіофену та аналогів нуклеозидів на їх основі

Також, усі речовини, крім 10S-48, були синтезовані у вигляді суміші діастереомерів, тому їхні назви подано з використанням стереохімічних дескрипторів згідно з R,S-номенклатурою.

Флуоровмісні похідні тіофену проявили дозозалежний цитотоксичний вплив на культуру клітин MDCK. Сполуки 10S-45, 10S-46 та 10S-48 мають схожі криві

залежності частки живих клітин від концентрації речовини (рис. 4.15) та знижували життєздатність культури на >50% за концентрації 500 мкг/мл та вище. Відповідно, вони також мали схожі значення CC_{50} , що знаходяться у діапазоні 529 - 577 мкг/мл.

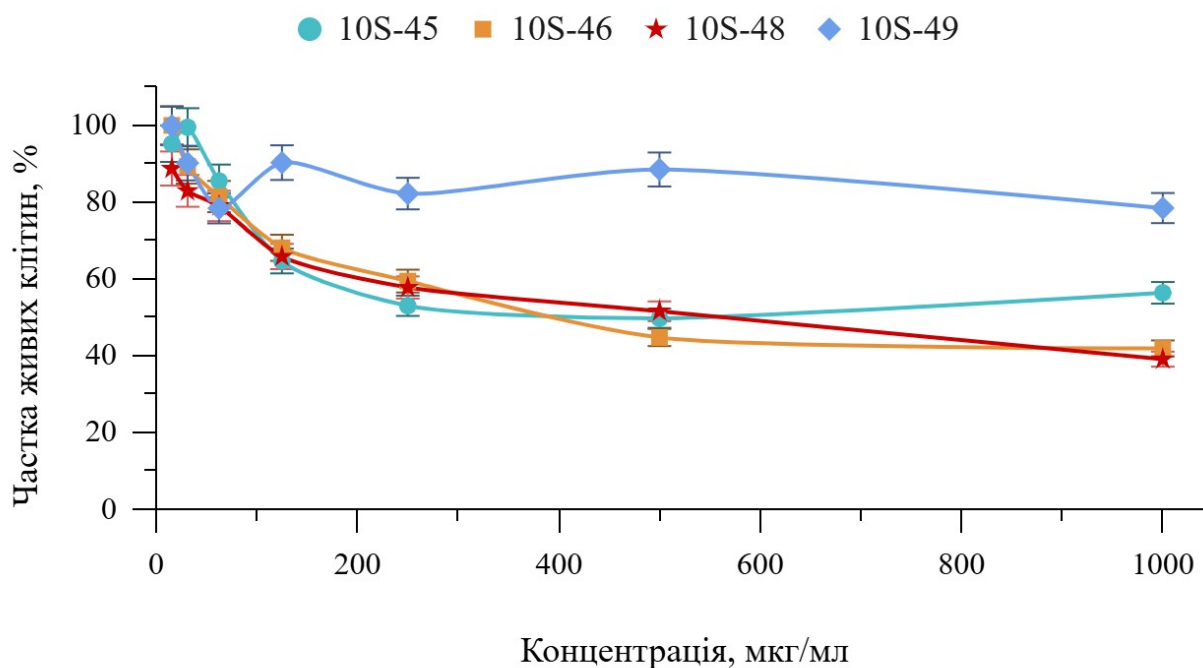


Рисунок 4.15 Вплив флуоровмісних похідних тіофену на життєздатність культури клітин MDCK. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Сполука 10S-49, незважаючи на структурну подібність до 10S-45, не проявила значного впливу на культуру клітин. У найбільшій досліджуваній концентрації 1000 мкг/мл частка живих клітин становила $78,45 \pm 4,32\%$, що робить даного представника групи флуоровмісних похідних тіофену найменш токсичним.

Відповідно до оцінки ADMETlab 3.0 (додаток 3), сполуки цієї групи за більшістю фізико-хімічних параметрів є відносно оптимальними кандидатами у лікарські препарати. Усі представники, крім 10S-45, мали значення logD дещо зміщене в сторону надлишкової гідрофільності за фізіологічного рН.

З точки зору параметрів групи Медичної хімії, сполуки 10S-45 та 10S-49 могли бути оцінені як «непривабливі» за правилом QED, яке враховує як абсолютні значення, так і співвідношення фізико-хімічних параметрів. За всіма іншими правилами цієї групи, речовини були такими ж оптимальними як і 10S-46 та 10S-48.

Спираючись на більш абстрактні моделі, що стосуються потенційної взаємодії з організмом, біодоступність всіх сполук, окрім 10S-45, при пероральному застосуванні, ймовірно, буде достатньо високою. Однак слід зазначити, що однозначність в цьому питанні в даному випадку є відносною, оскільки 10S-46, 10S-48 та 10S-49, на відміну від 10S-45, порушували правило «Caco-2 Permeability», що входить в деяку суперечність з правилами групи «F». Натомість, параметри розподілу всіх чотирьох сполук були схожими і можуть розглядатися як еталонні для лікарських препаратів: їх депонована альбуміном крові частка коливалася в межах від 55% до 75%.

Дещо інша ситуація спостерігалася у випадку розрахованих параметрів токсичності і стабільності. Зокрема, за правилом HLM ці речовини потенційно можуть бути швидко метаболізовані печінкою, що особливо стосується більш структурно складних 10S-46 та 10S-48. Ці ж речовини одночасно були і більш токсичними, сильніше порушуючи правила DILI та Human Hepatotoxicity. Останнє є логічним оскільки саме печінка є органом, який найбільш активно метаболізує більшість лікарських сполук, однак не узгоджується із паттерном правил P450 – приналежність певної речовини до субстратів тих чи інших цитохромів не виявила помітних кореляцій з структурою конкретної речовини. З іншої сторони, подібна залежність спостерігалася у випадку параметрів Carcinogenicity та Genotoxicity. Це, ймовірно, пов'язано з приналежністю 10S-46 та 10S-48 до структурних аналогів нуклеозидів і відповідного потенціалу цих сполук виступати субстратами не тільки для вірусних, але і клітинних полімераз.

Таким чином, флуоровмісні похідні тіофену, попри деякі потенційні проблеми з гепатотоксичністю і можливою здатністю впливати на геном, володіють напрочуд

прийнятними для кандидатів в ліки фізико-хімічними параметрами і пов'язаними з цим оптимальним розподілом їх активної і зв'язаної часток.

Результати визначення антивірусного ефекту за пост-експозиційною схемою вказували на активність більшості представників групи (рис. 4.16).

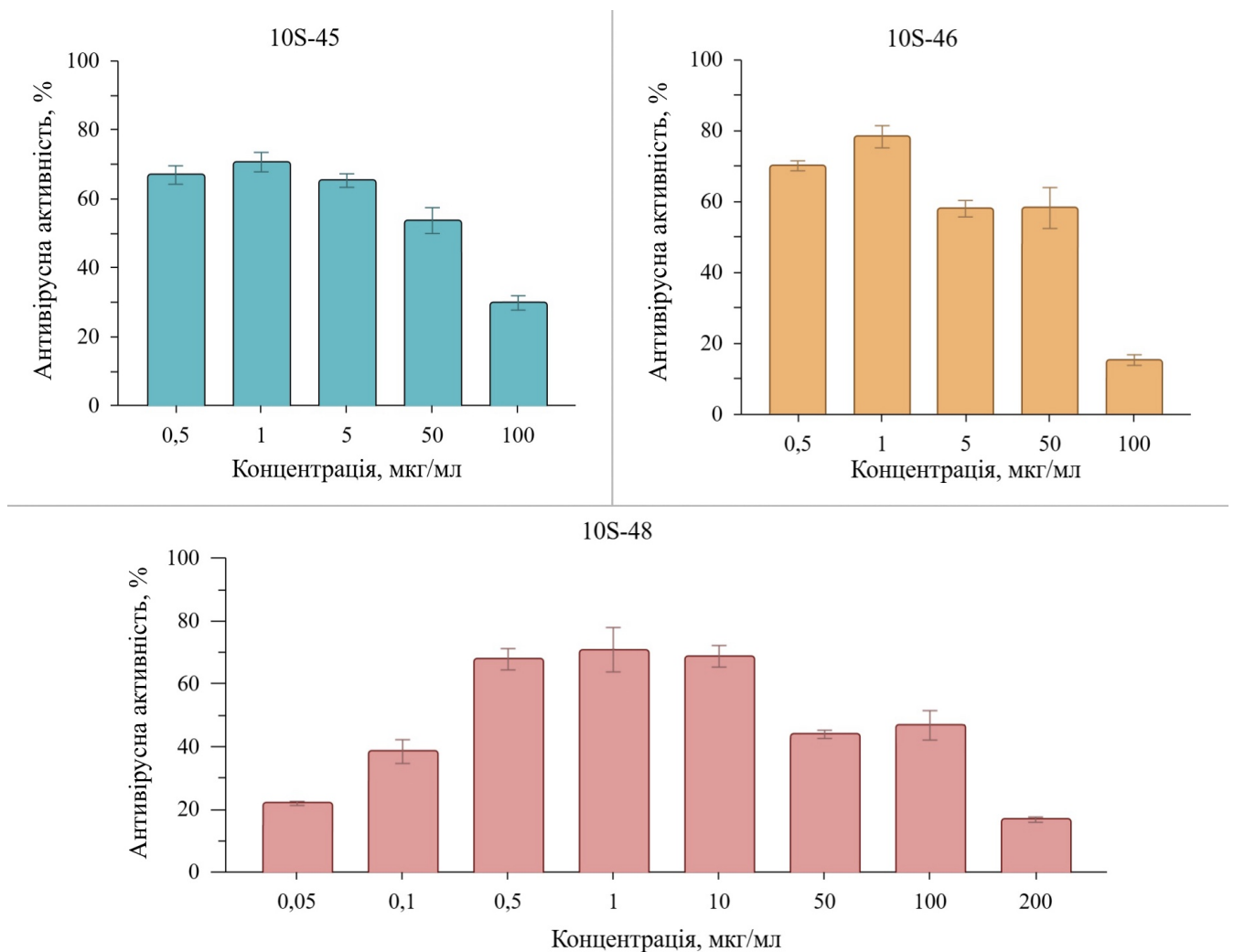


Рисунок 4.16 Вплив флуоровмісних похідних тіофену на репродукцію вірусу грипу типу А у культурі клітин MDCK за пост-експозиційної схеми внесення. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Речовина 10S-49 не мала впливу на репродукцію вірусу грипу у культурі клітин MDCK за діапазону концентрацій від 0,5 до 200 мкг/мл. При цьому решта

сполук проявили дозозалежний протигрипозний ефект. Всі вони демонстрували пік ефективності за концентрації 1 мкг/мл. Водночас показники були схожими: для 10S-45 найвищий ефект становив $70,66 \pm 3,42\%$ антивірусної активності, для 10S-46 – $78,24 \pm 4,77\%$, і для 10S-48 – $70,86 \pm 6,38\%$. Також для усіх трьох сполук спостерігалось зниження активності за концентрацій <1 мкг/мл. Відповідно, було розраховано показники напівмаксимальної ефективності EC_{50} (таблиця 4.4). Для сполук 10S-45 та 10S-46, досліджуваний діапазон концентрацій яких становив від 0,5 до 100 мкг/мл, індекси EC_{50} становили близько 50 мкг/мл. Для 10S-48, діапазон концентрацій для якої був розширений, $EC_{50} = 0,42 \pm 0,01$ мкг/мл.

Для флуоровмісних похідних тіофену, що проявили протигрипозну активність було також розраховано показники SI (таблиця 4.4). Таким чином, найвищий показник індексу – 1383,09 – у сполуки 10S-48, що робить її найбільш перспективною структурою серед усієї групи. Проте варто зазначити, що 10S-45 та 10S-46 зі значеннями SI >10 також є вартими уваги для подальших досліджень.

Таблиця 4.4 Індекси біологічної активності флуоровмісних похідних тіофену

| Сполука | 10S-45 | 10S-46 | 10S-48 | 10S-49 |
|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| CC_{50} , мкг/мл | $537,08 \pm 26,85$ | $529,57 \pm 26,48$ | $577,75 \pm 28,87$ | $1156,66 \pm 52,05$ |
| EC_{50} , мкг/мл | $51,49 \pm 2,57$ | $50,96 \pm 2,55$ | $0,42 \pm 0,01$ | - |
| SI | $10,43 \pm 0,52$ | $10,39 \pm 0,51$ | $1383,09 \pm 52,56$ | - |

Зважаючи на те, що досліджувані флуоровмісні сполуки є прямими аналогами нуклеозидів, можливий механізм їхньої дії на вірус грипу може бути пов'язаним із взаємодією з вірусним полімеразним комплексом. Тому використовуючи метод симуляції молекулярної динаміки було досліджено взаємодію 10S-45, 10S-46 та 10S-48 з CBD субодиниці PB2 RdRp.

Для 10S-45 та 10S-46, отриманих у вигляді суміші діастереомерів, попередньо були згенеровані всі можливі їх просторові форми (таблиця 4.5).

Отримані 8 структур були здоквані до активного центру CBD PB2 вірусної RdRp. Їх розрахована афінність знаходиться в межах від -4,88 до -8,26 ккал/моль (таблиця 4.5).

Таблиця 4.5 Афінність кожного діастереомеру 10S-45 і 10S-46 до активного центру CBD RdRp (напівгнучкий молекулярний докінг)

| Сполука | 10S-45 | | | |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|
| Структурна формула | | | | |
| Афінність, ккал/моль | -4,882 | -5,801 | -5,027 | -4,939 |
| Сполука | 10S-46 | | | |
| Структурна формула | | | | |
| Афінність, ккал/моль | -6,811 | -7,205 | -8,265 | -6,722 |

Речовина 10S-45 мала найнижчу розрахункову спорідненість, а сполуки 10S-46 та 10S-48 були подібними між собою за цим параметром. Для 10S-46 він знаходився в межах від -6,72 до -8,26 ккал/моль, а для єдиної форми 10S-48 дорівнював -8,15 ккал/моль. Крім того, найбільш активний діастереомер 10S-46 мав структуру ідентичну до такої 10S-48, за винятком відсутності гідроксильної групи у положенні 4 тіофену.

На основі розрахованої спорідненості був відібраний один стереоізомер для 10S-45 та 10S-46, які разом із 10S-48 були досліджені в межах класичного методу симуляції молекулярної динаміки.

Усі сполуки, крім 10S-45, знаходились в межах активного центру CBD до кінця симуляції (рис. 4.17). 10S-45 не виявила тенденції до формування упорядкованих взаємодій з CBD і вже до 10 нс моделювання покинула зону доування, демонструючи невпорядковані теплові переміщення до кінця експерименту.

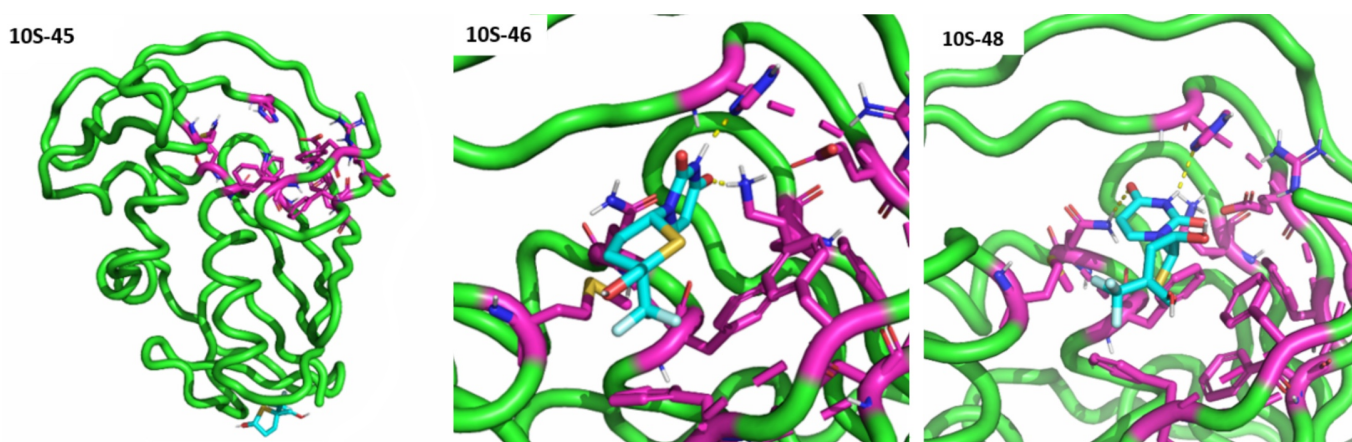


Рисунок 4.17 Досліджувані флуоровмісні похідні тіофену у комплексі із CBD RdRp

Сполука 10S-48 на початку симуляції (1-9 нс) зберігала своє вихідне положення, набуте на етапі молекулярного докінгу. Її комплекс з CBD характеризувався водневими зв'язками між кільцем урацилу та H357 і K376. При чому H357 тут виступав і як донор водневого зв'язку (амін-K376/4O-урацил/амід-H357), і як акцептор (3N-урацил/імідазол-H357). Гідроксильні групи тетрагідротіофену водневих зв'язків не утворювали. Додатково були присутні множинні стекінгові взаємодії урацилу ліганду та F404/Q406, а також атому сульфуру у складі тетрагідротіофену та F323 і F325. Після зазначеного вище

початкового періоду 10S-48 зазнала значних конформаційних перебудов, в результаті яких була повністю втрачена взаємодія ліганду з K376. Натомість з'явилися водневі зв'язки із Q406 та R332. Вони, а також взаємодія з H357 були наявними в одиничних фреймах (роздільна здатність = 1нс) траєкторії. Водночас, значна різниця в паттерні стекінгових взаємодій не спостерігалась.

Сполука 10S-46 після початку симуляції і до 5 нс також зберігала своє вихідне положення. Паттерн її взаємодій складався з водневих зв'язків між ароматичним кільцем урацилу та амінокислотами H357, E361 і K376 та гідрофобних/стек взаємодій як тетрагідротіофенового кільця, так і урацилу ліганду з амінокислотами H357, F404 та Q406. Після цього короткого початкового періоду спостерігалась втрата всіх перерахованих вище орієнтувальних контактів, хоча гідрофобні та стек взаємодії залишались незмінними. Починаючи з 43 нс симуляції спостерігалась стабілізація 10S-46 з відновленням орієнтаційних взаємодій між ароматичним кільцем урацилу та амінокислотами H357 та K376. При чому, H357 тут, подібно до експерименту з 10S-48, виступав в роді як донора, так і акцептора водневого зв'язку.

Середньоквадратичне відхилення досліджуваних сполук у комплексі із CBD загально відповідає їх траєкторії (рис. 4.18). Зокрема, з перших наносекунд спостерігався стрімкий ріст RMSD сполуки 10S-45, яке за 5 нс симуляції досягло значення більше 10 Å і продовжувало збільшуватись.

Речовини 10S-46 та 10S-48 мали дуже схожу між собою зміну RMSD з часом: в обох випадках RMSD коливалося в межах 1-3 Å і спостерігався короткий початковий період дуже низького значення із подальшим його стрибком та стабілізацією на новому рівні. Однак 10S-46 зазнавала первинних перебудов на 5 нс раніше ніж 10S-48. Загалом, розмах RMSD був значно вищим у речовини 10S-48, порівняно із 10S-46.

Підсумовуючи отримані результати досліджень групи флуоровмісних похідних тіофену та аналогів нуклеозидів на їх основі, було визначено, що усі

сполуки проявляють цитотоксичний ефект на культуру клітин MDCK, водночас для більшості із них він є подібним. Проте 10S-49, без тетрагідропіримідин-2,4-діону у складі молекули та з гідроксильною групою у положенні 4 тіофену, є у два рази менш токсичною, порівняно з рештою. Також дана сполука не проявила антивірусного ефекту відносно вірусу грипу.

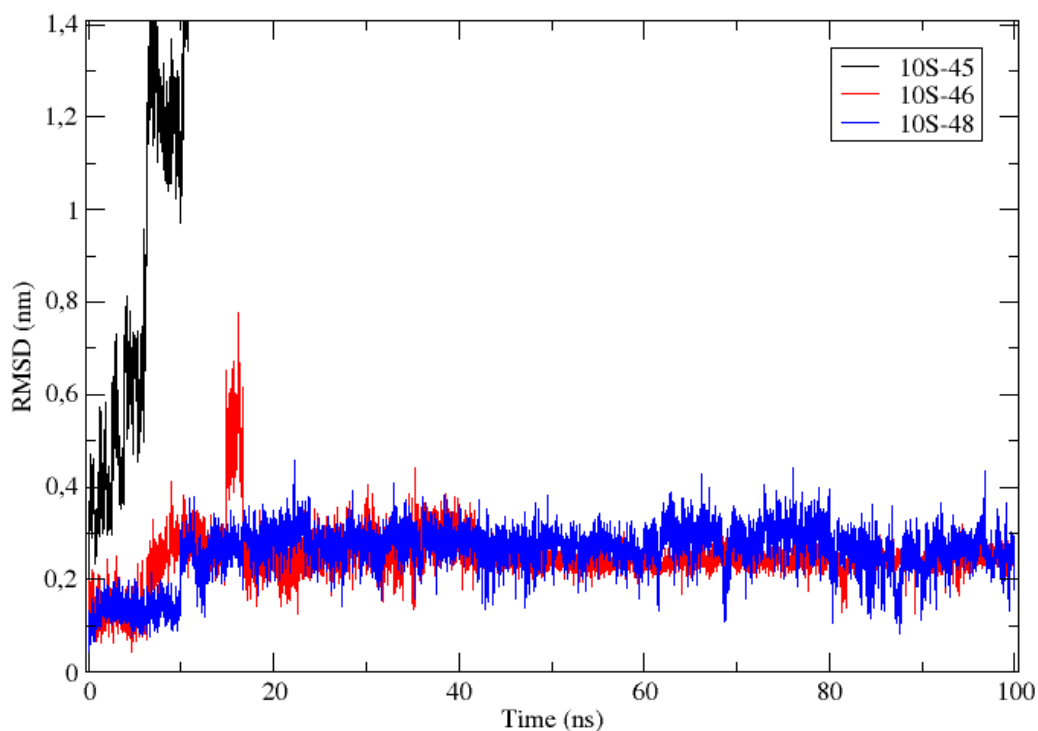


Рисунок 4.18 Середньоквадратичне відхилення сполук 10S-45, 10S-46 та 10S-48 у комплексі із CBD RdRp

Відповідно до прогнозованих характеристик ADMET, дана група сполук володіє прийнятними для кандидатів в ліки фізико-хімічними параметрами, потенційною біодоступністю (за винятком 10S-45) та розподілом. У зв'язку з тим, що 10S-46 та 10S-48 є структурними аналогами нуклеозидів, вони можуть мати проблеми з гепатотоксичністю і потенційну здатність впливати на клітинний геном.

Похідні тіофену 10S-45, 10S-46 та 10S-48 проявили протигрипозний ефект відносно IAV H1N1, водночас, максимум активності сягав більше 70%. Розраховані

значення індексу селективності свідчать про подальший потенціал даних сполук, а особливо 10S-48. Розрахунковими методами було визначено, що можливою мішенню дії аналогів піримідинів може бути ділянка CBD субодиниці РВ2 вірусного полімеразного комплексу [186-188].

4.1.4. Дослідження флуоровмісної сполуки на основі тетрагідропіран-2-тріазолу

Наступна сполука складається з 2 ідентичних частин, об'єднаних сульфонільною групою, кожна з яких містить тетрагідропіран (ТНР, шестичленний цикл з одним атомом кисню) об'єднаний положенні 2 з тріазолом (п'ятичленний цикл з 3 атомами нітрогену) та дифлуорометильну групу у положенні 5 тріазолу (рис. 4.19). Повна назва сполуки за номенклатурою IUPAC: біс(5-дифлуорометил-2-(тетрагідропіран-2-іл)-2Н-1,2,3-тріазол-4-іл)-сульфон; далі по тексту буде використовуватись її кодова назва – 10S-47.

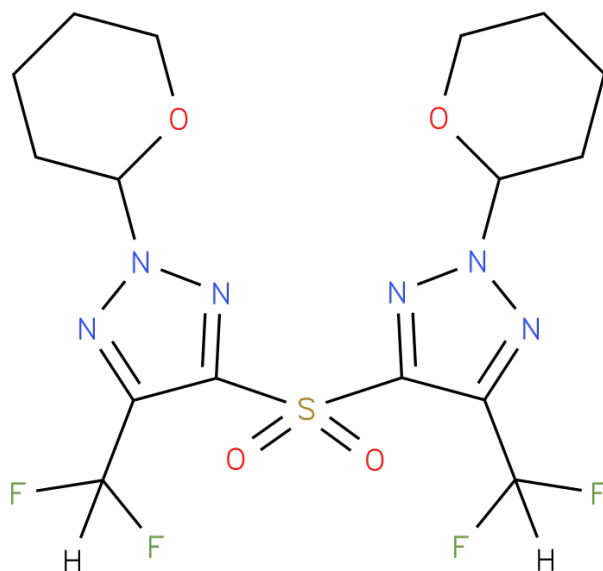


Рисунок 4.19. Структурна формула флуоровмісної сполуки 10S-47

За результатами дослідження цитотоксичності, сполука 10S-47 мала дозозалежний вплив на культуру клітин MDCK. Зниження життєздатності клітин на

>50% відбувалося за концентрацій вищих, ніж 250 мкг/мл. Хоча в діапазоні 125-250 мкг/мл значення частки живих клітин дорівнювало близько 63%, порушуючи лінійну залежність кривої (рис. 4.20). Розраховане значення CC_{50} для 10S-47 становило $471,36 \pm 17,91$ мкг/мл.

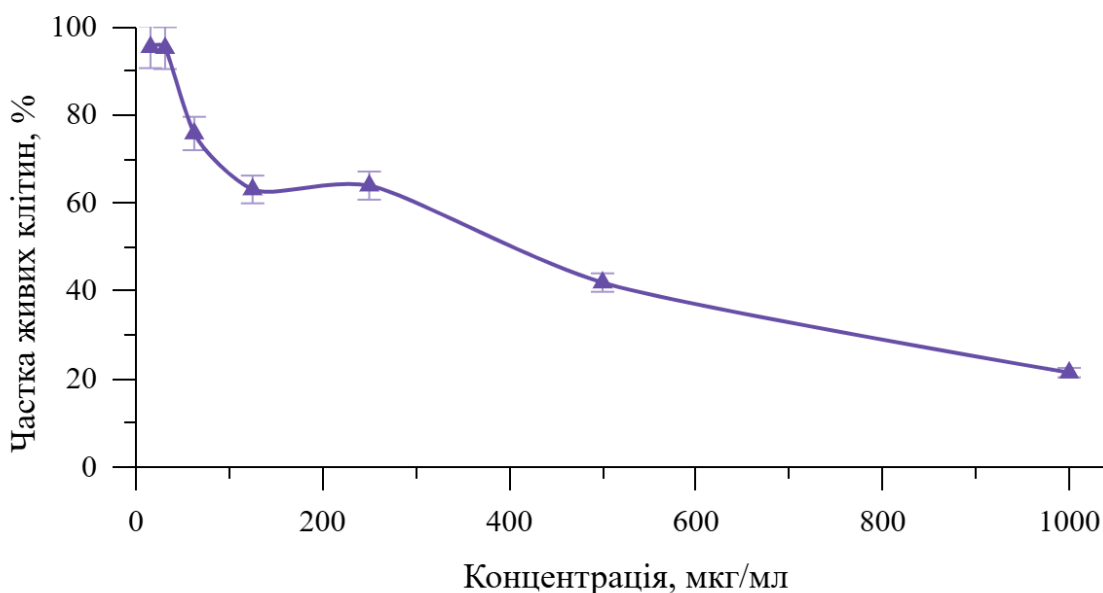


Рисунок 4.20 Вплив флуоровмісної сполуки на основі тетрагідропіран-2-тріазолу на життєздатність культури клітин MDCK. Дані представлені як середні значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Результати оцінки сполуки за допомогою ADMETlab 3.0 (додаток 4), вказували на те, що дана речовина мала оптимальні фізико-хімічні характеристики. Серед параметрів групи Медичної хімії з меж оптимуму вибивалися правила QED та GSK за рахунок дещо вищої, порівняно з прийнятною для цієї розрахункової моделі, молекулярною масою сполуки. Хоча слід зазначити, що 10S-47 не порушувала широко відоме, хоча і менш вибагливе, Правило П'яти.

Значення групи параметрів, на основі яких можна передбачити абсорбційну здатність даної сполуки, знаходились повністю в прийнятних межах. Це дозволяє

припустити, що 10S-47 за потреби може бути введено до організму перорально з біодоступністю вище 50%.

При цьому слід врахувати, що її розчинена у плазмі крові фракція ймовірно буде близькою до 6%, а решта введеної кількості 10S-47 буде знаходитись у зв'язаній з альбуміном крові формі. Загалом це відносно прийнятне значення, яке, однак, повинне бути враховане через потенціал до довгого виведення подібних молекул.

Як і більшість досліджених в роботі сполук, 10S-47 володіла потенціалом до прояву гепатотоксичності. Крім того, вона з помірною ймовірністю буде мати канцерогенний потенціал і з дещо більшою ймовірністю може впливати на геном загалом. Також слід зазначити, що 10S-47 може виявляти нефротоксичний ефект. Даний параметр важливо враховувати зважаючи на походження культури MDCK, використаної для дослідження цитотоксичності.

Визначення протигрипозного ефекту при внесенні сполуки відразу після інфікування клітин вірусом демонструвало чіткий вплив 10S-47 на репродукцію IAV. Пік активності сполуки спостерігався за концентрації 5 мкг/мл і становив $76,31 \pm 3,05\%$ (рис. 4.21). Зниження активності відбувалося за концентрацій нижче 1 мг/мл. Таким чином, розраховане значення EC_{50} становило $0,77 \pm 0,039$ мкг/мл. Враховуючи результати дослідження цитотоксичності, SI для сполуки 10S-47 дорівнювало $612,15 \pm 27,55$, що є гарним результатом для речовини-кандидата.

Зважаючи на високий протигрипозний потенціал сполуки 10S-47, розрахунковими методами було визначено можливий механізм її дії, а як мішень було обрано CBD субодиниці PB2 вірусної полімерази. Оскільки 10S-47 містить сумарно 2 стереоцентри – по одному у положенні 2 кожного ТНР – для неї було згенеровано 3 просторові форми. Їх розрахована афінність після докування у активний центр CBD PB2 знаходилася в межах від $-8,44$ ккал/моль до $-10,01$ ккал/моль (таблиця 4.6).

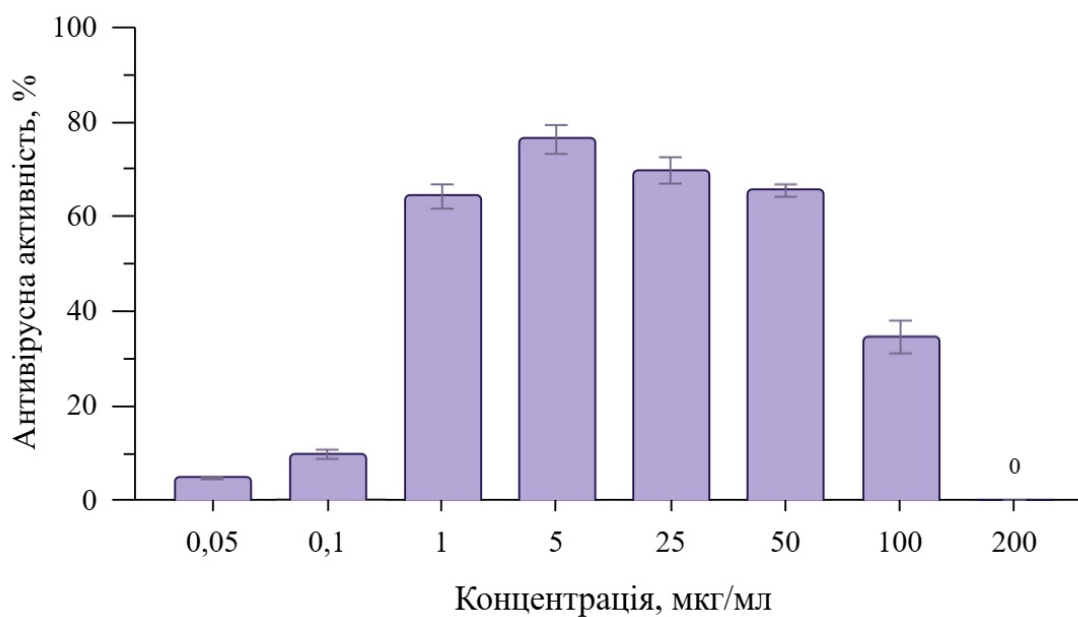


Рисунок 4.21 Вплив флуоровмісної сполуки на основі тетрагідропіран-2-тріазолу на репродукцію вірусу грипу типу А у культурі клітин MDCK за пост-експозиційної схеми внесення. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Таблиця 4.6 Stereoізомери 10S-47 та їх афінність до активного центру CBD RdRp (напівгнучкий молекулярний докінг)

| | | | |
|----------------------|--------|--------|--------|
| Структурна формула | | | |
| Афінність, ккал/моль | -8,448 | -9,461 | -10,01 |

Під час симуляції молекулярної динаміки 10S-47 хоч і стабільно знаходилася у межах активного центру, проте зазнавала достатньо значних конформаційних перебудов. Однак вони стосувались майже повністю лише одного з двох залишків фторованого 2-(тетрагідро-2-іл)тріазолу, який безпосередньо взаємодівав з явним розчинником. Інший залишок, як власне і сульфонільна група, прямо взаємодівав з амінокислотами F323, R355, N357, F363, F404, Q406 та M431 шляхом стекінгових та гідروفобних взаємодій (рис. 4.22, А). Орієнтаційні взаємодії, типу водневого та іонного зв'язків, між лігандом та рецептором не спостерігались в межах даного симуляційного експерименту.

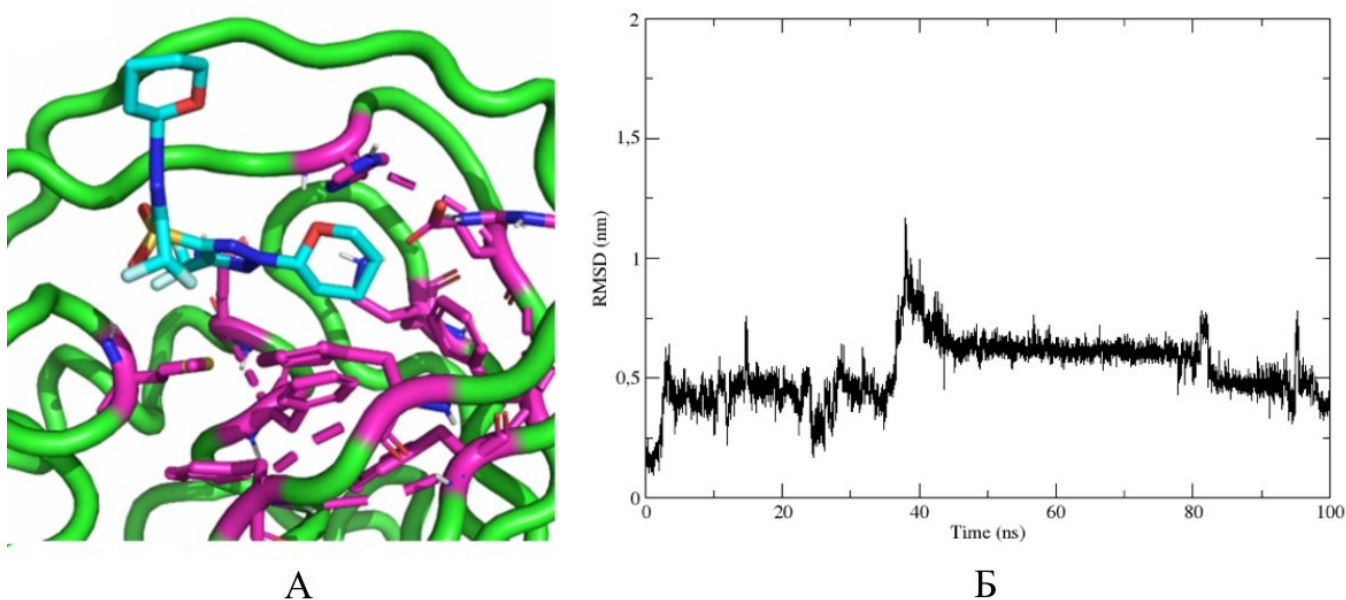


Рисунок 4.22 Спорідненість флуоровмісної сполуки 10S-47 до CBD субодиниці PB2 RdRp вірусу грипу типу А: А – комплекс 10S-47 з кеп-зв'язуючою ділянкою PB2 під час симуляції молекулярної динаміки; Б – графік залежності середньоквадратичного відхилення ліганду від часу симуляції

Конформаційні перебудови молекули відображені у її середньоквадратичному відхиленні (рис. 4.22, Б). За значними абераціями можна відрізнити період перебудов на 1-3 нс, 4-35 нс, 36-81 нс та 82-100 нс. Водночас найбільше RMSD

спостерігається в період між другою і третьою конформаційними формами, і в подальшому поступово знижується до значення в 4 Å в кінці симуляції.

Таким чином, досліджений біс(5-дифлуорометил-2-(тетрагідропіран-2-іл)-2Н-1,2,3-тріазол-4-іл)-сульфон проявляє виражений дозозалежний вплив на життєздатність клітин MDCK. Водночас, дана сполука має оптимальні фізико-хімічні характеристики та прогнозовані параметри Медичної хімії. Загалом її прогнозовані параметри ADMET можна вважати прийнятними, за винятком потенціалу до прояву гепатотоксичності, нефротоксичності та канцерогенного ефекту.

Сполука також продемонструвала значний протигрипозний ефект з максимумом >76% активності. Її потенціал підтверджується високим значенням SI. Проте, зважаючи на результати симуляції молекулярної динаміки з CBD субодиноці PB2, молекула 10S-47 зі складною структурою має механізм дії, ймовірно, не пов'язаний з взаємодією з RdRp та відмінний від решти досліджених органічних сполук [186-188].

4.2 Оцінка потенціалу кандидатів у противірусні агенти з класу наноструктур

4.2.1 Дослідження суміші полігідратованих фулеренів

Полігідратовані фулерени або фулереноли є наноструктурами вуглецю – фулеренами, поверхня яких модифікована гідроксильними групами з загальною формулою $C_n(OH)_n$. В даній роботі був досліджений водний колоїдний розчин суміші класичних та вищих фулеренолів $C_n(OH)_{40}$, з наступним масовим співвідношенням компонентів: C_{60} – 62,75%, C_{70} – 23,56%, C_{76-86} – 10,65% та $C_{>86}$ – 3,03%. Таким чином, більшість фулеренолів в суміші (>86%) є класичними C_{60} та C_{70} .

Результати дослідження цитотоксичності на культурі клітин MDCK вказують на наявність у суміші фулеренолів дозозалежного токсичного ефекту (рис. 4.23).

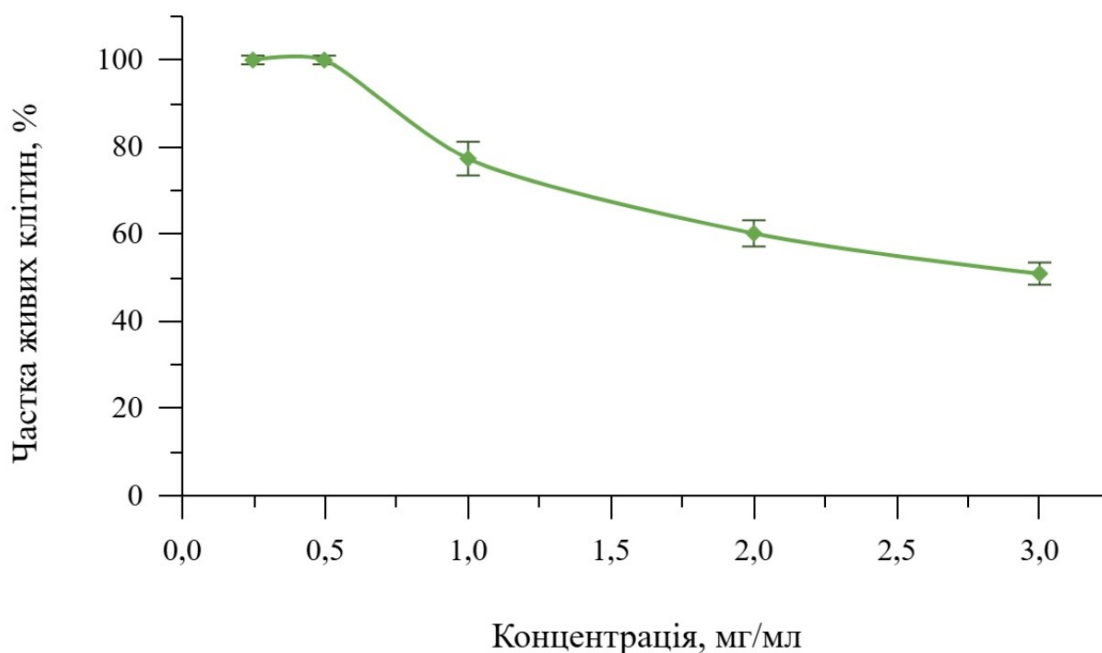


Рисунок 4.23 Вплив суміші фулеренолів на життєздатність культури клітин MDCK. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Водночас, у найбільшій досліджуваній концентрації 3 мг/мл частка живих клітин становила $50,96 \pm 2,54\%$, а за 0,5 мг/мл досягла 100%. Вплив фулеренолів на високих концентраціях переважно був обумовлений втратою міжклітинних контактів та округленням клітин (рис. 4.24). Дані візуальні зміни не спостерігалися починаючи з концентрації 1 мг/мл та менше.

Таким чином, можна стверджувати, що досліджувані фулереноли малотоксичні для культури клітин MDCK. На основі отриманих результатів, було також розраховано показник CC_{50} , який становив $3,10 \pm 0,15$ мг/мл.

Суміш полідратованих фулеренів була досліджена за різними схемами антивірусної активності, що передбачало внесення препарату до інфікування клітин, одночасно з вірусом та у різний час після встановлення інфекції.

Профілактична схема застосування препарату передбачає контакт клітин протягом 24 год з активною речовиною, їх промивку та подальше інфікування

вірусом. Це дозволяє перевірити, чи здатна речовина до активації захисних систем клітини.

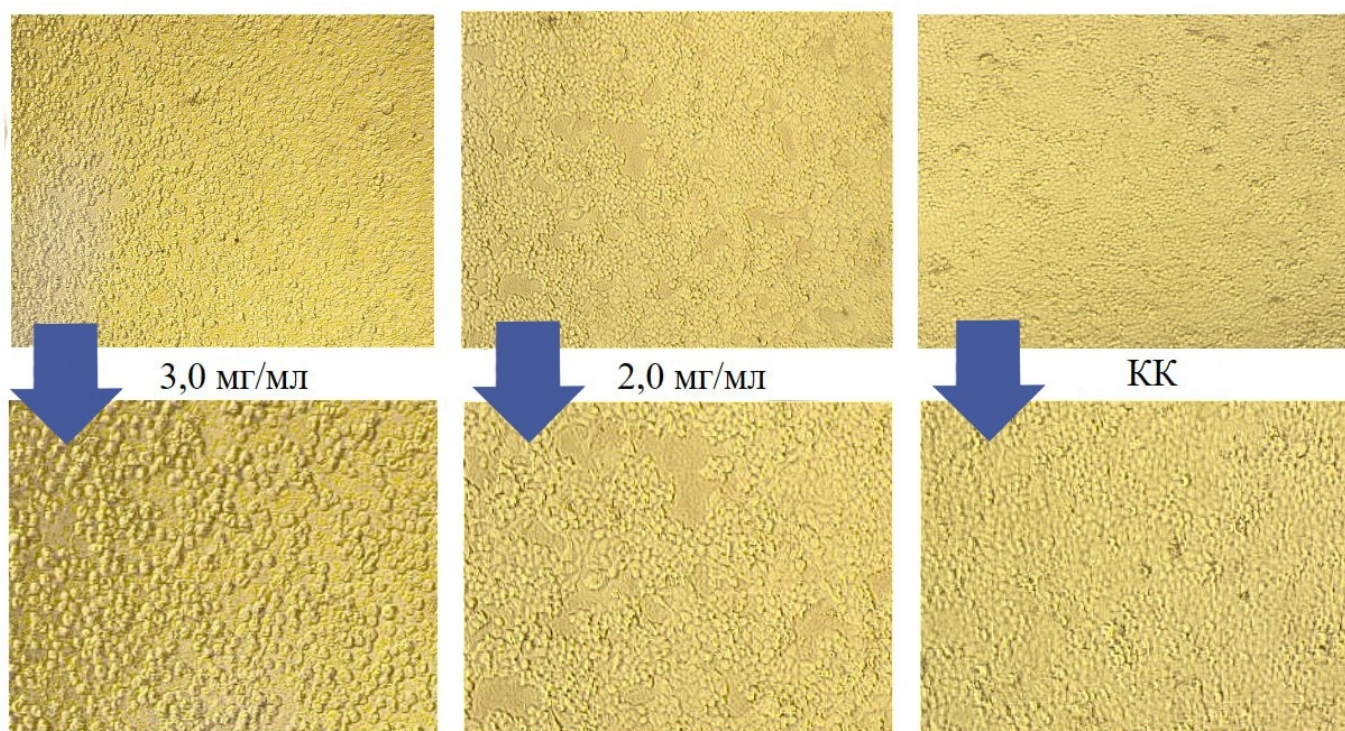


Рисунок 4.24 Мікрофотографії культури клітин MDCK після інкубування з високими концентраціями розчину фулеренолів протягом 48 год (збільшення x100). КК – контроль клітин без фулеренолів у поживному середовищі

За 24 год інкубації з клітинами до інфекції грипом полігідратовані фулерени не проявили активності щодо пригнічення репродукції вірусу. Як видно з рисунку 4.25.А, у діапазоні концентрацій від 50 до 1500 мкг/мл інгібування ІАВ не відбувалося.

Підрахунок інфекційного титру вірусу після дослідження профілактичної активності також підтверджував відсутність вираженого ефекту (рис. 4.25, Б). Результати демонстрували незначне зменшення значення значення TCD_{50} в середньому на 0,9 порядку, порівняно з контролем вірусу (КВ, $lg TCD_{50}/мл = 7,52 \pm 0,47$).

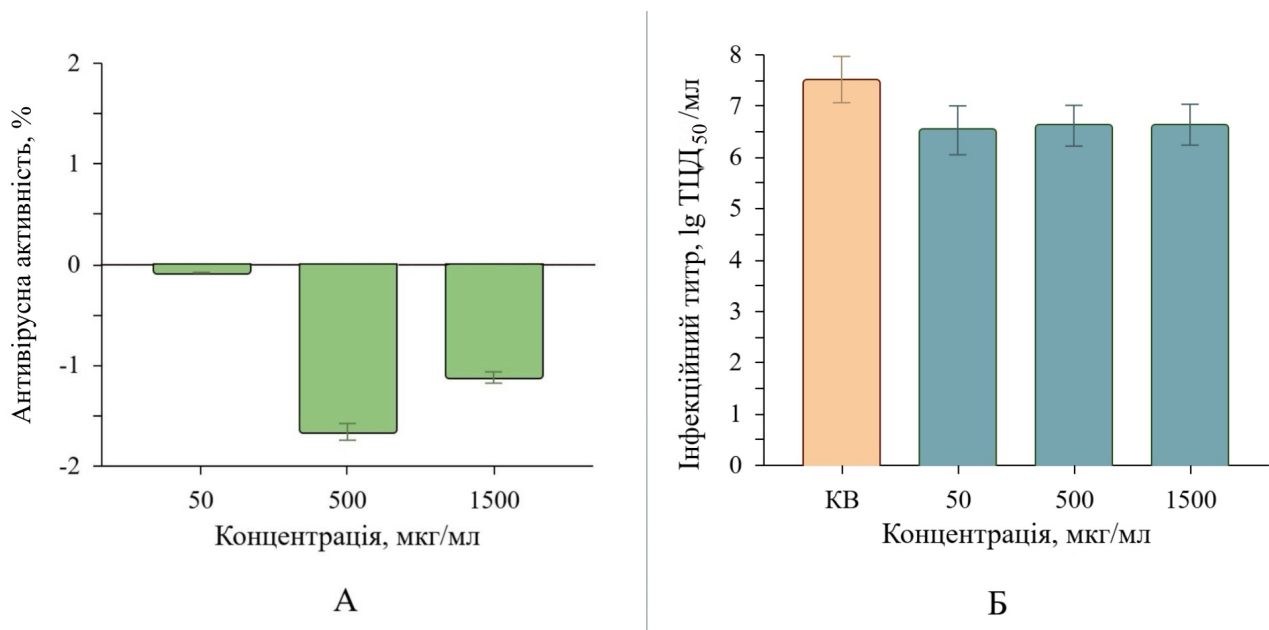


Рисунок 4.25 Вплив фулеренолів на репродукцію вірусу грипу типу А в культурі клітин MDCK за профілактичної схеми внесення. А – пригнічення вірусної репродукції; Б – інфекційні титри (ТЦД₅₀/мл) нового покоління вірусу. Дані представлені як середнє значення ± SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Наступна схема дослідження передбачала внесення препарату у різних часових точках циклу репродукції ІАВ: 0 год – додавання фулеренолів одночасно з вірусом; через 1 год після інфікування (в.п.і.); через 5 год в.п.і. та 25 год в.п.і. (терапевтичний ефект). Результати дослідження демонстрували виражену антивірусну активність на усіх часових точках, особливо за концентрацій ≥ 500 мкг/мл (рис. 4.26).

Внесення полігідратованих фулеренів у культуру клітин одночасно з вірусом (0 год) показало наявність вираженого протигрипозного ефекту. При використанні діапазону концентрацій від 100 до 1400 мг/мл відсоток антивірусної активності становив від 74 до 87% без збереження дозозалежності. А за найменшої досліджуваної концентрації 10 мкг/мл препарат проявив активність у $27,86 \pm 1,22\%$.

При додаванні фулеренолів безпосередньо після зараження культури клітин (1 год в.п.і., або ж за пост-експозиційною схемою) спостерігався дозозалежний ефект. Найвище значення антивірусної активності становило $90,58 \pm 1,73\%$ при 1400 мкг/мл, далі зі зниженням концентрації поступово зменшувалася активність і при 10 мкг/мл становила близько 5%.

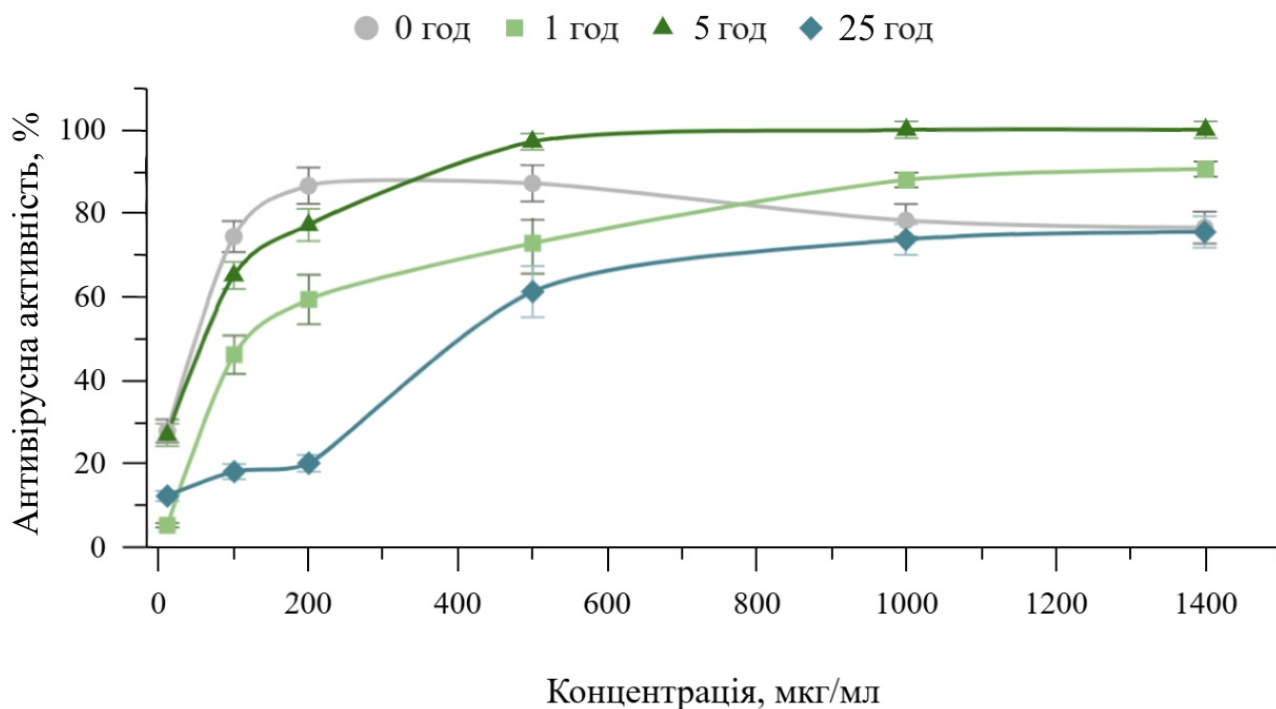


Рисунок 4.26 Вплив фулеренолів на репродукцію вірусу грипу типу А в культурі клітин MDCK за умови внесення в різний час від моменту встановлення інфекції. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Через п'ять годин від моменту початку інфекції полігідратовані фулерени ефективно проявили протигрипозний ефект. При додаванні 1000 та 1400 мг/мл спостерігали 100% антивірусної активності. Висока активність також спостерігалась і зі зниженням концентрації фулеренолів, і навіть за найменшого розведення становила $>26\%$.

Через 25 год після встановлення вірусної інфекції терапевтичний ефект фулеренолів був порівняно менш виражений, проте достатньо високий. Найвища активність у $75,59 \pm 2,26\%$ спостерігалась при 1400 мкг/мл, а $<50\%$ ефекту фулереноли демонстрували за концентрацій нижче 200 мкг/мл. У діапазоні від 10 до 100 мкг/мл активність коливалась у межах 12-18%.

Обчислені значення інфекційного титру вірусу, синтезованого у присутності різної концентрації фулеренолів, доданих у вищезазначені часові точки, демонструють неповну кореляцію з показниками пригнічення вірусної активності (рис. 4.27). Хоча при внесенні препарату одночасно з IAV (0 год) високий відсоток антивірусної активності спостерігався у діапазоні концентрацій від 100 до 1400 мкг/мл, повне пригнічення інфекційного титру було лише при >500 мкг/мл. Далі зі зменшенням використаної концентрації збільшувалось значення ТЦД₅₀/мл. Водночас, за концентрацій 100 та 200 мкг/мл різниця з КВ була значною і становила 5,3 та 6,3 lg, відповідно. При використанні 10 мкг/мл інфекційний титр новосинтезованого вірусу залишався нижчим за КВ, проте лише на 0,76 порядку.

Визначення інфекційних титрів після дослідження антивірусної активності за умови внесення препарату фулеренолів через 1 год в.п.і. демонструвало зниження титру до 10 порядків залежно від використаної концентрації (рис. 4.27). Інфекційний вірус не ідентифікувався у діапазоні від 500 мкг/мл до 1400 мкг/мл. При використанні 200 мкг/мл різниця значень ТЦД₅₀/мл з КВ також була значною і становила 5,21 порядку. За концентрації 100 мкг/мл вірусний титр знижувався достатньо для підтвердження наявності ефекту, а саме на близько 2,5 lg. І за найнижчої концентрації як такий вплив на новосинтезований вірус був відсутнім.

За умови додавання препарату після 5 год в.п.і. повне пригнічення інфекційності новосинтезованого вірусу спостерігали за концентрацій 500 - 1400 мкг/мл, де інгібування вірусної репродукції становило близько 100%. Подальше зменшення концентрації фулеренолів відобразилося на значенні ТЦД₅₀/мл. Проте за концентрацій 200, 100 та 10 мкг/мл зниження інфекційного титру у порівнянні із КВ

(lg ТЦД₅₀/мл = 12,29±0,83) також залишалось значним, і становило 8,2, 4,5 та 3 порядки, відповідно.

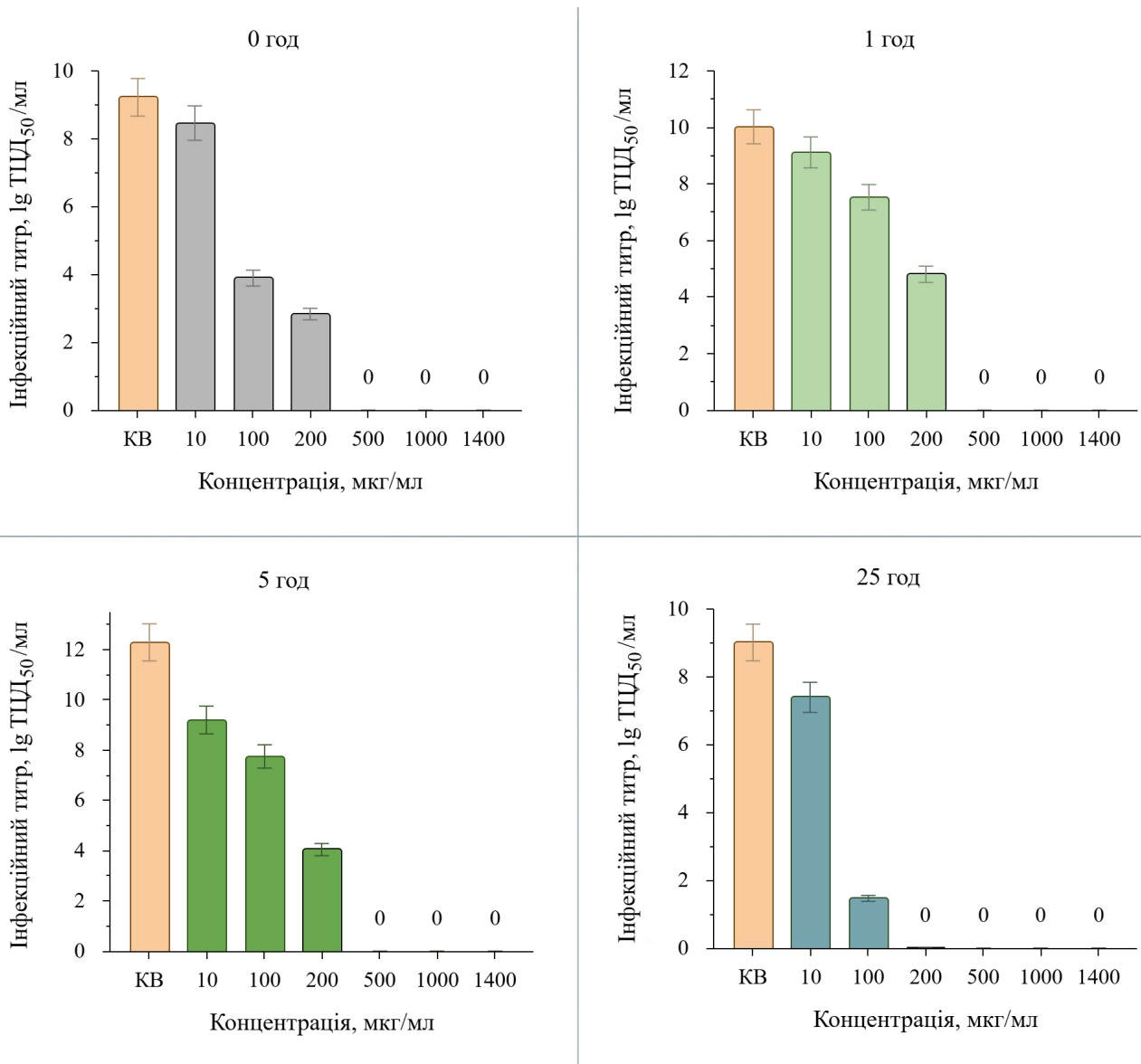


Рисунок 4.27 Інфекційні титри (ТЦД₅₀/мл) вірусу грипу типу А, що реплікувався у культурі MDCK у присутності суміші полігідратованих фулеренів, доданої у різний час від моменту інфікування клітин. Дані представлені як середнє значення ± SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Визначення інфекційних титрів після додавання фулеренолів за схемою 25 год в.п.і. показало повне пригнічення новосинтезованого вірусу за концентрацій 200 -

1400 мкг/мл (рис. 4.27). Незважаючи на антивірусну активність у 20-75%, ТЦД₅₀/мл для даного діапазону дорівнює 0. За використаних концентрацій 100 та 10 мкг/мл спостерігається зниження інфекційного титру відносно контролю ($\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл} = 9,01 \pm 0,62$) на 7,5 та 1,6 порядків, відповідно.

Для протівірусної активності кожної часової точки були розраховані значення ЕС₅₀ (таблиця 4.7). При порівнянні значень можна відмітити, що найбільш ефективними у пригніченні репродукції вірусу є внесення фулеренолів одночасно з вірусом (0 год) та через 5 год від початку інфекції. Відповідно, SI для цих схем додавання препарату є найвищими (>42).

Найменш ефективним з точки зору оцінки SI серед досліджуваних схем виявилось внесення фулеренолів через 25 год від початку інфекції. А введення препарату до клітин через 1 год в.п.і. показало відносно високий результат, проте не найкращий, порівняно з іншими часовими точками.

Таблиця 4.7 Індeksi ЕС₅₀ та SI суміші полігідратованих фулеренів залежно від моменту внесення препарату у інфіковану вірусом культуру клітин

| Час в.п.і. | 0 год | 1 год | 5 год | 25 год |
|---------------------------|------------|-------------|------------|--------------|
| ЕС ₅₀ , мкг/мл | 66,02±2,97 | 145,02±6,53 | 72,52±3,26 | 407,12±18,32 |
| SI | 46,96±2,11 | 21,38±0,96 | 42,75±1,92 | 7,61±0,34 |

Зважаючи на те, що більшість наноструктур проявляють виражений ефект саме на позаклітинний вірус, для суміші полігідратованих фулеренів було також проведено дослідження їх віруліцидного потенціалу. Для цього різні концентрації препарату інкубували протягом 15, 30 і 60 хв з вірусом грипу типу А та визначали інфекційні титри IAV у культурі клітин MDCK. Результати дослідження вказують на те, що препарат має вплив на позаклітинний вірус. За концентрацій 1000 та 2000 мкг/мл відбулася повна інактивація вірусу незалежно від тривалості контакту (рис. 4.28). Також, при використанні 500 мкг/мл за 60 хв інкубації суміші фулеренолів з

вірусом спостерігали повну втрату інфекційності останнім.

Загалом, зі зниженням концентрації відбувалося зменшення віруліцидного впливу фулеренолів на IAV. Різниця інфекційних титрів з KB на >2 порядки спостерігалася при використанні концентрацій 200 мкг/мл і більше при інкубуванні протягом 30 і 60 хв, та ≥ 500 мкг/мл при контакті протягом 15 хв. Таким чином, чітко прослідковується залежність віруліцидного ефекту суміші полігідратованих фулеренів від їх кількості та часу контакту з вірусом поза клітиною.

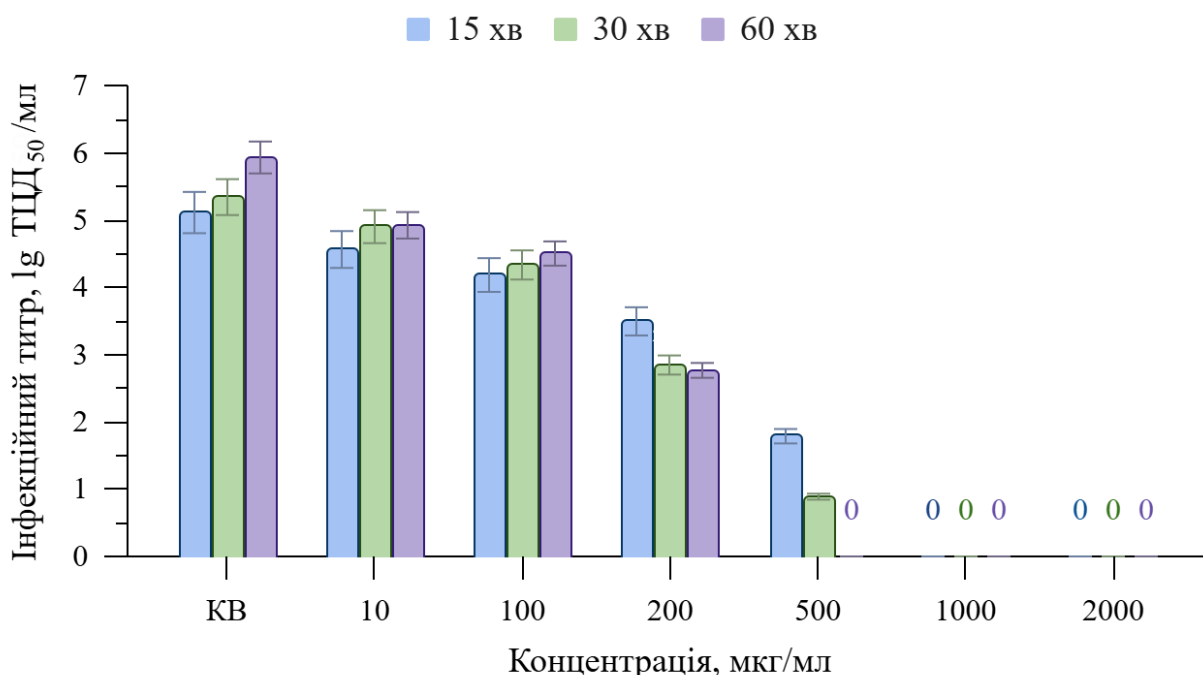


Рисунок 4.28 Інфекційні титри ($TCID_{50}/мл$) вірусу грипу типу А після контакту з різними концентраціями суміші полігідратованих фулеренів протягом 15, 30 та 60 хв. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Зважаючи на проявлену протигрипозну активність суміші фулеренолів та існуючі літературні дані, було зроблено припущення про їх можливий механізм дії. Внутрішньоклітинний вплив препарату може бути пов'язаний із взаємодією з

вірусним полімеразним комплексом. Для оцінки подібної взаємодії було проведено докінг та симуляцію молекулярної динаміки полігідратованого C_{60} з RdRp як типу фулеренолу, що переважає в суміші.

За даними молекулярного докінгу фулеренол C_{60} частково перекривав ділянку взаємодії праймерної РНК. Фулеренол був безпосередньо оточений амінокислотами, що беруть участь у взаємодії петлі 5'-промотору РНК з RdRp: R279, K281, Y393, S395, D396, P398, V517, R566, N568, G569, T570, S571, K574, A651, S652, P653 та N696 субодиниці PA; D27, Y30, H32, та R238 субодиниці PB1 (рис. 4.29).

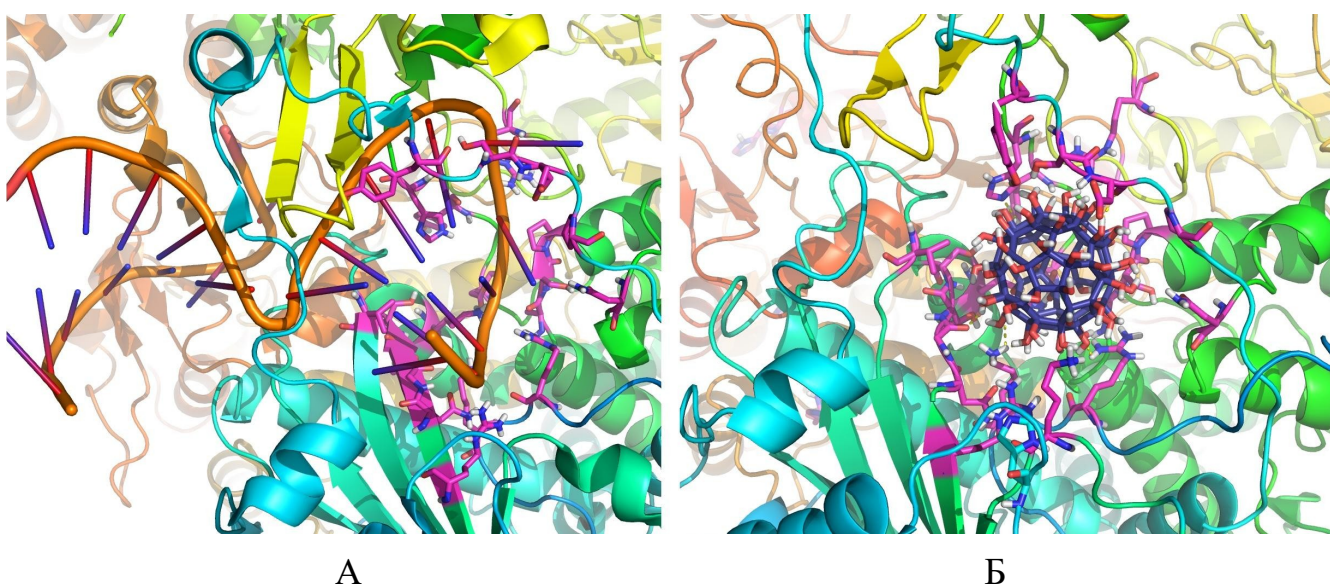


Рисунок 4.29 RdRp вірусу грипу типу А у комплексі із праймерною РНК (А) та фулеренолом C_{60} (Б). Рожевим кольором виділені амінокислоти, які безпосередньо оточують фулеренол у процесі його взаємодії з RdRp.

Молекулярна динаміка фулеренолу C_{60} у комплексі з RdRp була відносно однорідною і характеризувалася стабільним збереженням положення ліганду протягом всього періоду моделювання. Середньоквадратичне відхилення за перші 20 нс симуляції стабілізувалось в значенні ~ 3 Å і зберігалось таким до кінця, за винятком незначних перепадів (рис. 4.30). Розмах коливань становив близько 1 Å,

що, разом із константним збереженням загального рівня RMSD, може свідчити на користь достатньої стабільності досліджуваного ліганду в комплексі із RdRp.

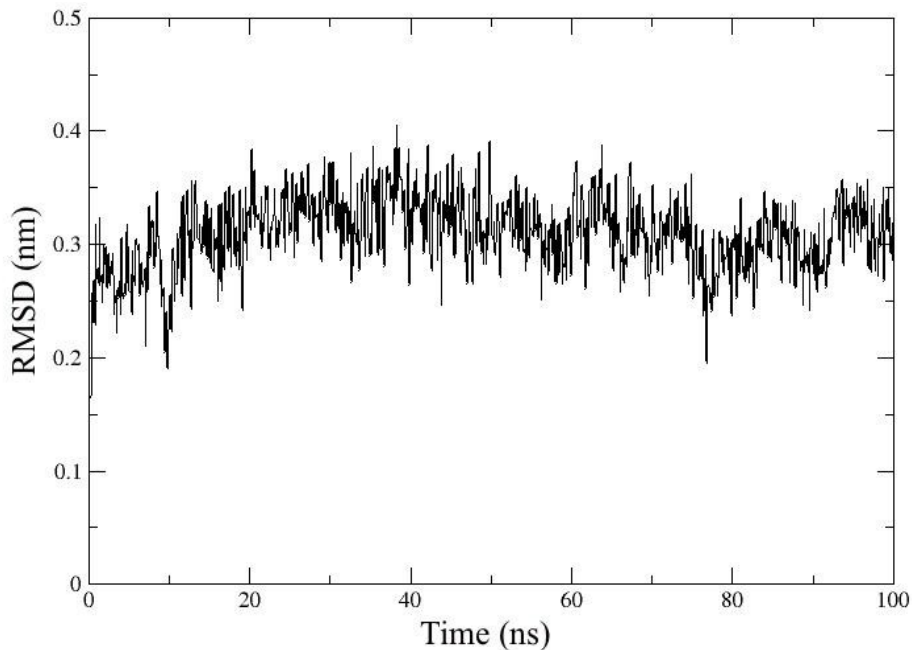


Рисунок 4.30 Середньоквадратичне відхилення фулеренулу C_{60} у комплексі з ділянкою взаємодії RdRp з праймерною РНК

Серед основних орієнтуючих взаємодій слід виділити водневі зв'язки фулеренулу C_{60} з аміногрупою K281 та карбонілом G569, які входять до складу РА, що спостерігались протягом всієї симуляції. В окремі періоди моделювання були наявними і додаткові водневі зв'язки, проте загалом кількість водневих зв'язків між лігандом та рецептором коливалась в межах 2-3. Розраховане значення вільної енергії зв'язування дорівнювало $-73,7$ ккал/моль, що свідчить про потенційно високий енергетичний вигравш системи у випадку успішного формування комплексу.

Враховуючи виражену віруліцидну дію суміші фулеренолів, а також вплив на інфекційні титри вірусу, синтезованого в їх присутності, було також зроблено припущення про можливий механізм дії на позаклітинний вірус. Одним із пояснень

є безпосередній вплив фулеренолів на ліпідну мембрану віріону IAV H1N1. На основі цього припущення було побудовано молекулярну систему, яка містила ліпідний бішар, подібний за складом до мембрани віріону H1N1, віддалений від нього фулеренол C_{60} та розчинник з фізіологічною іонною силою (рис. 4.31, А).

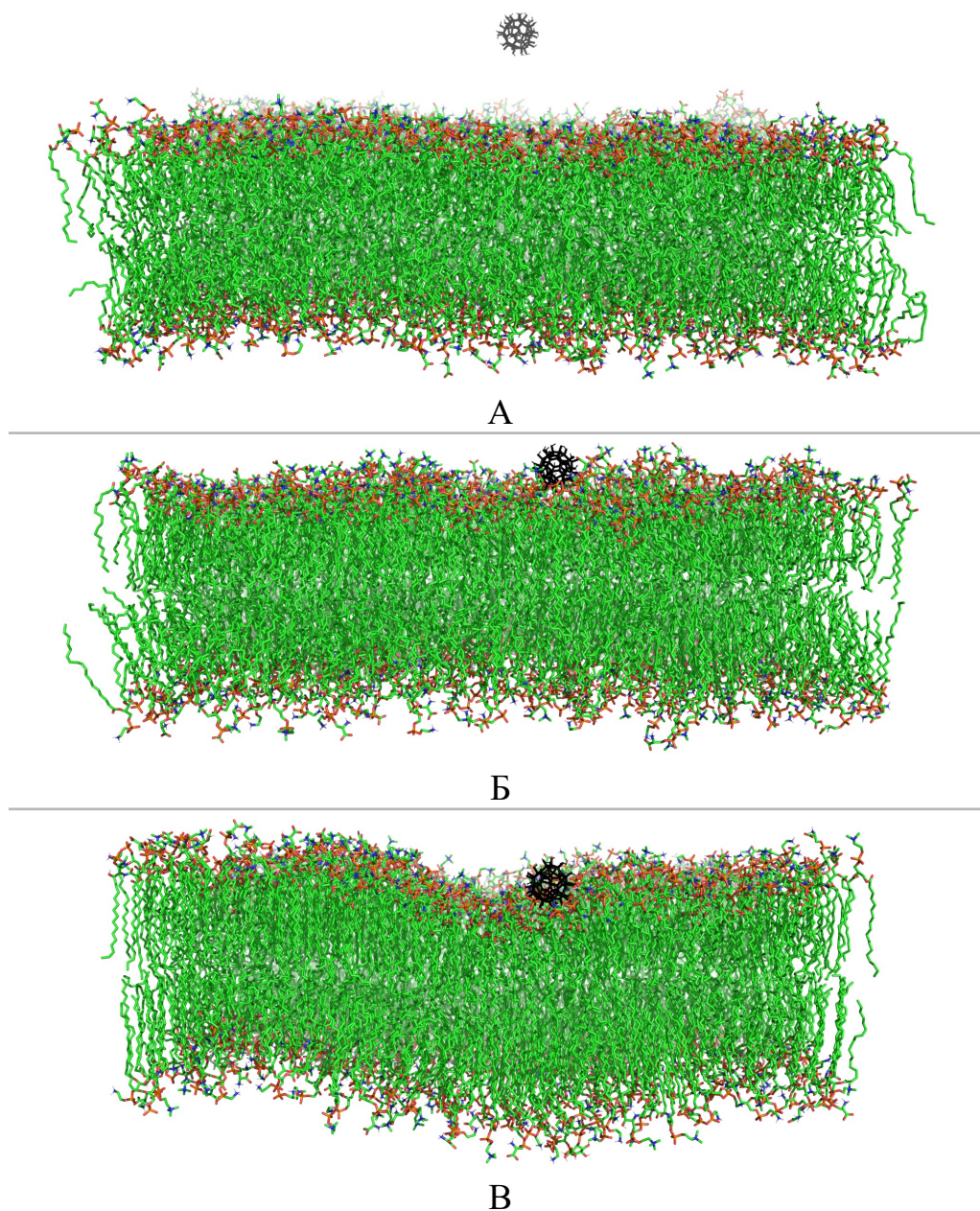


Рисунок 4.31 Взаємодія фулеренолу C_{60} з фрагментом ліпідної мембрани віріону IAV H1N1 під час симуляції молекулярної динаміки. А – 0 нс, Б – 14 нс, В – 180 нс симуляції

Вже на самому початку симуляційного експерименту спостерігалась чітка тенденція до зміщення фулеренулу у напрямку ліпідного бішару, що призвело до встановлення його стабільної взаємодії з вірусною мембраною на 14 нс (рис. 4.31, Б). Після періоду пертурбацій протягом 115 нс система повністю стабілізувалась. За близького до рівноважного стану фулеренол C_{60} характеризувався чіткою локалізацією на поверхні ліпідного бішару, а останній, як лабільна багатокомпонентна система, сформував заглибину навколо нього (рис. 4.31, В).

Основними силами, які забезпечували стабільність взаємодії були електростатичні, що проявлялись у формі водневих зв'язків. Як можна спостерігати на рисунку 4.32, в період активного пристосування компонентів системи один до одного в першій частині симуляції їх кількість коливалась від 3-17, однак в період конформаційної стабільності кількість цих орієнтуючих взаємодій між фулеренолом і поверхнею мембрани була відносно стабільною і коливалась в межах 10-15.

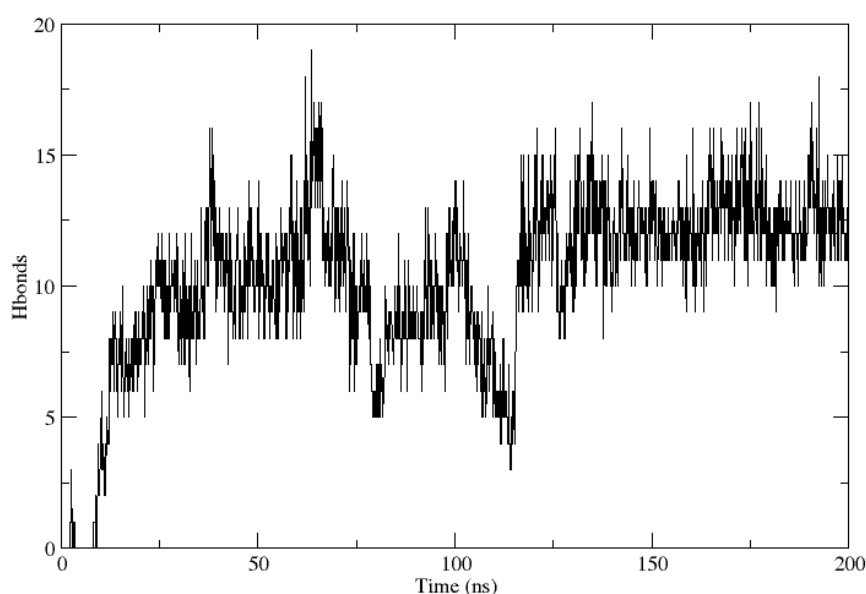


Рисунок 4.32 Зміна кількості водневих зв'язків між фулеренолом C_{60} та фрагментом ліпідної мембрани віріону IAV H1N1 під час симуляції молекулярної динаміки

Підтвердженням фундаментальності внеску водневих зв'язків у формування комплексу фулеренол/мембрана в такому вигляді як було описано вище, є також і внесок цих сил у загальну ентальпію системи, що становить $-146,87 \pm 35,64$ ккал/моль при власне $\Delta H = -159,87 \pm 30,43$ ккал/моль.

Отримані дані свідчать на користь того, що можливим механізмом прояву антивірусної активності фулеренолу C_{60} є безпосередній вплив на вірусну мембрану. Водночас, основний внесок у цей процес роблять водневі зв'язки між гідроксильними групами ліганду і полярними голівками мембранних ліпідів.

Таким чином, досліджувана суміш полігідратованих фулеренів з переважанням класичних C_{60} та C_{70} є малотоксичною для культури клітин MDCK, проте за високих концентрацій викликає зміну морфології клітин. Щодо противірусного потенціалу суміші фулеренолів, було визначено, що вона не впливає на активацію захисних систем клітини, проте демонструє високу активність у пригніченні репродукції IAV H1N1 в інфікованій культурі. Щодо противірусного потенціалу суміші фулеренолів, було визначено, що вона не впливає на активацію захисних систем клітини, проте демонструє високу активність у пригніченні репродукції IAV H1N1 в інфікованій культурі. Водночас, як для більшості вже досліджених протигрипозних препаратів, ефективність фулеренолів залежить від часу застосування: чим раніше з моменту інфікування вірусом, тим кращий ефект інгібування. Можливим механізмом дії полігідратованих фулеренів на процес репродукції вірусу може бути блокування ділянки на вірусному полімеразному комплексі, що бере участь у взаємодії петлі 5'-промотору РНК з RdRp [189, 190].

Було також визначено високий потенціал фулеренолів до взаємодії з позаклітинним IAV H1N1 як комплексний вплив на інфекцію, так і окремо в ролі віруліцидного агента. Відкритий ефект може бути забезпечений шляхом прямої взаємодії наноструктур з ліпідною мембраною віріонів IAV через утворення водневих зв'язків між гідроксильними групами фулеренолів і голівками мембранних ліпідів. Це, в свою чергу, може впливати на поверхневі структури вірусу і, відповідно, на опосередковані ними процеси. На користь можливої взаємодії препарату з ліпідним бішаром також свідчить зміна морфології клітин під

впливом високих концентрацій фулеренолів [191, 192].

4.2.1.1 Активність суміші полігідратованих фулеренів на клінічні штами вірусів грипу

Антивірусна ефективність суміші фулеренолів також була перевірена на клінічних штамів вірусу грипу, окрім лабораторного IAV H1N1. Клінічні штами були отримані з Київського міського центру контролю та профілактики хвороб. Зразки були взяті у осінньо-зимовий сезон 2023-2024 років. Віруси, представлені IAV H1N1 pdm09 та вірусом грипу типу В (IBV) лінії Вікторія, були виділені з носоглоткових змивів пацієнтів з діагнозом тяжке гостре респіраторне захворювання.

Антивірусна активність була оцінена шляхом внесення препарату через 1 год від початку інфекції з послідовним визначенням інфекційних титрів новосинтезованого вірусу. Загальна картина активності відносно клінічних штамів була схожа до такої відносно лабораторного IAV H1N1 (рис. 4.33).

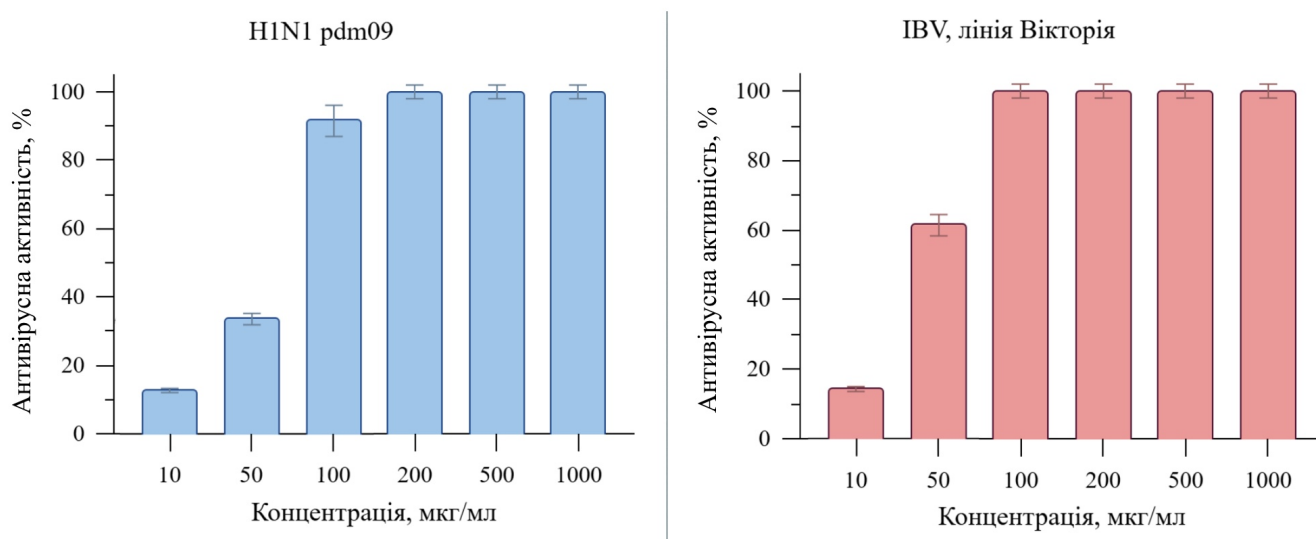


Рисунок 4.33 Вплив суміші полігідратованих фулеренів на репродукцію клінічних штамів вірусу грипу в культурі клітин MDCK. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Повне пригнічення вірусної репродукції (100% антивірусної активності) у культурі MDCK спостерігали в діапазоні концентрацій 200-1000 мкг/мл для H1N1 pdm09 та 100-1000 мкг/мл для IBV. Хоча варто зазначити, що при 100 мкг/мл відсоток активності H1N1 pdm09 становив $91,83 \pm 4,67\%$, а це також є високим результатом.

При використанні концентрацій фулеренолів ≤ 50 мкг/мл, ефект на вірус грипу типу В був більш вираженим: $61,59 \pm 1,77\%$ активності проти $33,70 \pm 2,30\%$ для H1N1 pdm09. Відповідно до цього, розраховані показники EC_{50} для IAV та IBV дещо відрізнялися (таблиця 4.8).

Таблиця 4.8 Індекси EC_{50} та SI суміші полігідратованих фулеренів залежно від виду та штаму вірусу грипу

| Час в.п.і. | IAV H1N1 pdm09 | IBV лінія Вікторія | IAV H1N1 |
|--------------------|------------------|--------------------|-------------------|
| EC_{50} , мкг/мл | $57,54 \pm 2,29$ | $44,35 \pm 1,77$ | $145,02 \pm 6,53$ |
| SI | $53,88 \pm 2,42$ | $69,90 \pm 3,15$ | $21,38 \pm 0,96$ |

Загалом, за результатами розрахунку індексів селективності за умови застосування препарату через 1 год в.п.і., найкращий потенціал суміш полігідратованих фулеренів проявля відносно клінічних штамів вірусу грипу, а саме відносно вірусу грипу типу В.

Результати визначення інфекційних титрів клінічних штамів вірусу після застосування суміші фулеренолів корелюють з попередньо описаними даними. Як і для лабораторного IAV H1N1, в даному випадку інфекційний вірус не ідентифікувався за концентрацій 500 та 1000 мкг/мл (рис. 4.34). Також більш виражена активність препарату відносно IBV проявилася у значеннях $TCD_{50}/мл$. При використанні 200 мкг/мл фулеренолів різниця інфекційних титрів порівняно з контролем становила $3,43 \pm 0,14$ порядку для H1N1 pdm09 та $4,71 \pm 0,19$ порядку для

IBV Вікторія. За концентрацій ≤ 100 мкг/мл значного зниження ТЦД₅₀/мл не спостерігалось.

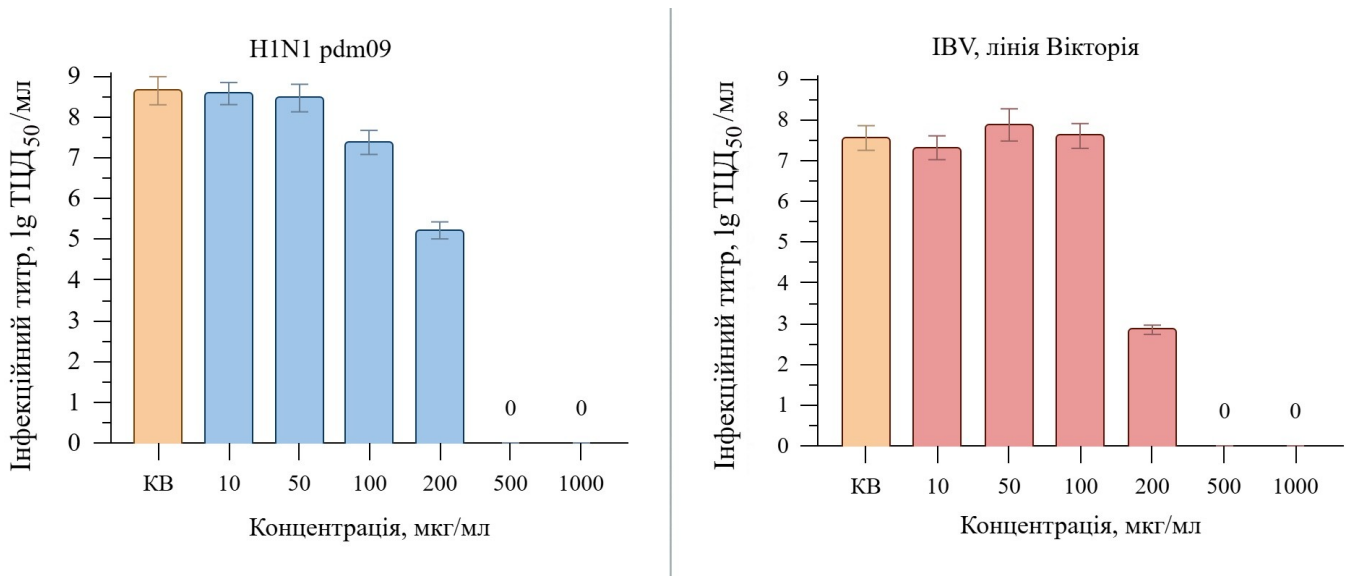


Рисунок 4.34 Інфекційні титри (ТЦД₅₀/мл) клінічних штамів вірусу грипу, які реплікувалися в культурі MDCK у присутності суміші полігідратованих фулеренів. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Таким чином, суміш полігідратованих фулеренів проявляє високу антивірусну активність не тільки відносно лабораторного IAV H1N1, а і відносно клінічних IAV H1N1 pdm09 та IBV лінія Вікторія. Водночас, вплив на репродукцію клінічних вірусів у культурі клітин є вищим, порівняно з IAV H1N1. Крім того, препарат фулеренолів за умови внесення в культуру через 1 год в.п.і. є найбільш ефективним саме проти вірусу грипу типу В лінії Вікторія.

4.2.1.2 Визначення гострої токсичності суміші полігідратованих фулеренів *in vivo*

Безпечність препарату суміші фулеренолів була оцінена *in vivo* за моделлю гострої токсичності, тобто шляхом одноразового прийому. В процесі дослідження 3 групи мишей лінії BALB/c отримали перорально 1 дозу препарату в різних

концентраціях і 1 група як контрольна отримала відповідний об'єм води (рис. 4.35). Далі тварини перебували в стандартних умовах під спостереженням і на третю добу з кожної групи було взято по 3 миші для отримання зразків крові для гематологічного аналізу. Решта тварин перебували під спостереженням сумарно 21 добу і в кінці цього періоду також було проведено аналіз крові.

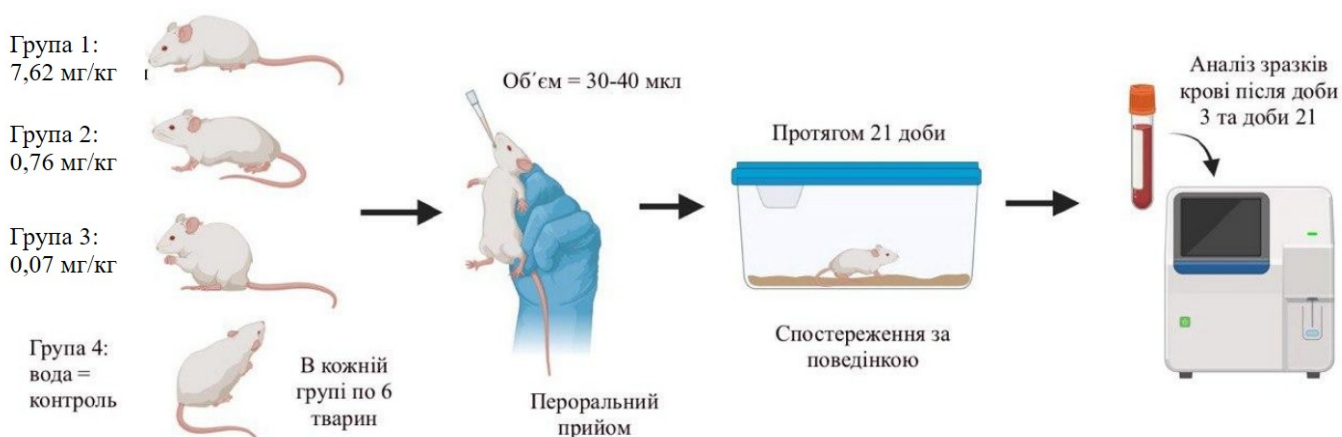


Рисунок 4.35 Загальна схема експерименту з визначення гострої токсичності суміші фулеренолів на моделі мишей BALB/c

Результати спостережень за тваринами вказують на те, що 1 доза суміші фулеренолів не викликає візуальних ознак гострої токсичності у мишей BALB/c. Одразу після перорального введення, на наступну добу та протягом усіх 21 діб тварини, що отримали суміш, поведилися так само, як контрольна група, не проявляючи при цьому жодних змін у поведінці.

Для комплексної оцінки стану організму тварин був проведений гематологічний аналіз зразків крові, який включав вивчення кількості та співвідношення формених елементів крові, гемоглобіну, гематокриту та тромбокриту. Повний перелік параметрів та результат дослідження винесений у додаток 5. У таблиці 4.9 зазначені показники, відхилення яких від контролю перевищує 10% (значення контролю приймали за 100%).

Таблиця 4.9 Відносні значення показників гематологічного аналізу крові зі значним відхиленням від контролю

| Показник | 3 доба | | | 21 доба | | |
|--|-------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 0,07 мг/кг | 0,76 мг/кг | 7,62 мг/кг | 0,07 мг/кг | 0,76 мг/кг | 7,62 мг/кг |
| | Значення відносно контролю, % | | | | | |
| Кількість лейкоцитів у крові | 101,72 | 67,82 | 81,61 | 42,16 | 35,29 | 51,96 |
| Кількість лімфоцитів у крові | 90,00 | 90,00 | 66,67 | 45,10 | 38,24 | 52,94 |
| Кількість середніх клітин у крові | 100,00 | 50,00 | 58,33 | 33,33 | 37,50 | 41,67 |
| Кількість гранулоцитів у крові | 110,00 | 57,78 | 97,78 | 38,10 | 28,57 | 50,00 |
| Відсотковий вміст лімфоцитів | 91,10 | 124,57 | 76,99 | 108,60 | 106,20 | 99,08 |
| Відсотковий вміст середніх клітин | 98,83 | 77,34 | 83,85 | 102,92 | 88,60 | 79,53 |
| Відсотковий вміст гранулоцитів | 106,71 | 88,03 | 120,64 | 87,57 | 95,11 | 107,41 |
| Кількість тромбоцитів | 76,39 | 69,40 | 88,77 | 104,33 | 109,18 | 115,73 |
| Ширина розподілу тромбоцитів по об'єму | 104,64 | 94,16 | 109,28 | 87,00 | 68,24 | 87,63 |
| Тромбокрит | 76,55 | 68,12 | 88,61 | 104,70 | 103,94 | 113,97 |

Найбільші зміни спостерігались серед показників кількості формених елементів крові. Кількість лейкоцитів знизилася залежно від дози препарату на 18,4-33,2% на 3 добу після введення і на 49-64,7 % на 21 добу. Кількість лімфоцитів на 3 добу значно зменшилася лише у групи тварин, що отримала 7,62 мг/кг (на 34,4%), проте на 21 добу у всіх груп (крім контрольної) фіксували зниження на 48,1-62,8% залежно від дози. Водночас відсотковий вміст лімфоцитів переважно був близьким до такого у контрольної групи за винятком показників 3 доби. Рівень середніх

клітин у крові (моноцити, еозинофіли, базофіли) також знизився залежно від дози препарату на 42,7-50% на 3 добу та на 59,4-67,7% станом на 21 добу, проте відсотковий вміст цих клітин зменшився лише на 16,2-23,7% на 3 добу та 11,4-21,5% на 21 добу. Зменшення кількості гранулоцитів на 3 добу спостерігали лише у групи тварин, що отримала 0,76 мг/кг суміші, водночас на 21 добу цей показник зменшився на 50-72,5% в усіх груп. При цьому, відсотковий вміст гранулоцитів знизився лише на 12-13% у групи 0,76 мг/кг на 3 добу та групи 0,07 мг/кг на 21 добу. Кількість тромбоцитів на 3 добу була знижена на 11,3-30,6% залежно від дози, проте на 21 добу була вище, ніж у контрольної групи на 4,3-15,7%, що також корелювало з показниками тромбокрити. Ширина розподілу тромбоцитів по об'єму або ж варіабельність їх розміру на 3 добу значно не відрізнялася від контролю, але на 21 добу була знижена на 12,4-31,8%.

Параметри еритроцитів, такі як середній вміст гемоглобіну, середній об'єм та варіабельність розміру, для тварин, які отримали суміш фулеренолів, були близькі до таких контрольної групи, за винятком показників 21 доби групи, якій було введено 0,07 мг/кг (додаток 5).

Для решти компонентів гематологічного аналізу (середня концентрація гемоглобіну в еритроциті, гематокрит та середній об'єм тромбоцита) відхилень від контрольної групи на >10% не спостерігались.

Підсумовуючи отримані дані дослідження токсичності полігідратованих фулеренів на мишах BALB/c, можна стверджувати, що одноразове пероральне введення препарату не викликає гострої реакції у тварин та не впливає на їх поведінку [193]. Гематологічний аналіз крові демонструє відхилення у кількості формених елементів крові, проте їх відсотковий вміст близький до контрольної групи.

4.2.2 Дослідження наночастинок срібла різного діаметру

Наступну групу наноструктур з протигрипозним потенціалом представляють наночастишки срібла. До неї входять три суміші НЧ: Ag10 – суміш НЧ діаметром від

5 до 30 нм, більшість 8-10 нм; Ag20 – суміш НЧ діаметром від 5 до 40 нм, більшість 10-20 нм; та Ag50 – суміш НЧ діаметром від 5 до 100 нм, більшість 40-50 нм. Усі наночастинки були отримані за допомогою синтезу, опосередкованого амінокислотами, а саме триптофаном, у поєднанні з опроміненням ультрафіолетом ($\lambda = 278$ нм) та різними температурними режимами: 60°C для Ag10, 40°C для Ag20 та 25°C для Ag50. Вихідна концентрація усіх розчинів складала 100 мкМ. Для досліджень використовувались 10-кратні розведення, які на графіках представлені у вигляді логарифмічних показників.

У культурі клітин MDCK досліджувані наночастинки не проявили вираженого цитотоксичного ефекту (рис. 4.36).

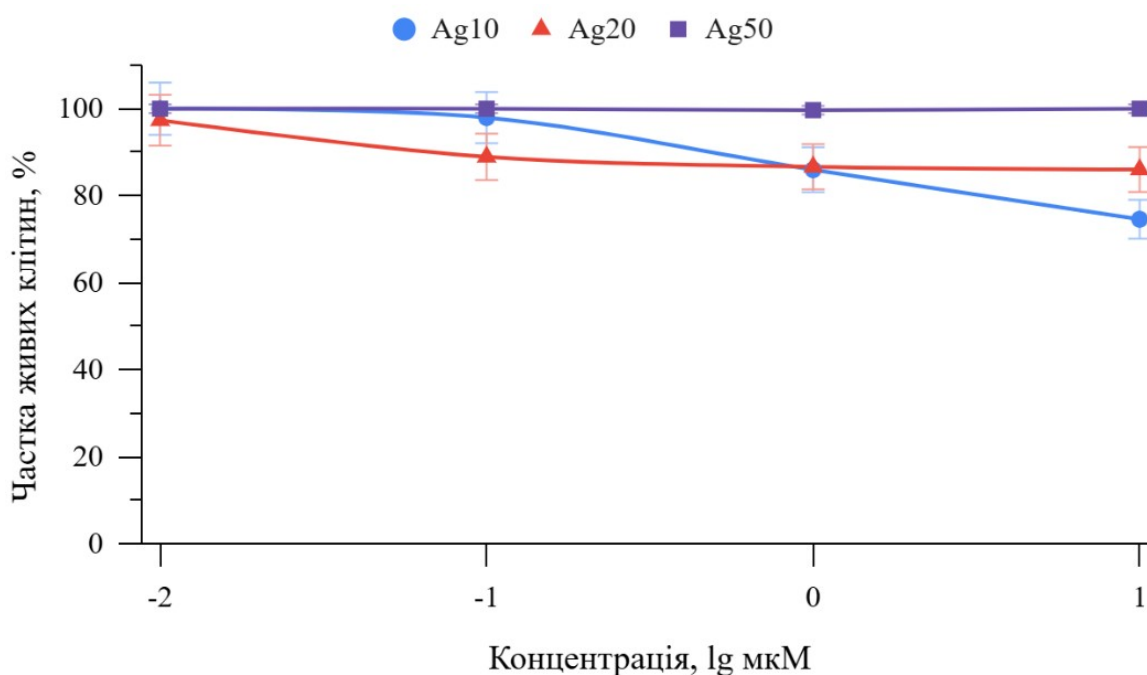


Рисунок 4.36 Вплив наночастинок срібла різного діаметру на життєздатність культури клітин MDCK. Дані представлені як середні значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Жоден із зразків не знижував життєздатність клітин більше ніж на 25% за найменшого розведення. Найбільш виражений цитотоксичний ефект мали Ag10, для

яких частка живих клітин при концентрації 10 мкМ становила близько 74% і зростала зі зменшенням концентрації. У випадку Ag50 взагалі не було помічено впливу на культуру, а НЧ Ag20 показали середній результат порівняно з іншими зразками, з максимальним зниженням життєздатності клітин на $13,99 \pm 0,83\%$.

Оскільки зменшення частки живих клітин на $\geq 50\%$ не спостерігали у діапазоні досліджуваних концентрацій, для НЧ срібла неможливо розрахувати індекс CC_{50} .

Антивірусна активність НЧ була досліджена за профілактичною схемою, та за умови внесення препарату в різний час після початку інфекції в клітинах.

Попередня інкубація з культурою клітин протягом 24 год разків Ag10 та Ag20 продемонструвала значний протигрипозний ефект відносно IAV H1N1. Найменші за діаметром НЧ забезпечували $92,37 \pm 3,61\%$ антивірусної активності за концентрації 1 мкМ (рис.4.37).

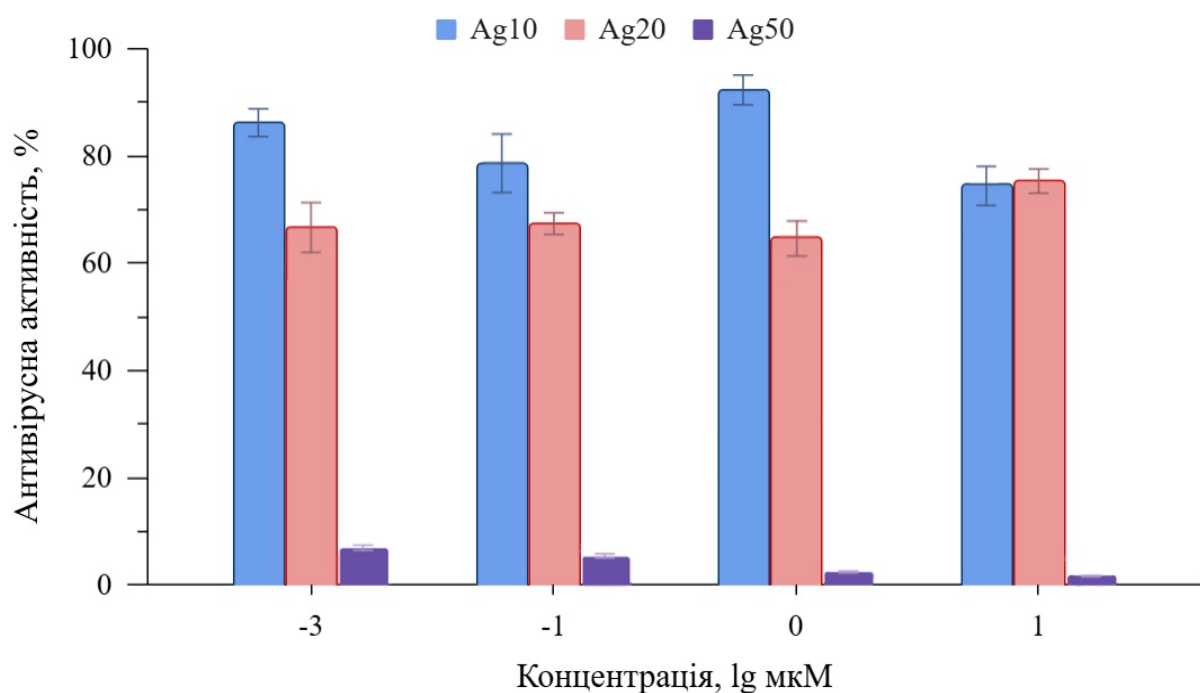


Рисунок 4.37 Вплив наночастинок срібла на репродукцію вірусу грипу типу А в культурі клітин MDCK за профілактичної схеми. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Відповідно до залежності активності НЧ від розміру, Ag20 менш ефективно впливали на репродукцію IAV, ніж НЧ діаметром 10 нм, проте активність сягала 75%. Стосовно найбільших за діаметром Ag50, їхній вплив не перевищував $7,08 \pm 0,71\%$ (рис.4.37).

Друга схема дослідження включала внесення НЧ в культуру клітин MDCK на 2 часових точках: 0 год в.п.і. (тобто, одночасно з вірусом) та через 1 год в.п.і. Результати дослідження вказували на те, що НЧ срібла не мали значного впливу на репродукцію IAV незалежно від їх діаметру: активність жодного із зразків не перевищувала 15% (рис. 4.38 та рис. 4.39). Проте, варто зазначити, що для НЧ малого діаметру Ag10 та Ag20 прослідковувалася певна залежність ефективності від часу внесення НЧ в культуру.

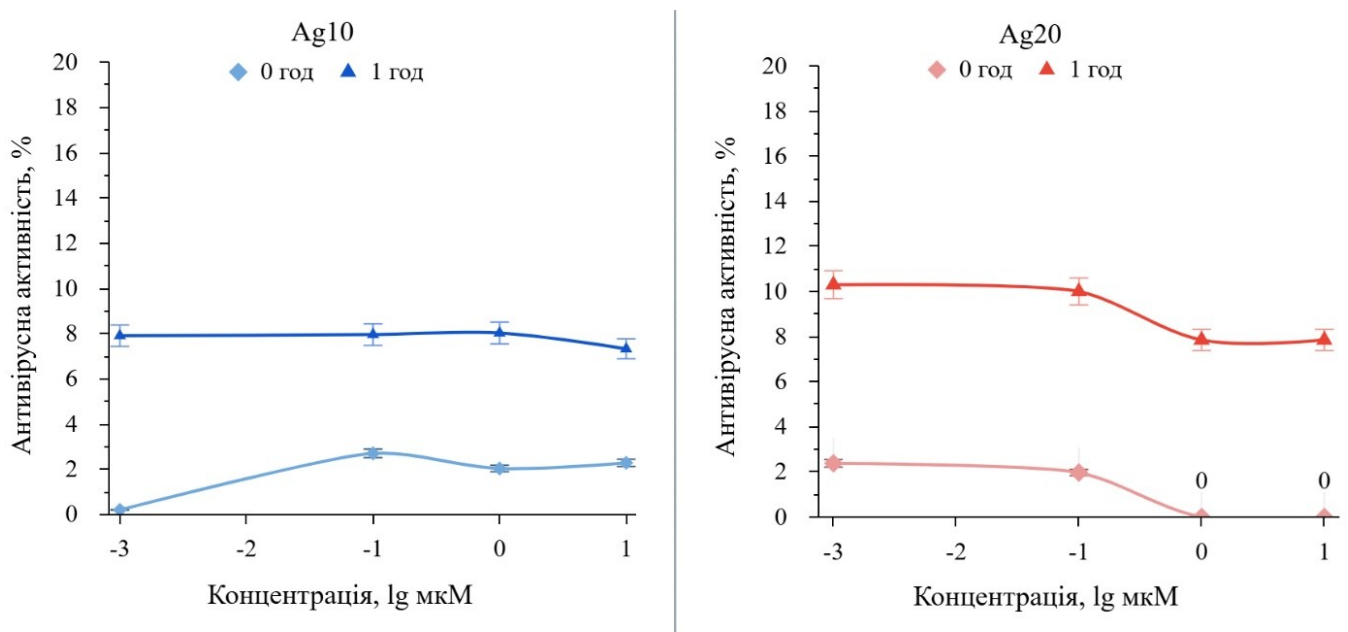


Рисунок 4.38 Вплив наночастинок Ag10 та Ag20 на репродукцію вірусу грипу типу А в культурі клітин MDCK за умови внесення в різний час від моменту встановлення інфекції. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

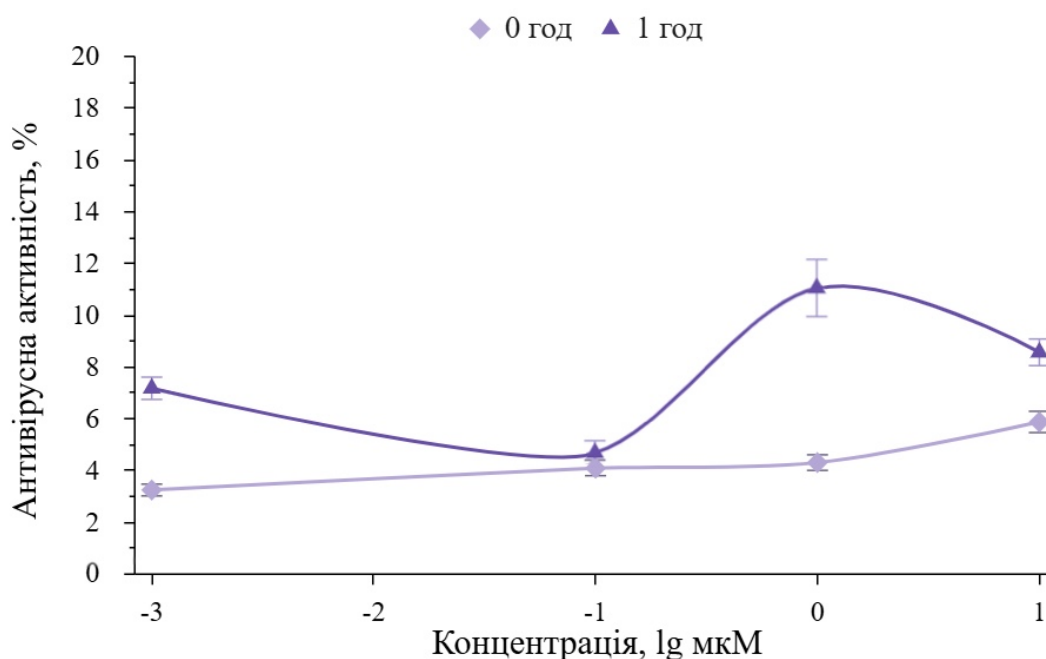


Рисунок 4.39 Вплив наночастинок Ag50 на репродукцію вірусу грипу типу А в культурі клітин MDCK за умови внесення в різний час від моменту встановлення інфекції. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

При додаванні НЧ Ag10 через 0 год в.п.і. антивірусна активність не перевищувала 3%, а вже через 1 год становила близько 8% незалежно від концентрації. Схожа тенденція спостерігалася і для Ag20, проте через 1 год в.п.і. максимум ефективності становив $10,3 \pm 0,62\%$.

Водночас, активність Ag50 не мала кореляції залежно від часу внесення від початку інфекції.

Таким чином, досліджувані суміші наночастинок срібла різного діаметру проявили слабкий цитотоксичний ефект на культуру клітин MDCK і при цьому мають виражений вплив на репродукцію вірусу грипу типу А за профілактичної схеми застосування. Антивірусний ефект має пряму залежність від діаметру НЧ: зі збільшенням розміру знижується активність [194]. Це корелює з загальноприйнятими даними про площу поверхні наночастинок і може вказувати на

здатність досліджуваних препаратів Ag10 та Ag20 до індукції противірусного захисту клітин.

4.2.3 Дослідження срібловмісних нанокompозитів на основі поліелектролітного комплексу карбоксиметилцелюлоза-хітозан

Дана група наноструктур представлена НЧ срібла зафіксованих на плівках (товщина 100 мкм) на основі хітозану низької молекулярної маси (ХНММ) та натрієвої солі карбоксиметилцелюлози (Na-КМЦ). Срібловмісні композити на основі ХНММ–Na-КМЦ були отримані методом зеленого синтезу, де у якості джерела срібла був використаний розчин AgNO_3 , а у якості відновника екстракти зеленого чаю (ЗЧ), кореневища імбиру (Імб) та прополісу (Пр). Синтезовані полімерні системи відрізняються розміром наночастинок в залежності від використаного екстракту: середній діаметр НЧ $\text{Ag}/\text{Ag}_2\text{O}$ для ХНММ –Na-КМЦ–Ag-ЗЧ становить 11 нм, для ХНММ –Na-КМЦ–Ag-Імб – 20 нм, і для ХНММ –Na-КМЦ–Ag-Пр – 44 нм.

Цитотоксичність нанокompозитів була оцінена шляхом їх інкубування в поживному середовищі протягом доби та подальшого додавання цього середовища до культури клітин MDCK. Результати експерименту вказують на те, що окремі компоненти композитів ХНММ, Na-КМЦ та ХНММ–Na-КМЦ не чинили значного впливу на життєздатність клітин (рис. 4.40). У нерозведеному стані частка живих клітин найбільше зменшувалася для зразка ХНММ–Na-КМЦ на близько 13,7% порівняно з контролем клітин.

Дані цитотоксичності композитів, отриманих з використанням природних екстрактів, вказують на те, що срібловмісні композити загалом проявили порівняно сильніший вплив на культуру клітин (рис. 4.41). Зокрема це стосується ХНММ–Na-КМЦ–Ag-ЗЧ та ХНММ–Na-КМЦ–Ag-Пр. Водночас, частка живих клітин $<50\%$ спостерігалася тільки для останнього, а саме $44,50 \pm 1,78\%$, що також було найнижчим результатом. Другий по токсичності – композит ХНММ–Na-КМЦ–Пр без срібла. Тобто, ймовірно, вплив на клітини був обумовлений саме компонентами екстракту прополісу.

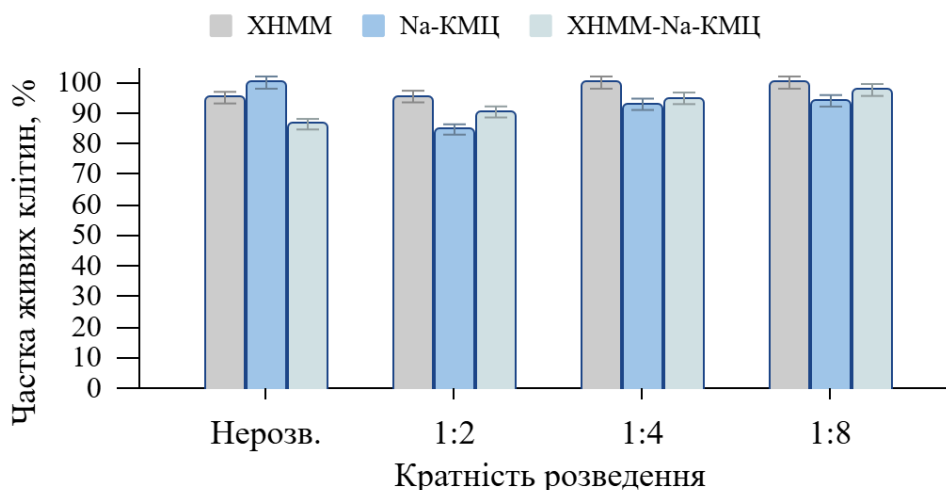


Рисунок 4.40 Вплив нанокompозитів XHMM, Na-KMЦ та XHMM–Na-KMЦ на життєздатність культури клітин MDCK. Дані представлені як середнє значення \pm SD для двох незалежних експериментів, $p < 0,05$

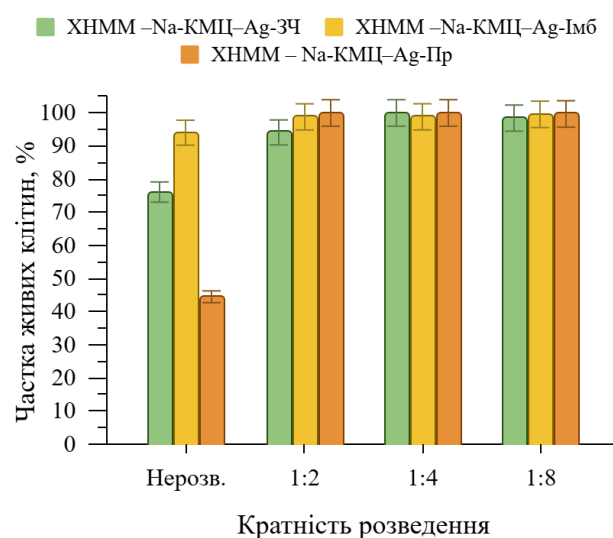
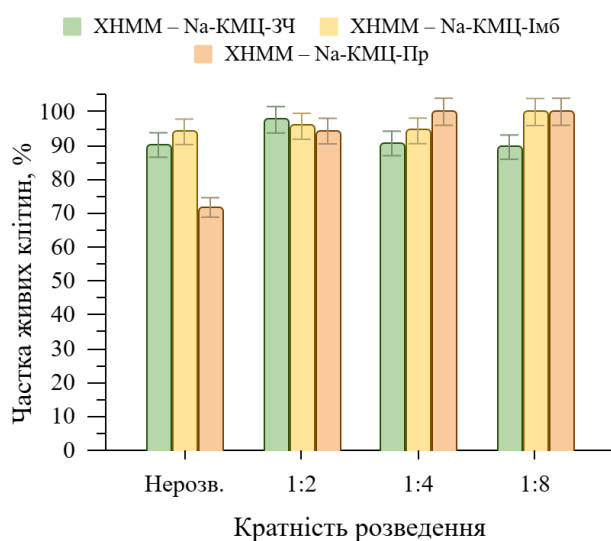


Рисунок 4.41 Вплив нанокompозитів на основі XHMM–Na-KMЦ, отриманих з використанням рослинних екстрактів, на життєздатність культури клітин MDCK. Дані представлені як середнє значення \pm SD для двох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Антивірусний потенціал нанокompозитів відносно вірусу грипу типу А оцінювали шляхом інкубації плівок з вірусною суспензією протягом 1 год та подальшим визначенням інфекційного титру. За результатами підрахунку ТЦД₅₀/мл (рис. 4.42), окремі компоненти композитів – ХНММ, Na-КМЦ та ХНММ–Na-КМЦ – не впливали на інфекційність ІАВ. Для них зменшення титру порівняно з контролем (lg ТЦД₅₀/мл = 8,91±0,02) відбувалося на ≤1 порядку.

Серед композитів без срібла, отриманих з використанням рослинних екстрактів, зниження інфекційного титру вірусу спостерігалось тільки для ХНММ–Na-КМЦ–Пр, і становило 2,015±0,07 порядку.

Срібломісні композити усі демонстрували вплив на інфекційність вірусу, проте для ХНММ–Na-КМЦ–Ag-Імб та ХНММ–Na-КМЦ–Ag-Пр він не перебільшував зниження ТЦД₅₀/мл на >2 порядків відносно контролю. У випадку ж ХНММ–Na-КМЦ–Ag-ЗЧ відбувалася повна інактивація вірусу.

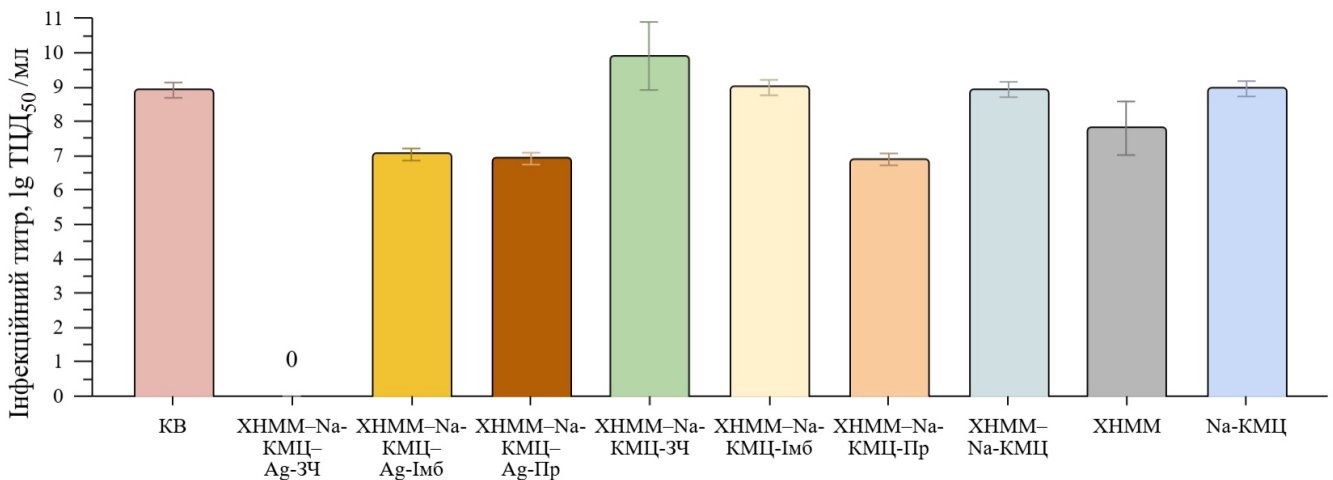


Рисунок 4.42 Інфекційні титри (ТЦД₅₀/мл) вірусу грипу типу А після контакту з нанокompозитами на основі ХНММ–Na-КМЦ протягом 60 хв. Дані представлені як середнє значення ± SD для двох незалежних експериментів, p < 0,05

Крім того, для найактивнішого зразка ХНММ–Na-КМЦ–Ag-ЗЧ була досліджена можливість повторного використання (рис. 4.43). Після першого

експерименту, плівка була залишена при кімнатній температурі до повного висихання на 14 діб. Після цього був проведений її повторний контакт з суспензією IAV протягом 60 хв. Результати визначення інфекційного титру демонстрували повну інактивацію вірусу порівняно з контролем ($\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл} = 6,81 \pm 0,33$).

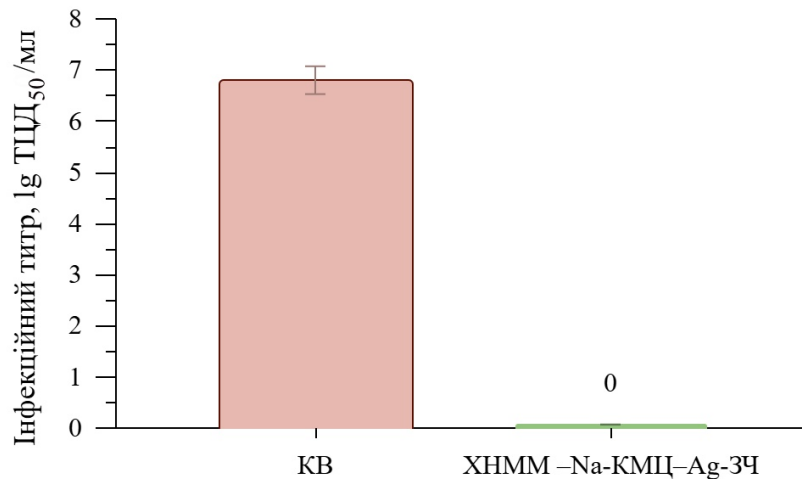


Рисунок 4.43 Інфекційний титр ($\text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$) вірусу грипу типу А після контакту з ХНММ–Na-КМЦ–Ag-3Ч протягом 60 хв за умови повторного використання композиту. Дані представлені як середнє значення $\pm \text{SD}$ для двох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Таким чином, було продемонстровано вірус-інактивуючу здатність нанокompозитів срібла на основі ХНММ–Na-КМЦ, отриманих з використанням природних екстрактів у якості відновника. Серед них композит ХНММ–Na-КМЦ–Ag-3Ч у вигляді плівки з середнім діаметром НЧ Ag/Ag₂O 11 нм повністю інактивував IAV H1N1 навіть при повторному використанні, водночас не проявляючи цитотоксичного впливу на культуру клітин MDCK. Срібловмісні плівки з середнім діаметром НЧ >20 нм були набагато менш ефективні [195-197]. Зважаючи на результати дослідження для окремих компонентів композитів, можна зробити висновок, що противірусна активність обумовлена саме наявністю НЧ Ag/Ag₂O і залежить від їхнього розміру.

4.3 Дослідження активності озельтамівіру як референс-препарату на вірус грипу типу А Н1N1

Як референс було обрано інгібітор нейрамінідази озельтамівір (ОЗ, торгова назва “Таміфлю”, назва за номенклатурою IUPAC: етил (3R,4R,5S)-5-аміно-4-ацетамідо-3-(пентан-3-ілокси)циклогекс-1-ен-1-карбоксилат) зокрема через те, що він є найпоширенішим у світі протигрипозним препаратом. Він досліджувався у водорозчинній формі озельтамівіру фосфату, який метаболізується карбоксилестеразами клітин до своєї активної форми – озельтамівіру карбоксилату. Структурно озельтамівір є модифікацією 2,3-дегідро-2-дезоксi-N-ацетилнейрамінової кислоти з додаванням аміногрупи С4 та аліфатичного бічного ланцюга (рис. 4.44).

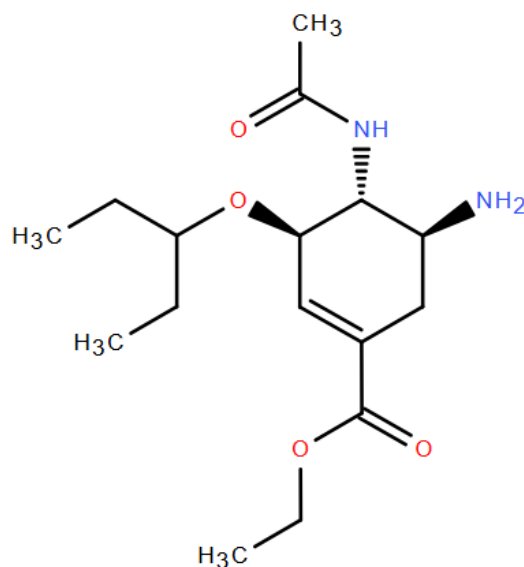


Рисунок 4.44 Структурна формула озельтамівіру

Результати дослідження цитотоксичності в культурі MDCK демонстрували дозозалежний вплив ОЗ на життєздатність клітин (рис. 4.45). За найбільшої досліджуваної концентрації 1600 мкг/мл частка живих клітин становила близько 8%, і далі зростала, сягаючи $60,25 \pm 3,61\%$ при 800 мкг/мл і максимально 85,66%

$\pm 5,11\%$ при 25 мкг/мл. На основі отриманих даних було розраховано значення CC_{50} , що становило $826,20 \pm 51,22$ мкг/мл (таблиця 4.10).

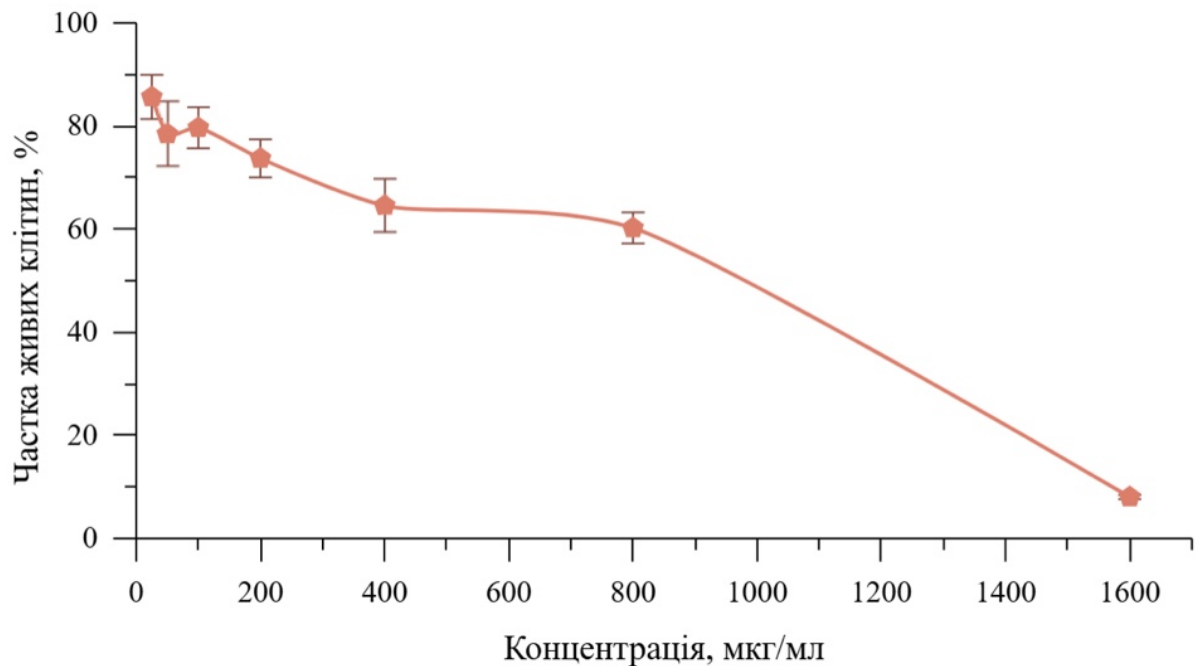


Рисунок 4.45 Вплив озельтамівіру фосфату на життєздатність культури клітин MDCK. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Антивірусну активність відносно IAV H1N1 досліджували за пост-експозиційною та профілактичною схемами внесення у діапазоні концентрацій ОЗ від $0,5$ до 500 мкг/мл.

Для пост-експозиційної схеми препарат вносили в культуру через 1 год після інфікування вірусом. Озельтамівір, як і очікувалось, ефективно інгібував репродукцію вірусу в клітинах (рис. 4.46, А). У діапазоні 10 - 500 мкг/мл антивірусна активність становила 75% з піком у $79,61 \pm 3,58\%$ за концентрації 50 мкг/мл. Далі спостерігали зниження активності з найменшим значенням у $31,46 \pm 1,11\%$ при $0,5$ мкг/мл. Обраховане значення EC_{50} за пост-експозиційною схемою дослідження становило $3,15 \pm 0,13$ мкг/мл (таблиця 4.10).

Для профілактичної схеми культуру MDCK попередньо інкубували з ОЗ, а після 24 год проводили інфікування клітин вірусом. Результати дослідження також демонстрували дозозалежний ефект, проте з піком у $59,73 \pm 2,86$ % при 100 мкг/мл (рис. 4.46, Б). З наступним зменшенням концентрації відбувалося падіння активності ОЗ і при 1 мкг/мл вона становила лише близько 1%, що можна вважати за відсутність впливу як такого. На основі отриманих результатів для профілактичної схеми дослідження було також обраховано індекс EC_{50} , що становив $68,63 \pm 3,29$ мкг/мл (таблиця 4.10).

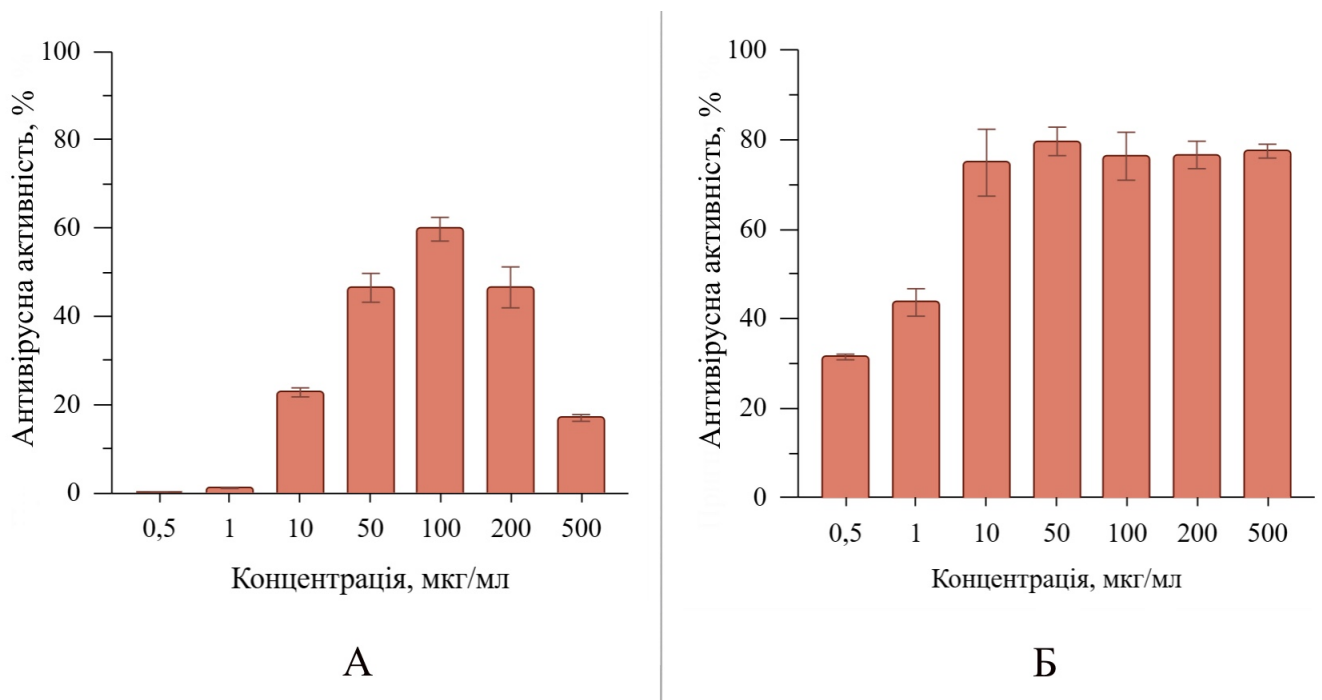


Рисунок 4.46 Вплив озельтамівіру на репродукцію вірусу грипу типу А у культурі клітин MDCK за пост-експозиційної (А) та профілактичної (Б) схем внесення. Дані представлені як середнє значення \pm SD для трьох незалежних експериментів, $p < 0,05$

Таким чином, можна відзначити, що внесення в інфіковану культуру через 1 год в.п.і. є набагато більш ефективним у протидії IAV H1N1, порівняно з профілактичною схемою. Дана закономірність також відображена у розрахованих

індексах напів максимальної ефективної концентрації та SI для кожної із схем противірусної активності (таблиця 4.10). Так, SI для пост-експозиційної схеми застосування ОЗ у ≈ 22 рази більший, ніж за профілактичної.

Таблиця 4.10 Індокси цитотоксичності та антивірусної активності озельтамівіру залежно від схеми дослідження

| | | |
|---------------------------|-------------------|---------------|
| CC ₅₀ , мкг/мл | 826,20±51,22 | |
| Схема дослідження | Пост-експозиційна | Профілактична |
| EC ₅₀ , мкг/мл | 3,15±0,13 | 68,63±3,29 |
| SI | 262,39±11,54 | 12,04±0,57 |

Отримані результати противірусної активності озельтамівіру відносно IAV H1N1 загалом корелюють з мішенню дії препарату. На сьогоднішній день для ОЗ не було продемонстровано здатності до індукції інтерферонів або інших цитокінів вродженого клітинного імунітету, тому профілактичний ефект, ймовірно, обумовлений накопиченням ОЗ в клітинах і подальшим впливом залишкових молекул на вірус грипу.

РОЗДІЛ 5

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ РОБОТИ

Епідемічний сезон 2025-2026 років відзначився появою особливої лінії вірусу грипу типу А – субклади К штаму H3N2 – що складає 80% випадків грипозної інфекції моментом на січень 2026 року. Новий вірус не тільки сприяв передчасному початку сезону (на місяць раніше ніж зазвичай), а і спричинив значну хвилю захворюваності та госпіталізацій по всьому світу [198]. Це сталося завдяки появі 11 мутацій в гені гемаглютиніну H3N2, при цьому швидкість мутації для даного штаму становить в середньому 1-3 амінокислотних заміни на пів-року [199].

Європейський центр профілактики та контролю захворювань (ECDC) зазначає, що циркуляція H3N2 субклади К є найвищою серед дітей віком від 5 до 14 років. Водночас підвищена госпіталізація внаслідок нехарактерно тяжкого для даного штаму перебігу інфекції спостерігається серед усіх вікових груп, проте серед людей похилого віку ≥ 65 років є найбільшою [200].

Одним із факторів, що сприяв поширенню H3N2 субклади К, є менша ефективність вакцинації, оскільки нові мутації не були враховані у складі рекомендованої вакцини на сезон 2025-2026 років. Ще однією причиною вважається відносно низька циркуляція H3N2 в минулорічні сезони, що загалом знизило імунітет популяції [198]. Більше того, рівень вакцинації від вірусів грипу залишається невисоким навіть серед вразливих категорій населення, незважаючи на те, що це є єдиним загальноприйнятим способом профілактики IAV. Таким чином, поява нового вірусу грипу, не залежно від прямих причин його поширення, знову спричинила значний вплив на економіку та навантаження на систему охорони здоров'я багатьох країн світу. Наявність широкого спектру противірусних препаратів в даній ситуації дозволила б зменшити передачу вірусу, знизити час госпіталізації хворих та підвищити ефективність лікування вразливих категорій населення, схильних до розвитку ускладнень. Постійна неминуча еволюція вірусів

грипу доводить важливість безперервного пошуку протигрипозних агентів, націлених на різні мішені IAV для комплексної боротьби з даним патогеном.

У медичній хімії для пришвидшення пошуку нових ліків часто використовуються так звані «привілейовані скефолди». Їх можна визначити як певні молекулярні «каркаси» здатні до взаємодії з різноманітними біологічними мішенями за рахунок структурної модифікації. Як правило вони також володіють оптимальними параметрами ADMET, таким чином забезпечуючи більшу подібність модифікованої сполуки до ліків. До таких привілейованих скефолдів, що широко зустрічаються серед вже зареєстрованих препаратів, відносять індол, діарилловий ефір, артемізинін, бензотіазол, бензimidазол та інші [201].

Бензотіазол займає особливе місце у медичній хімії завдяки своїм унікальним структурним характеристикам. Наявність гетероатомів сульфуру та нітрогену підвищує здатність похідних BZT утворювати різноманітні типи зв'язків з залишками амінокислот у сайтах зв'язування білків. Планарність кільцевої системи BZT також дозволяє утворювати оптимальні π - π -стекингові взаємодії, які особливо важливі при взаємодії з нуклеїновими кислотами або планарними білковими кишнями [202]. Таким чином, BZT є популярним компонентом багатьох препаратів різного спектру дії. Він також легко модифікується для покращення властивостей. Наприклад, його об'єднання з вуглеводом здатне підвищити біологічну активність за рахунок збільшення розчинності сполуки у воді та полегшення взаємодії з мікроорганізмами.

Серед похідних BZT також повідомлялося про кандидати у противірусні агенти, направлені на віруси грипу. Наприклад, молекула KIN1000 була визначена як сполука, що здатна активувати RIG-I-подібні рецептори, а її наступник KIN1148 продемонстрував зниження вірусного навантаження при введенні разом із субоптимальною дозою вакцини проти H1N1 мишам, інфікованим IAV [203]. Ще одні похідні BZT, націлені на фактори клітинного імунітету, були визначені Bulanova et al. Вони представили сполуки, що інгібували протиапоптотичні білки

Bcl-2, тим самим індукуючи передчасну загибель клітин, інфікованих IAV. Крім того, були також спроби створення інгібіторів нейрамінідази на основі похідних BZT [203].

В даній роботі похідні бензотіазолу були представлені флуоровмісними β -N-бензотіазоліл глікозидами: 10S-52, 10S-53, 10S-54 та 10S-55. Загалом, серед глікозильованих похідних BZT найбільш відомими є O-, S-, та C-глікозиди, в той час як N-глікозиди зустрічаються дуже рідко. Зважаючи на те, що чи не єдиний приклад отримання подібних сполук датується 1952 роком [184], досліджувані β -N-бензотіазоліл глікозиди є унікальними.

Ця група речовин складається з молекул, глікозильованих у положенні 4 або 6, та з замісниками $-CF_3$ або $-SF_5$. Було визначено, що біологічна активність β -N-бензотіазоліл глікозидів варіює в залежності від структурних особливостей. Зокрема, глікозилювання у положенні 4 та $-SF_5$ група у складі молекули сприяла порівняно менш вираженому прояву цитотоксичного ефекту у культурі клітин MDCK. За оцінкою параметрів ADMET дані сполуки мають оптимальні фізико-хімічні характеристики та є прийнятними за більшістю правил Медичної хімії. За результатами дослідження протигрипозної активності за пост-експозиційною схемою, серед чотирьох β -N-бензотіазоліл глікозидів, лише сполука 10S-54 (4- β -D-глюкопіранозиламіно-2-(трифлуорометил)-1,3-бензотіазол) проявила протигрипозний ефект. Однак, власне антивірусна активність IAV H1N1 не перевищувала 18% і обмежувалася лише дією на поточну інфекцію без додаткового впливу на вірусне потомство. Через низьку антивірусну активність 10S-54, його оцінку за допомогою індексів IC_{50} та SI провести неможливо, в тому числі і порівняти з референс-препаратом озельтамівіром.

Зважаючи на те, що N-глікозильовані гетероцикли є основними компонентами ДНК та РНК, структурна подібність сполуки 10S-54 до пуринових нуклеозидів може свідчити про її можливий механізм дії. Було зроблено припущення, що протівірусна активність даного β -N-бензотіазоліл глікозиду може бути обумовлена

взаємодією з полімеразним комплексом IAV. Для перевірки цієї гіпотези сполука 10S-54 була здокована до CBD субодиниці PB2 RdRp. Під час симуляції молекулярної динаміки, попри те, що 10S-54 не покинула місця докування, вона продемонструвала високий рівень лабільності та кілька конформаційних змін в межах CBD. На основі отриманих результатів можна зробити висновок, що 10S-54, ймовірно, володіє деяким рівнем спорідненості до одного із ключових доменів RdRp грипу, однак ця спорідненість не є достатньою для виразного біологічного ефекту.

Загалом, враховуючи унікальність 10S-54 як представника β -N-бензотіазоліл глікозидів, дану молекулу можна вважати вартою уваги з точки зору розробки протигрипозних агентів. Хоча прогноз параметрів ADMET є дещо песимістичним зі сторони токсичності, але якщо порівняти його з аналогічними параметрами фавіпіравіру (ФПВ) як активного проти IAV аналогу нуклеозидів, можна помітити схожі проблеми у затвердженого препарату (додаток 4). Зокрема ФПВ так само порушує правило QED, DILI, Human Hepatotoxicity та Genotoxicity. Тому дані параметри варто враховувати, але не вважати перешкодою для подальших досліджень. Також варто зазначити, що N-глікозильовані гетероцикли є поширеними серед затверджених лікарських препаратів різного спектру дії, у тому числі і противірусних, таких як аналог нуклеозидів рибавірін, інгібітор кінази цитомегаловірусу марібавір, нуклеозидний інгібітор зворотної транскриптази ентекавір та інші [204]. Зважаючи на це 4- β -D-глюкопіранозиламіно-2-(трифлуорометил)-1,3-бензотіазол є перспективним, з урахуванням подальших модифікацій молекули для покращення протигрипозного ефекту.

Бензimidазол як ще один представник привілейованих скефолдів теж присутній у широкому спектрі біологічно активних сполук. Кільце BZI містить два атоми азоту з амфотерною природою, що дозволяє йому не тільки приймати або віддавати протони, але й легко утворювати різноманітні слабкі взаємодії. До прикладу, серед BZI-вмісних противірусних сполук є енвіроксим та енвірадин. Обидві сполуки – це ненуклеозидні аналоги та інгібітори РНК-вірусів, таких як

риновіруси та ентеровіруси [205]. Тіадіазол також широко використовується у медичній хімії, адже сполуки, що містять його, відрізняються метаболічною стабільністю, проникністю крізь мембрани та біодоступністю. Зокрема властива йому висока електронна щільність сприяє сильним електростатичним та π - π -стекинговим взаємодіям з біологічними мішенями, тоді як його планарна та хімічно стабільна структура підтримує оптимальне зв'язування з рецепторами [206]. Численні сполуки демонструють великий спектр біологічної активності, включаючи антибактеріальну, протиракову, протизапальну, та противірусну дію [207]. Було також продемонстровано, що гібриди BZI та тіадіазолу мають синергетичну біологічну активність, яка часто перевершує ефективність кожного окремого інгредієнта [207].

Станом на даний момент, про сполуки, що містять BZI, тіадіазол та проявляють активність саме проти штамів вірусу грипу типу А, не повідомлялося в доступних літературних джерелах. Проте є ряд речовин з протигрипозним ефектом, що мають один із цих компонентів в структурі молекули. Наприклад, Tawfik et al. синтезували ряд похідних 1,3,4-тіадіазолу, що продемонстрували активність проти високопатогенного штаму IAV H5N1 [208]. Tatar et al. також визначили сполуку – N-{3-(метилсульфаніл)-1-[5-(феніламіно)-1,3,4-тіадіазол2-іл]пропіл} бензамід, яка проявила протигрипозну активність відносно IAV H3N2 [209]. Серед похідних BZI, особливої уваги заслуговують бензімідазоли на основі (тіо)семікарбазону Francesconi et al., які показали активність одночасно відносно штамів IAV H3N2 та H1N1, а також проти коронавірусу людини 229E [210].

На жаль, автори жодних з перелічених активних сполук не роблять припущення про механізм їхньої дії. Проте, на основі даних про деякі похідні BZI, що проявляють противірусну активність відносно вірусу імунодефіциту людини (ВІЛ) та вірусу гепатиту С (ВГС), можна зробити висновок, що, ймовірно, мішенями подібних сполук не є поверхневі антигени. Адже у випадку ВІЛ речовини, що містять BZI, взаємодіють з інтегразою ІН вірусу, а для ВГС дослідження проводили

з використанням субгеномного реплікону, позбавленого структурних генів [211].

В даній роботі в якості кандидатів у противірусні препарати, що містять бензimidазол та тіадіазол, було досліджено групу з 8 сполук – галогеновмісних [1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензimidазолів. Речовини відрізняються замісниками у положенні 3 гетероциклу: $-\text{CH}_3$, $-\text{CCl}_3$, $-\text{CF}_2$ або $-\text{CF}_2\text{Br}$, а також у положенні 4. За останнім всі сполуки було розділено на 2 підгрупи, де речовини першої містять або $-\text{C}\equiv\text{N}$, або $-\text{CH}_3$ (2618, 1792, 1752, 1790), а другої – $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ (1634, 1870, 1796, 1782).

З погляду цитотоксичності для культури MDCK, залежність структура-активність представників обох підгруп прослідковується через наявність або відсутність галогеновмісних груп. Так, сполуки з $-\text{CF}_2$ та $-\text{CF}_2\text{Br}$ у складі чинили найбільший вплив на клітини, а з $-\text{CH}_3$, відповідно, найменший. Взагалі флуор є дуже поширеним компонентом серед затверджених ліків та кандидатів. Його присутність дозволяє покращити селективність, стабільність та ліпофільність, але також може вплинути на токсичність. Водночас, наявність $-\text{CF}_2\text{Br}$ у складі молекули, може призвести до утворення високореактивних сполук, які значно підвищують токсичність [212]. Наявність замісника $-\text{C}\equiv\text{N}$ загалом також негативно вплинула на життєздатність клітин, що може бути пов'язано з тим, що нітрильна група змінює розчинність та стабільність речовин [213].

При визначенні протигрипозного потенціалу, серед 8 представників [1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензimidазолів, тільки 4 проявили ефект відносно IAV H1N1 за пост-екпозиційною схемою дослідження, а саме сполуки 1870 (замісники: $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ і $-\text{CF}_2$), 1796 ($-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ і $-\text{CF}_2\text{Br}$), 1782 ($-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ і $-\text{CCl}_3$) та 1792 ($-\text{C}\equiv\text{N}$ і $-\text{CF}_2$). Максимальні значення антивірусної активності продемонстрували речовини 1796 та 1870: 75,6% та 71,1%, відповідно. Вплив сполуки 1792 обмежився лише найбільшою досліджуваною концентрацією, хоча і становив 74,5%. Активність [1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензimidазолів також супроводжувалась впливом на інфекційність нового вірусного потомства: від

повного пригнічення до зменшення титру на 1-2 порядку в залежності від сполуки та її концентрації. За розрахунком значень EC_{50} та SI, найвища селективність, а отже і перспективність відзначається для 1870 ($SI = 23,58 \pm 1,13$). Після неї зі значенням $13,03 \pm 0,63$ йде 1796, а речовини 1782 і 1792 в загальному можна вважати мало перспективними, оскільки їхні $SI < 5$.

Загалом можна відзначити чітку залежність структура-активність для перелічених [1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензimidазолів з протигрипозним потенціалом: більшість речовин містить у складі молекули $-COO-CH_2-CH_3$ та флуор у галогенометильній групі. Додавання етил карбоксилату в молекулу загалом є поширеною стратегією покращення біодоступності сполук. Таку функціональну групу можна зустріти в багатьох затверджених препаратах, в тому числі і у складі озельтамівіру. Завдяки $-COO-CH_2-CH_3$ сполука здатна краще проходити крізь мембрану і в середині клітини бути метаболізованою за допомогою карбоксилестераз [214]. Це підтверджується і розрахованими за допомогою ADMETlab3.0 параметрами абсорбції для 1870, 1796 та 1782, які вказують на щонайменше 30% прогнозовану біодоступність.

Усі представники групи [1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензimidазолів мають оптимальні фізико-хімічні характеристики, проте водночас можуть мати надлишкову спорідненість до альбуміну крові. Параметри метаболізму для сполук з противірусною активністю прогнозуються як дещо ускладнені. Зокрема 1870, 1796, 1782 та 1792 можуть виступати інгібіторами кількох ізоформ цитохрому P450. Насамперед це пояснюється гетероциклічністю та планарністю основи молекул, адже через конформацію активного центру ферменту, саме такі структури легко можуть конкурувати з субстратом. За умови оборотного інгібування, це призведе до проблем з метаболізацією інших препаратів/субстратів [215]. Водночас, структурна модифікація молекули може вирішити питання її конформації.

Якщо розглядати прогнозовану токсичність найактивніших проти IAV сполук 1870 та 1796 для оцінки потенціалу їх подальших досліджень, можна відмітити, що

вони порушують правила DILI, Human Hepatotoxicity та Genotoxicity. В даному контексті варто зазначити, що фавіпіравір також порушує перелічені правила, а озельтамівір – DILI та Genotoxicity (додаток 5). Схильність [1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензimidазолів до генотоксичності знову пов'язана зі структурою скефолду, адже великі планарні гетероцикли мають здатність до інтеркаляції в ДНК. На основі цього факту, а також схожості досліджуваних сполук до пуринових основ, було зроблено припущення, що можливий механізм противірусної дії полягає у взаємодії з RdRp вірусу грипу типу А.

Взаємодія сполуки 1870 (етил 3-(дифлуорометил)-5*H*-[1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензimidазол-4-карбоксилат-1,1-діоксид) як найактивнішої з CBD субодиноці PB2 вірусної RdRp була досліджена в симуляційному експерименті. Протягом усього періоду молекулярної динаміки молекула стабільно знаходилась в межах зони доування з утворенням стекінгових та водневих взаємодій.

Таким чином, було оцінено противірусний потенціал галогеновмісних органічних сполук з оригінальним тіадіазино-бензimidазольним скефолдом. Варто зазначити, що серед чотирьох ізомерних форм тіадіазолу, саме 1,3,4-тіадіазол є найбільш досліджуваним у медичній хімії, зокрема через простоту синтезу та реакційні можливості [216]. Проте в структурі досліджуваних в цій роботі сполук був використаний «менш популярний» ізомер 1,2,5-тіадіазол, що робить їх унікальними за своєю хімічною природою. Тим не менш, чотири варіанти сполук на основі даного скефолду продемонстрували вплив на репродукцію IAV H1N1. Дві молекули мають достатній рівень селективності для продовження досліджень. Незважаючи на те, що вони створені з урахуванням особливостей фармакокінетики, подальші модифікації дозволять покращити фармакологічний профіль, за умови збереження противірусної активності.

Нуклеозиди (як і нуклеотиди) відіграють важливу роль у реплікації та транскрипції генетичної інформації, і тому їх десятиліттями використовували як протипаразитарні, антибактеріальні та противірусні агенти. За цей час було

випробувано численні модифікації, включаючи зміни цукру, нуклеотидної основи, глікозидного зв'язку та фосфатної групи. Для підвищення метаболічної стабільності препаратів було запропоновано використання тетрагідрофурану, що, наприклад, міститься у складі азидотимідину – найпершого препарату, зареєстрованого для антиретровірусної терапії, та софосбувіру – ігнібітора РНК полімерази ВГС [217]. Далі, як біоізостер тетрагідрофурану було запропоновано тетрагідротіофен (ТНТ), що містить сірку, а ТНТ-вмісні аналоги нуклеозидів було виділено в окрему групу тіонуклеозидів. Наявність атому S надає перевагу тіонуклеозидам над 4'-оксонуклеозидами, до прикладу, підвищену метаболічну стійкість до різних вірусних та клітинних ферментів [218]. Також на практиці було визначено різницю у впливі на клітини. Nagaguchi et al. провели синтез та дослідження тіонуклеозидних аналогів для широкого спектру вірусів та порівняли їхню дію залежно від наявності атомів S або O в ТНТ. Дослідники визначили, що 4'-тіонуклеозиди проявили високий противірусний ефект відносно ВІЛ та вірусу простого герпесу 1 типу (ВПГ-1), і водночас були менш токсичними, ніж відповідні 4'-етинільні похідні 2'-дезоксцитидину. На жаль, дані сполуки не проявили активності відносно штамів H1N1 та H3N2 вірусу грипу [219].

Загалом гілка досліджень ТНТ-вмісних сполук, направлених на віруси грипу, зараз відносно мала, проте активно розвивається. Так, Rashad et al. продемонстрували, що нові конденсовані похідні тіофену та тієнопіримідину здатні впливати на репродукцію IAV H5N1 [220]. З метою покращення біологічної активності балоксавіру Chen et al. створили ряд похідних ВХА на основі тіофену. Ці сполуки продемонстрували активність відносно IAV H1N1 та деяких клінічних штамів IAV, але найбільш важливим є те, що їхній механізм дії полягав не тільки в інгібуванні ендонуклеазної активності РА, а і у взаємодії з нуклеопротеїнами та RdRp [221]. Однак варто зазначити, що згадані тіофен-вмісні сполуки не є тіонуклеозидами.

У даній роботі було досліджено флуоровмісні похідні тіофену та

тіонуклеозидні аналоги на основі тетрагідропіримідину. Останній також є популярним компонентом серед кандидатів у противірусні агенти широкого спектру дії. Наприклад, Huang et al. відкрили тетразаміщені тетрагідропіримідини, активні відносно IAV H1N1. Автори зазначають, що ці сполуки здатні пригнічувати експресію білків NP та PB2 [222]. Lou et al. визначили, що піримідинове кільце може бути основою нових інгібіторів нейрамінідази: їхні сполуки – похідні 6-оксо-1,4,5,6-тетрагідропіримідин-5-карбоксилату – продемонстрували ефективно пригнічення активності NA штаму H1N1 [223].

Досліджені тут флуоровмісні похідні тіофену є оригінальними сполуками. Молекули 10S-45 та 10S-49 містять ТНТ, $-CH_2OH$, $-CF_3$ та відрізняються між собою кількістю гідроксильних груп. Відповідно, 10S-46 та 10S-48 містять тетрагідропіримідин-2,4-діон з'єднаний з атомом карбону у положенні 5 ТНТ і є тіонуклеозидами.

Було визначено, що їх цитотоксичний ефект на культуру клітин MDCK в більшості мало залежить від структурних особливостей окремих молекул. Усі сполуки, крім 10S-49, продемонстрували схожий вплив на життєздатність клітин. Знижену активність 10S-49 на культуру можуть пояснити дослідження токсичності нуклеозидних інгібіторів зворотної транскриптази, що використовуються в антиретровірусній терапії. В даному контексті було висунуто гіпотезу «мітохондріальної дисфункції», яка полягає в тому, що мітохондріальна ДНК-полімераза Pol γ є менш селективною відносно дидезоксинуклеотидів (ddNTP), ніж інші клітинні ДНК полімерази. Тобто, якщо Pol γ вбудує ddNTP в ланцюг, відбудеться термінація останнього, що в більшому масштабі призведе до мутацій мітохондріальної ДНК, виснаження енергії та оксидативного стресу [224]. Відповідно, наявність додаткової гідроксильної групи у сполуки 10S-49, теоретично пояснює її меншу цитотоксичність, і одночасно може бути причиною відсутності противірусної активності. Адже результати дослідження впливу 4 похідних ТНТ вказують на те, що протигрипозний ефект проявили лише 10S-45, 10S-46 та 10S-48.

Незважаючи на структурну відмінність сполук 10S-45 та 10S-46, їхні значення EC_{50} пригнічення репродукції IAV схожі між собою і становлять ≈ 51 мкг/мл. З урахуванням того, що обидві сполуки є сумішами 4 стереомерів в невідомому співвідношенні, остаточно зробити висновки про їх активність неможливо. На даному етапі ми визначили, що протівірусний ефект є, але для визначення найактивнішого ізомеру необхідно розділити суміш.

Серед досліджуваних похідних ТНТ сполука 10S-48 (1-((2RS,4RS,5RS)-4-гідрокси-2-гідроксиметил-2-(трифлуоро-метил)тетрагідротіофен-5-іл)-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-2,4-діон) виявилась найбільш селективною за показником напівмаксимальної ефективної концентрації. Більше того, значення EC_{50} озельтамівіру для даного штаму було у 7,5 разів вище.

Параметри ADMET також є цілком задовільними для представлених тіонуклеозидів. 10S-46 та 10S-48 мають оптимальні фізико-хімічні характеристики та параметри Медичної хімії та розподілу. З точки зору токсичності для організму, для цих сполук прогнозується гепатотоксичність, генотоксичність та канцерогенність. Проте це є очікуваним, зважаючи на те, що 10S-46 та 10S-48 належать до нуклеозидних аналогів, а для сполук даного типу порушення перелічених правил є поширеним явищем, як можна спостерігати у випадку фавіпіравіру.

Можливою мішенню дії похідних ТНТ було обрано CBD субодиниці PB2 RdRp вірусу грипу. Підрахунок афінності на основі результатів докінгу дозволив виділити найактивніший діастереомер 10S-46. Виявилось, що він має конформацію ідентичну до такої 10S-48, за винятком відсутності гідроксильної групи у положенні 4 тіофену. Обидва тіонуклеозиди мають високу спорідненість до CBD PB2. Натомість, результати симуляційного експерименту для 10S-45 вказують на те, що протівірусна дія даної сполуки обумовлена взаємодією з іншими вірусними або клітинними факторами. Таким чином, дослідження групи оригінальних флуорвмісних похідних тіофену дозволило визначити два тіонуклеозиди зі значним

протівірусним потенціалом відносно IAV H1N1.

Ще одним популярним скефолдом у медичній хімії є тріазол. Він вважається гарним амідним біоізостером, який легко зв'язується з біологічними мішенями за рахунок утворення водневих зв'язків та диполь-дипольних взаємодій. Тріазоли зустрічаються серед широкого спектру препаратів, включаючи протиракові, протипаразитарні, протигрибкові, антибактеріальні та протівірусні [225]. До останніх зокрема належать такі відомі ліки, як інгібітор RdRp рибавірін, ненуклеозидний інгібітор зворотної транскриптази ВІЛ доравірін та інгібітор корцептора ВІЛ маравірок [226]. Також повідомляється про чималу кількість кандидатів у протівірусні агенти з даним гетероциклом у складі, серед яких є молекули з активністю проти вірусів грипу. Наприклад, Ji et al. представили групу тріазол-вмісних похідних індолу, ефективних відносно IAV H1N1 [225]. Cheng et al. синтезували похідні 1*H*-1,2,3-тріазол-4-карбоксаміду, що пригнічували реплікацію штамів H3N2, H1N1, H5N1, а також H1N1 резистентного до адамантанів та озельтамівіру. Вони також визначили, що механізм дії цих сполук полягав у взаємодії з вірусним нуклеопротеїном [227]. Після відкриття порожнини 430 в нейрамінідазі, одним із напрямків подолання резистентності до інгібіторів NA стало націлювання на даний сайт зв'язування. Ju et al. розробили ряд тріазол-вмісних похідних озельтамівіру, здатних до одночасної взаємодії з класичним каталітичним сайтом і вищезгаданою порожниною. Їхні сполуки продемонстрували здатність блокувати активність NA штамів H5N1, H5N2 та H5N6 [228].

В рамках даної роботи тріазол-вмісна сполука представлена біс(5-дифлуорометил-2-(тетрагідропіран-2-іл)-2*H*-1,2,3-тріазол-4-іл)-сульфоном, або 10S-47, з оптимальними фізико-хімічними параметрами для кандидата у ліки. За результатами дослідження, 10S-47 проявила помірний цитотоксичний вплив на клітини MDCK та високу антивірусну активність з піком у 76,3%. Найвища ефективність спостерігалась за концентрацій нетоксичних для клітин, а значення EC₅₀ для даної сполуки було у 4 рази нижче, ніж аналогічне для ОЗ. Прогнозовані

параметри ADMET також були цілком прийнятними. Схильність до прояву гепатотоксичності та генотоксичності також притаманна і озельтамівіру. Однак, для подальших досліджень та покращення фармакокінетичного профілю, варто звернути увагу на потенційні нефротоксичність та нейротоксичність 10S-47.

Зважаючи на те, що тріазол-вмісні сполуки виступають в ролі інгібіторів вірусних полімераз, а також на склад власне 10S-47 (тріазол імітує азотисту основу, а ТНР – залишок цукру), було зроблено припущення, що дана сполука взаємодіє з RdRp IAV. Як і у випадку з попередніми органічними сполуками, воно було перевірено шляхом симуляції молекулярної динаміки молекули з CBD субодиниці PB2 RdRp. З урахуванням того, що сполука містить 2 стереоцентри, для докінгу було використано 3 стереомери 10S-47, з яких вибрано один з найкращою афінністю для подальшого симуляційного експерименту. За його результатами можна зробити висновок, що біс(5-дифлуоро-метил-2-(тетрагідропіран-2-іл)-2Н-1,2,3-тріазол-4-іл)-сульфон, ймовірно, не взаємодіє з CBD PB2 вірусу грипу.

Зважаючи на симетричність молекули 10S-47, можна припустити, що її (R,R)/(S,S)-стереоформа може взаємодіяти з відповідними симетричними структурами, наприклад, гомодимерами. В теорії, одна половина молекули буде взаємодіяти з ділянкою одного мономера, а друга половина – з ідентичною ділянкою другого мономера. Подібний механізм було продемонстровано для даклатасвіру – препарату для терапії ВГС. Симетрична молекула даклатасвіру зв'язується з вірусним білком NS5A у симетричній ділянці, утвореній двома мономерами [229]. У випадку ж вірусу грипу, прикладом подібного білка є гомодимер NS1, критично важливий для трансляції вірусних мРНК та реплікації геному. NS1 доволі широко вивчається як можлива мішень для протигрипозних препаратів. В його ефекторному домені було ідентифіковано ділянку, що одночасно відповідає за взаємодію між мономерами та є сайтом зв'язування NS1 з клітинним фактором CPSF30 [230]. Відповідно, припускається, що обидва 5-дифлуоро-метил-2-(тетрагідропіран-2-іл)-2Н-1,2,3-тріазол-4-ілі 10S-47 можуть розташо-

уватись у ідентичних ділянках мономерів, залишаючись з'єднані між собою сульфонільною групою, таким чином запобігаючи функціонуванню NS1.

Загалом, сполука 10S-47 є перспективним кандидатом для подальших досліджень. Вони мають обов'язково включати визначення активної стереоформи молекули та обґрунтування антивірусної дії відносно IAV H1N1 на основі вищезазначених гіпотез.

Підсумовуючи, дослідження кандидатів у противірусні агенти з класу органічних речовин дозволили виокремити 9 сполук ефективних у пригніченні репродукції вірусу грипу типу А з сумарної кількості 17. Зображення їхніх молекул представлені на рисунку 5.1 разом з розрахованими індексами селективності.

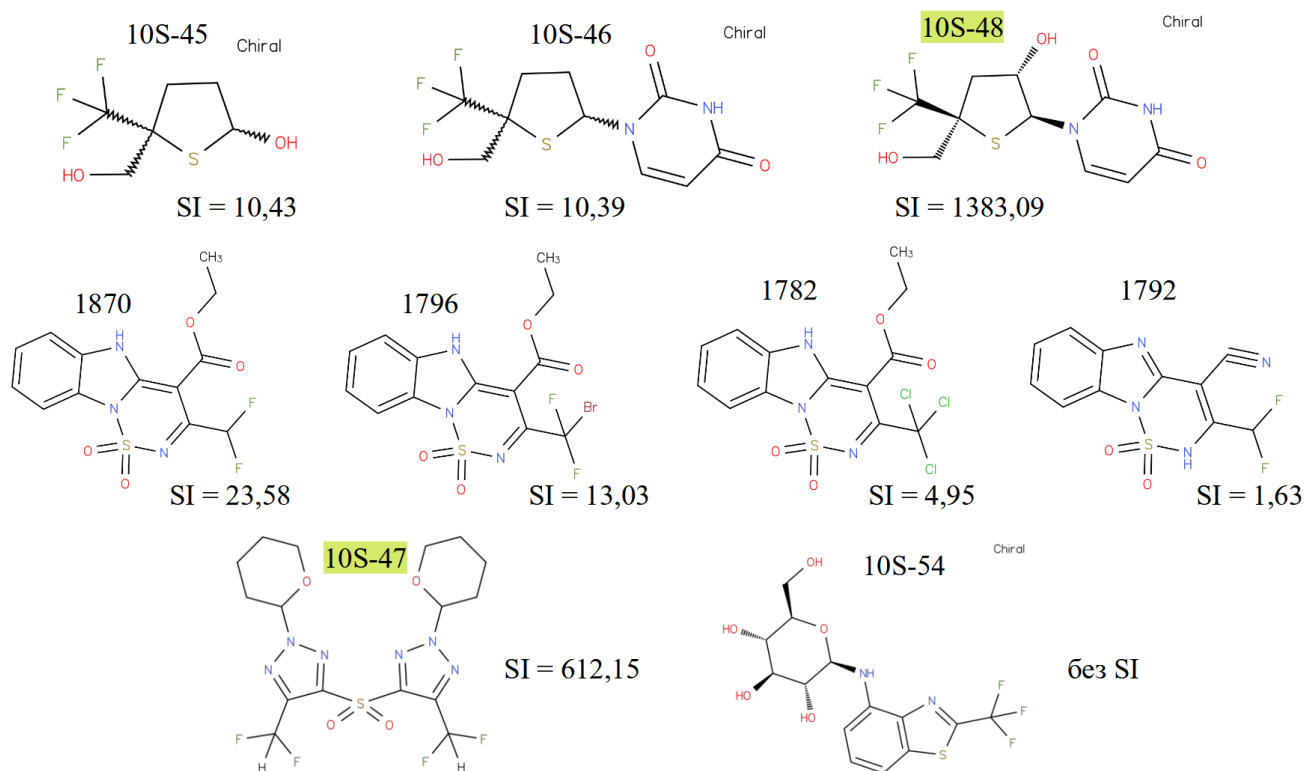


Рисунок 5.1 Представники різних груп органічних сполук, досліджених в рамках даної роботи, що проявили активність відносно штаму H1N1 вірусу грипу типу А. Зеленим виділені кодові назви сполук, значення індексу селективності (SI) яких є найбільшими та перевищує SI озельтамівіру, отриманого для даного штаму

В результаті скринінгу кандидатів у лікарські препарати можна отримати три групи сполук: неактивні, які поступово відсіюються в процесі пошуку; хіти (hits), що демонструють бажану біологічну активність відносно певної цілі; та ліди (leads) – оптимізовані хіти. Визначення останніх зазвичай відбувається під час процесу «від хіта до ліда» (hit-to-lead), який поєднує оптимізацію активності та селективності препарату з досягненням придатних властивостей абсорбції, розподілу, метаболізму та екскреції [231]. При визначенні хіта, окрім повторюваної біологічної активності, також оцінюють фізико-хімічні характеристики сполуки, можливість до подальших модифікацій та відповідність параметрам Медичної хімії.

Загальноприйнятим способом оцінки активності молекули є індекс селективності – співвідношення концентрацій CC_{50} до EC_{50} . Мінімально прийнятним вважається $SI \geq 10$ для підтвердження специфічної дії сполуки та переведення її в категорію хіта [232].

Серед дев'яти органічних сполук, що проявили вплив на репродукцію IAV H1N1, п'ятеро можна віднести до хітів: 10S-45, 10S-46, 1796, 1870 та 10S-47, які пропонується залучити у наступний етап «від хіта до ліда». 4- β -D-глюкопіранозиламіно-2-(трифлуорометил)-1,3-бензотіазол або 10S-54, хоч і не продемонстрував достатнього рівня селективності, є представником оригінального скефолду, які раніше широко не вивчались. З цієї причини пропонується не відносити його до групи неактивних сполук, а продовжити оптимізацію. Тіонуклеозид 1-((2RS,4RS,5RS)-4-гідрокси-2-гідроксиметил-2-(трифлуорометил)-тетрагідротіофен-5-іл)-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-2,4-діон або 10S-48 на підставі найвищого значення SI (>1000) можна одразу віднести в категорію лідів, оскільки він був створений з урахуванням особливостей фармакокінетики та фармакодинаміки.

Друга частина роботи була присвячена пошуку наноматеріалів з противірусною активністю відносно вірусу грипу типу А.

Карбонові сферичні наноструктури фулерени часто використовуються в

біології як каркас для модифікацій. Завдяки своїй гідрофобності вони здебільшого не проявляють токсичності в чистому вигляді. Водночас, прояв активності відносно мікроорганізмів або вірусів здебільшого залежить від функціональних груп на поверхні. В рамках даної роботи було досліджено суміш фулеренів, що складалася з >86% класичних C₆₀ та C₇₀ з додаванням ≈14% C₇₆₋₈₆ та C_{>86}, поверхня яких була модифікована шляхом гідроксилування.

Загалом досліджувану суміш фулеренолів можна вважати малотоксичною для культури MDCK. Найбільший ефект був проявлений у концентраціях 2 та 3 мг/мл і візуально полягав у зміні морфології клітин та втраті міжклітинних контактів. Експериментально було показано, що кількість гідроксильних груп на поверхні фулеренолів впливає на їхню гідрофільність та загальну токсичність. Кількість -ОН > 20, одночасно з підвищеною розчинністю у воді, перешкоджає проникненню через гідрофобні мембрани, сприяючи накопиченню НЧ на поверхні [233]. Останнє може призвести до дегідратації мембрани; зміни її поверхневого натягу; стеричного блокування мембранних білків, включаючи ті, що відповідають за міжклітинні контакти; гіперактивації ендоцитозу, та як наслідок вакуоляризації клітини. Перелічені морфологічні зміни були зафіксовані Saathoff et al. (рис. 5.2.). Автори також зазначають, що ступінь гідроксилування фулеренів впливає на їх агломерацію у середовищі, що, у свою чергу, також впливає на токсичність.

Відповідно, цитотоксичний ефект високих концентрацій досліджуваних в роботі C_n(ОН)₄₀ може бути обумовлений їх накопиченням на клітинній мембрані. Цей же механізм може бути задіяний у противірусному ефекті НЧ відносно вірусу грипу типу А.

Дослідження віруліцидної активності фулеренолів відносно IAV H1N1 демонструють чіткий інактивуючий ефект навіть за 15 хв контакту для концентрацій ≥ 500 мкг/мл. Подібний вплив проявляється і на нове покоління вірусу, що репродукувалось у присутності НЧ. Припущення щодо можливої взаємодії з ліпідним бішаром вірусу (який походить безпосередньо з клітинного),

було перевірене у симуляційному експерименті. Результатом молекулярної динаміки $C_{60}(OH)_{40}$ з фрагментом вірусної оболонки стало утворення водневих зв'язків між гідроксильними групами та головками ліпідів, а також вигинання бішару. Таким чином, одним із можливих механізмів протівірусної дії полігідратованих фулеренів може бути контакт з оболонкою ІАВ, що призводить до дестабілізації віріона.

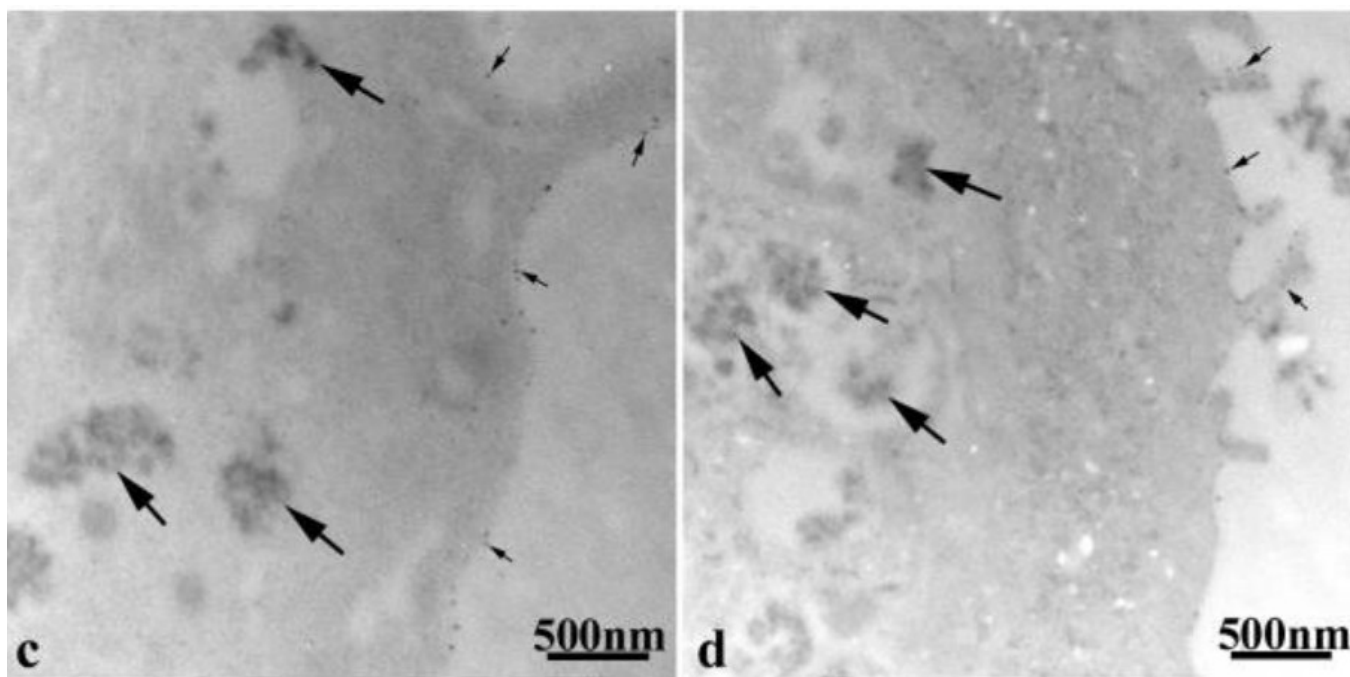


Рисунок 5.2 Мікрофотографії з дослідження Saathoff et al.: TEM клітин НЕК після інкубації з 42,5 мкг/мл (c) $C_{60}(OH)_{24}$ та (d) $C_{60}(OH)_{32}$ протягом 24 годин. Великі стрілки позначають агломерати фулеренулу в цитоплазматичних вакуолях, а малі – фулереноли, прикріплені до клітинної мембрани [233]

Крім інактивуючої дії на позаклітинний вірус, фулереноли продемонстрували вплив на різні етапи його репродукції. За умови внесення препарату у культуру клітин одночасно з вірусом (0 год в.п.і.) спостерігалось виражене пригнічення ЦПД. Тобто антивірусний ефект був присутній під час процесу адсорбції ІАВ. Припускається, що вплив на даний етап може бути обумовлений перекриттям

поверхні клітин за рахунок накопичення на них фулеренолів, а також вищеописаним впливом наноструктур на оболонку вірусу. Обидва ефекти також пояснюються дозозалежністю дії та неповним пригніченням інфекційних титрів.

Опираючись на попередньо описане дослідження динаміки репродукції ІАВ [123], через ≈ 1 год в.п.і. починається процес реплікації, через 5 год в.п.і. – експорт новосинтезованих вРНП, через 6-7 год в.п.і. – масовий вихід віріонів з клітини. Додавання фулеренолів до інфікованих клітин через 1, 5 та 25 год в.п.і. дало змогу оцінити їх противірусний ефект залежно від часу внесення. Як і для більшості вже досліджених протигрипозних препаратів, ефективність фулеренолів залежить від часу застосування. Порівняння SI для різних часових точок вказує на те, що досліджені наноструктури карбону найефективніше впливають на адсорбцію вірусу (0 год в.п.і.), а також на етапі збирання та виходу віріонів (5 год в.п.і.). Останнє може бути обумовлено запобіганням процесу брунькування через взаємодію з мембраною клітини, а також прямим контактом з позаклітинними вірусними частками. При цьому, терапевтична активність фулеренолів через 25 год в.п.і. (що приблизно дорівнює 3-4 циклам реплікації) також залишалась на високому рівні, та характеризувалась найсильнішим впливом на інфекційність нового вірусного покоління. Різниця між ефективністю залежно від часу внесення вказує на те, що вплив фулеренів на позаклітинні віріони може бути навіть більш вираженим ніж на внутрішньоклітинні процеси. В загальному, у всіх випадках дослідження антивірусної активності спостерігали дозозалежну дію з найкращою ефективністю саме за найвищих досліджуваних концентрацій. Цей ефект пояснюється високою гідрофільністю поверхні фулеренолів, що дещо утруднює їхнє проходження крізь мембрану.

Визначення відсутності впливу фулеренолів на активацію захисних систем клітини, корелює з відомими дослідженнями про те, що похідні фулерену мають пригнічувальну дію на продукцію цитокінів за рахунок поглинання ROS [234]. Тому припускається, що механізм впливу на внутрішньоклітинні процеси під час інфекції

може бути пов'язаним із взаємодією з вірусними білками. Більшість похідних фулеренів з антивірусною активністю діють на вірусні ферменти, наприклад, протеаза та зворотна транскриптаза ВІЛ, протеаза та RdRp ВГС, протеаза SARS-CoV-2 та PA субодиниця RdRp вірусу грипу [161, 162]. Таким чином, фулеренове ядро здатне успішно блокувати активний центр ферментів, а у деяких випадках і завдяки негативно зарядженому заміснику на поверхні, що також може бути важливим фактором при взаємодії з полімеразами. За допомогою симуляції молекулярної динаміки ми продемонстрували здатність фулеренола C₆₀ до блокування ділянки на вірусному полімеразному комплексі, що бере участь у взаємодії петлі 5'-промотору РНК з RdRp. Зважаючи на це, не виключено, що одним із механізмів впливу полігідратованих фулеренів на процес репродукції вірусу у клітинах може бути саме взаємодія з полімеразою та блокування транскрипції.

Також в рамках даної роботи було перевірено активність суміші фулеренолів відносно клінічних штамів вірусів грипу. За умови внесення через 1 год в.п.і. фулереноли успішно пригнічували репродукцію IAV H1N1 pdm09 та IBV лінії Вікторія з одночасним впливом на новосинтезований вірус. Зафіксований ефект був навіть вищим, ніж для лабораторного IAV H1N1, а найкращий потенціал фулереноли проявили відносно вірусу грипу типу В. Одним із можливих пояснень отриманої різниці в SI між штамми може бути те, що лабораторні штами вірусів загалом мають вищу швидкість і продуктивність репродукції, ніж клінічні. Відповідно, це може штучно підвищити значення EC₅₀ через швидше виснаження препарату [235]. Тому дослідження фулеренолів на клінічних штаммах потребують подальшого розширення.

Дослідження гострої токсичності суміші фулеренолів на мишах BALB/C загалом вказує на безпечність одноразової дози. Спостереження у зміні кількості формених елементів крові, а саме зниження кількості лейкоцитів, лімфоцитів та гранулоцитів, може бути пов'язано з захопленням НЧ макрофагами, що, разом із здатністю фулеренів пригнічувати вироблення цитокінів, може виражатись у

тимчасовій імуносупресії. Можливим поясненням зниження кількості тромбоцитів можна назвати явище агрегації останніх через взаємодію з НЧ, що було продемонстровано в тому числі і для наноструктур карбону [236]. Варто також зазначити, що на результат аналізу безумовно впливає методологія його проведення. Використаний для дослідження гематологічний аналізатор використовує технологію, що базується на вимірюванні зміни електричного опору при проходженні клітин через отвір між двома електродами. Даний метод має свої недоліки. Зокрема аномальні клітини можуть бути пошкоджені шляхом вакуумного протягування їх через отвір, або ж їхній сигнал може бути розпізнаний неправильно, що призводить до хибної інтерпретації результатів [237]. Зважаючи на те, що суміш фулеренолів продемонструвала можливість до взаємодії з ліпідним бішаром та зміни морфології клітин, отримані показники рівнів формених елементів крові можуть бути пов'язаним з саме цією їх властивістю.

Підсумовуючи, дослідження *in vivo* чітко вказують на відсутність гострої токсичності, проте потребують розширення для визначення особливостей реакції організму на фулереноли.

Враховуючи вищезазначені результати та закономірності, які в них прослідковуються, антивірусний ефект досліджених фулеренолів є комплексним. Зважаючи на це, якщо одним із механізмів дії полігідратованих фулеренів є вплив безпосередньо на віріони, це робить їх вельми привабливими для застосування у якості противірусних агентів. Пропонується розглянути використання фулеренолів у якості інтраназальних спреїв для профілактики грипозної інфекції; інгаляцій через небулайзери для лікування ускладнень; та у якості покриття для медичних масок, респіраторів або HEPA фільтрів. Варто зазначити, що таким способам застосування обов'язково мають передувати детальні дослідження динаміки в організмі та потенційного впливу на легені. Також можна використовувати фулереноли у комбінації з іншими препаратами для більш ефективного лікування тяжких форм інфекцій, що дозволить не тільки активніше боротися з вірусом, але і зменшити

ймовірність його передачі між хворими.

Наступна група наноструктур була представлена НЧ срібла різного діаметру, а саме Ag10 (5-30 нм, більшість 8-10 нм), Ag20 (5-30 нм, більшість 10-20 нм) та Ag50 (5-100 нм, більшість 40-50 нм). Різниця в розмірах була досягнута шляхом зміни температурного режиму: 60°C для Ag10, 40°C для Ag20 та 25°C для Ag50. Детальний процес синтезу та характеристика НЧ була описана авторами Mucha Yu. et al [238]. Вони також зазначають, що зі зменшенням температури, спостерігалось не тільки збільшення середнього розміру НЧ, а і підвищення їхньої схильності до агрегації.

При дослідженні біологічних властивостей, дані НЧ продемонстрували відсутність цитотоксичності на культуру клітин MDCK та противірусний вплив на IAV H1N1 за профілактичною схемою внесення. Інтенсивність прояву антивірусного ефекту корелює з розміром НЧ срібла, адже найбільш активними були Ag10 (>92% пригнічення репродукції IAV) та Ag20 (\approx 75% пригнічення), водночас, вплив найбільших за діаметром Ag50 не перевищував 7%. Окрім відкритої авторами ланцюгоподібної агрегації НЧ великого розміру (рис. 5.3), що значно знижує сумарну площу поверхні, а отже і реактивність, наночастинки великого діаметру загалом дуже слабо проникають у клітину. У випадку ж Ag10 та Ag20, НЧ до 5 нм можуть пасивно проходити крізь мембрану, а до 20 нм успішно проникати за допомогою клатрин- та кавеолін-залежного ендоцитозу. Також, враховуючи, що активною формою срібла є іони Ag⁺, маленькі НЧ швидше вивільняють Ag⁺ за рахунок великої площі поверхні.

Продемонстрований профілактичний ефект малих НЧ корелює з існуючими літературними даними. У кількох роботах було показано, що срібні НЧ призводять до активації ІФН-індукованих генів, зокрема і через взаємодію з toll-подібними рецепторами при потраплянні в клітину шляхом ендоцитозу [239]. Тому, враховуючи це, припускається, що механізм противірусної дії досліджуваних НЧ полягає у індукції неспецифічного клітинного імунітету.

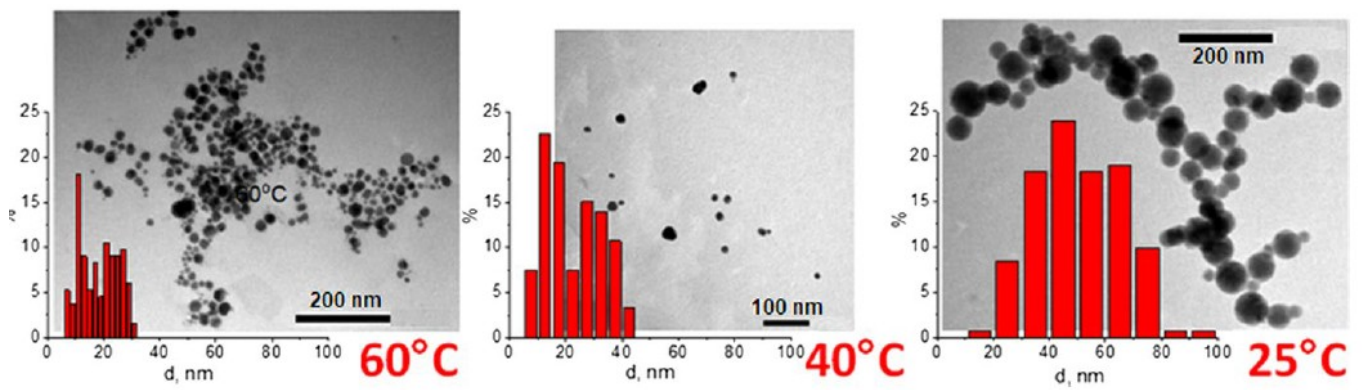


Рисунок 5.3 Мікрофотографії отримані після синтезу НЧ: ТЕМ зображення НЧ срібла, отриманих під дією УФ-опромінення при 60, 40 та 25 °С, та відповідних розподілів розмірів [238]

Крім того, у дослідженнях *in vivo* було продемонстровано, що потрапляння НЧ срібла на слизову оболонку призводило до значної інфільтрації дендритними клітинами та моноцитами після чого спостерігався рекрутинг CD8⁺ Т-клітин, НК-клітин та підвищена експресія ІФН- α , ІФН- γ , CXCL9 та CXCL10 [240]. Також при лікуванні мишей, інфікованих респіраторно-синцитіальним вірусом, у тварин фіксували підвищення рівнів CXCL1, G-CSF та GM-CSF, що узгоджується зі збільшенням рекрутування та активації нейтрофілів у тканині легень [241].

Що ж стосується інших схем дослідження прогрипозної активності – 0 та 1 год в.п.і., відносно низький вплив на репродукцію IAV (<12 % пригнічення) може пояснюватись часом взаємодії НЧ з компонентами клітини.

Отже, зважаючи на вищеописані літературні дані, пропонується розглянути можливість використання наночасток срібла діаметром до 20 нм, отриманих за допомогою триптофан-опосередкованого синтезу у поєднанні з опроміненням ультрафіолетом та різними температурними режимами, в якості профілактичних агентів грипозної інфекції. Застосування подібних наноструктур може бути реалізовано шляхом інтраназальних спреїв та інгаляційних систем, за умови попереднього ретельного дослідження фармакодинаміки.

Наступна група досліджених наноструктур була представлена срібловмісними нанокompозитами на основі поліелектролітного комплексу хітозан-На-карбоксиметилцелюлоза.

Хітозан – це природний полімер, що використовується для створення гелів, плівок, наночастинок та нанокompозитів. Вироби з хітозану є біосумісними, біорозкладними, легкими у створенні та характеризуються низькою токсичністю. НЧ з даного полімеру досліджуються як системи доставки ліків, генів та вакцин. Остання сфера застосування є особливо важливою для вірусології. Було продемонстровано, що вакцини проти вірусів грипу з внутрішньом'язовим введенням не забезпечують вироблення ефективної мукозальної відповіді, тому інтраназальний спосіб застосування вважається більш перспективним. Хітозанові гелі та НЧ характеризуються гарною мукоадгезією, що може забезпечити повільне вивільнення АГ саме навколо слизових оболонок. Успішне використання цієї особливості разом з ад'ювантними властивостями хітозану було продемонстровано *in vivo* на ряді вакцин проти штамів H5N1 та H1N1. Ба більше, інтраназальне введення вакцини на основі гідрогелю сприяло утворенню резидентних CD8⁺ Т-клітин пам'яті в тканинах носа [242].

Поєднання хітозану з натрієвою сіллю карбоксиметилцелюлози призводить до утворення поліелектролітного комплексу з покращеними властивостями. Такі комплекси є перспективними для відновлення та стабілізації наночастинок срібла. З точки зору хімічної структури, вони характеризуються високою концентрацією реакційноздатних гідроксильних груп та груп, здатних до донорно-акцепторної взаємодії та утворення водневих зв'язків. Крім того, вони мають високу біологічну активність та є нетоксичними та біорозкладними [195]. Використання подібних комплексів відносять до способу «зеленого» синтезу НЧ, основною властивістю якого є використання компонентів природного походження для зменшення впливу на навколишнє середовище. Зелений синтез може залучати екстракти рослин, бактерії, дріжджі, водорості тощо, тим самим зменшуючи токсичний вплив

притаманний методам хімічного синтезу, де у якості відновників можуть використовувати, до прикладу, гідрозин.

Срібловмісні композити досліджені в рамках даної роботи були отримані саме методом зеленого синтезу з використанням екстрактів зеленого чаю (ЗЧ), кореневища імбиру (Імб) та прополісу (Пр). Залежно від екстракту у складі композитів було отримано НЧ Ag/Ag₂O різного діаметру: в середньому 11 нм для ХНММ –Na-КМЦ–Ag-ЗЧ, 20 нм для ХНММ –Na-КМЦ–Ag-Імб, і 44 нм для ХНММ –Na-КМЦ–Ag-Пр (рис.5.4).

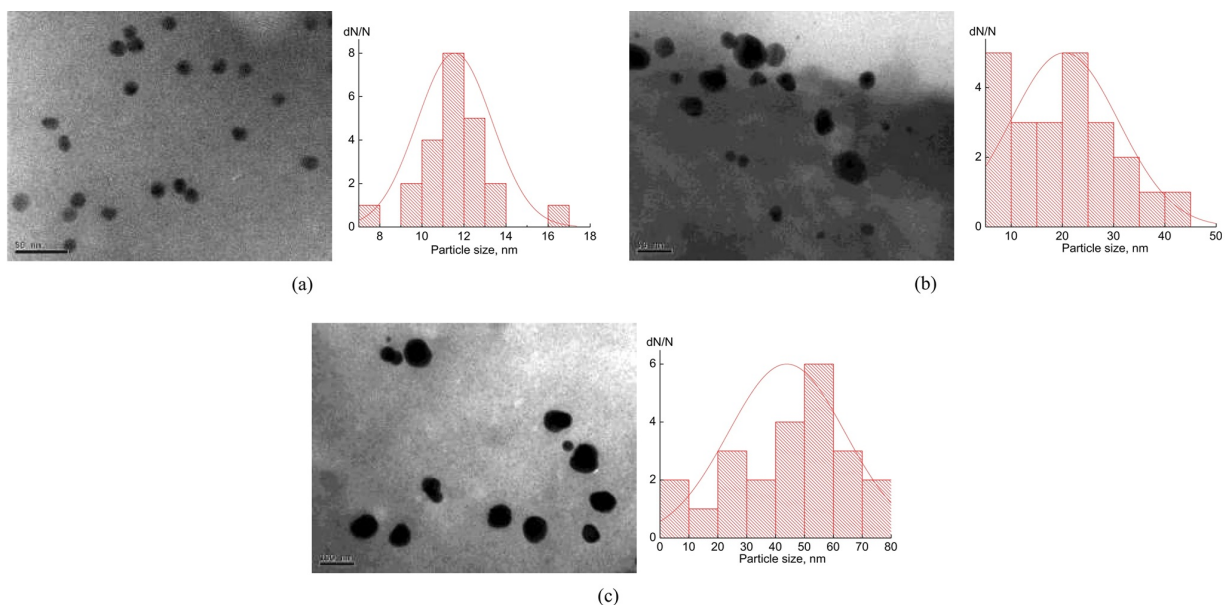


Рисунок 5.4 Мікрофотографії отримані після синтезу срібловмісних композитів на основі ХНММ–Na-КМЦ: ТЕМ зразків (а) ХНММ –Na-КМЦ–Ag-ЗЧ; (b) ХНММ –Na-КМЦ–Ag-Імб; (c) ХНММ –Na-КМЦ–Ag-Пр [195]

Перелічені композити, разом з їх аналогами без НЧ срібла та окремими компонентами (ХНММ, Na-КМЦ та ХНММ–Na-КМЦ), були досліджені на здатність до інактивації вірусу грипу при безпосередньому контакті.

Шляхом інкубації нанокompозитів з вірусною суспензією протягом 1 год було продемонстровано, що ХНММ, Na-КМЦ та ХНММ–Na-КМЦ не впливають на

інфекційність вірусу грипу (зменшення ТЦД₅₀/мл на ≤ 1 порядку). Отримані дані загалом корелюють з іншими роботами по дослідженню наноструктур хітозану відносно IAV, де також було зафіксовано відсутність активності чистого полімеру [243].

Серед композитів ХНММ–Na-КМЦ без срібла, отриманих з використанням рослинних екстрактів, зниження інфекційного титру на ≈ 2 lg спостерігається тільки для ХНММ–Na-КМЦ–Пр. Загалом, полімери з екстрактом прополісу єдині продемонстрували цитотоксичний вплив на культуру MDCK, хоча і лише в нерозведеному вигляді. Також для срібловмісного ХНММ–Na-КМЦ–Ag–Пр зменшення титру IAV спостерігали з тою самою ефективністю у ≈ 2 lg. Тому з високою ймовірністю ефект обох композитів з прополісом обумовлений саме залишками екстракту. Адже прополіс, як багатоконпонентна суміш, багата на флавоноїди, ензими, ефірні олії та ароматичні кислоти, проявляє досить широкий спектр біологічної активності, включаючи противірусну [244].

Серед решти досліджуваних срібловмісних композитів ХНММ–Na-КМЦ–Ag–Імб продемонстрував невисокий вплив на IAV H1N1: значення ТЦД₅₀/мл було на ≈ 2 порядків менше відносно KB. В даному випадку ефект може бути обумовлений присутністю НЧ срібла, а його обмеженням є саме розмір наночастинок (рис. 5.4).

Найкращий противірусний ефект показав срібловмісний композит з додаванням екстракту зеленого чаю. ХНММ–Na-КМЦ–Ag–ЗЧ повністю інактивував IAV H1N1 навіть при повторному використанні, водночас не проявляючи цитотоксичного впливу на культуру клітин MDCK. Відповідно до рекомендацій Агентства з охорони навколишнього середовища США (EPA), агент може вважатися придатним для використання у якості дезінфектанту за умови зниження інфекційного титру вірусу на ≥ 3 lg [245]. В даному випадку зниження ТЦД₅₀/мл становило 8,9 lg при первинному застосуванні, і 6,8 lg при вторинному через 14 днів. Різниця у 2 lg пов'язана виключно з KB. Отже, полімерна плівка ХНММ–Na-КМЦ–Ag–ЗЧ володіє чіткими віруліцидними властивостями відносно IAV H1N1 за

рахунок наявності НЧ срібла з середнім діаметром 11 нм.

Продемонстрована активність відкриває потенціал дослідженого нанокompозиту для застосування у медицині в якості пов'язок на рани чи опіки. Гідрогелеві пов'язки були давно запропоновані як альтернатива тканинним. Основна їхня перевага полягає в тому, що вони можуть підтримувати вологе середовище для рани та оточуючої шкіри, що сприяє швидшому загоєнню. Для хітозану також було відкрито гемостатичні властивості, що є надзвичайно важливим при наданні першої медичної допомоги. Гідрогелеві пов'язки на основі хітозану активно досліджуються і наприклад, Pandian et al. продемонстрували самовідновлювальні, антибактеріальні та антибіоплівкові властивості гелів на основі N, O-карбоксиметилхітозану та НЧ срібла [246]. В рамках визначення активності досліджених тут композитів, проте за межами даної роботи, було також продемонстровано їхню активність у пригніченні росту *S. aureus* та *E. Coli* та зниженні інфекційного титру ВПГ-1 [195]. Тому пропонується продовжити розробку ХНММ–Na–КМЦ–Ag–ЗЧ у якості гідрогелевої пов'язки для використання при ушкодженнях шкіри.

Крім того, як ще один спосіб застосування срібловмісних нанополімерів на прикладі ХНММ–Na–КМЦ–Ag–ЗЧ, можна розглянути покриття медичних масок та респіраторів. Це надасть засобам індивідуального захисту самодезінфікуючих властивостей та дозволить ефективніше запобігати поширенню вірусів, що передаються повітряно-крапельним шляхом. Наразі цей напрям активно розвивається, проте впровадження подібного застосування потребує специфічних інженерних рішень для забезпечення повітропроникності масок. Водночас, значні досягнення у покритті нетканого поліпропілену хітозаном та НЧ срібла вже були продемонстровані у галузі очистки води [247]. Тому це дає надію на можливість швидкого впровадження таких технологій.

ВИСНОВКИ

1. Ідентифіковано 13 агентів ефективних відносно вірусу грипу типу А Н1N1 серед синтетичних органічних сполук та наноструктур. Доведено селективність їхньої дії за рахунок протигрипозної активності в діапазоні нетоксичних для клітин концентрацій.

2. Доведено спорідненість нових активних сполук з груп β -N-бензотіазоліл глікозидів, [1,2,6]тіадіазино-[2,3a]бензimidазолів та тіонуклеозидів до вірусної РНК полімерази. Розкрито критичну роль атомів флуору в складі молекул для прояву противірусного ефекту.

3. Вперше визначено комплексний антивірусний ефект суміші фулеренолів на різні етапи життєвого циклу вірусу грипу типу А. Доказано роль гідроксильних груп фулеренолу C₆₀ в утворенні комплексів з фрагментом ліпідної оболонки вірусу та РНК полімеразою.

4. Виявлено відсутність гострої токсичності на моделі мишей BALB/C суміші фулеренолів.

5. Встановлено вищу ефективність суміші фулеренолів у пригніченні реплікації клінічних штамів Н1N1 pdm09 та вірусу грипу типу В лінії Вікторія, порівняно з лабораторним штамом Н1N1.

6. Сформовано бібліотеку високоселективних кандидатів у протигрипозні препарати, що включає 5 хітів (10S-45, 10S-46, 1796, 1870 10S-47), один лід – 10S-48, суміш фулеренолів, НЧ срібла діаметром <20 нм та срібловмісний наноккомпозит на основі ХНММ-Na-КМЦ-Зч.

7. Систематизовано механізми протигрипозного впливу активних агентів різних класів: досліджувані органічні сполуки впливають на етап реплікації вірусу грипу, в той час як наноструктури переважно блокують адсорбцію, брунькування, та забезпечують інактивацію позаклітинних віріонів.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. WHO. Influenza (seasonal). [Accessed on 2 March 2026]. Available at: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
2. Putri, W. C. W. S., Muscatello, D. J., Stockwell, M. S., & Newall, A. T. (2018). Economic burden of seasonal influenza in the United States. *Vaccine*, 36(27), 3960–3966. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.057>.
3. CDC. CDC recommends against the use of amantadine and rimantadine for the treatment or prophylaxis of influenza in the United States during the 2005-06 influenza season. [Accessed on 15 November 2025]. Available at: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/25151>
4. ICTV. Current ICTV Taxonomy Release. [Accessed on 12 January 2024]. Available at: <https://ictv.global/taxonomy>.
5. Vijayakrishnan, S., Loney, C., Jackson, D., Suphamungmee, W., Rixon, F.J., and Bhella, D. (2013). Cryotomography of Budding Influenza A Virus Reveals Filaments with Diverse Morphologies that Mostly Do Not Bear a Genome at Their Distal End. *PLOS Pathogens* 9, e1003413. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003413>.
6. Patel, M., Dennis, A., Flutter, C., & Khan, Z. (2010). Pandemic (H1N1) 2009 influenza. *British journal of anaesthesia*, 104(2), 128–142. <https://doi.org/10.1093/bja/aep375>.
7. Gamblin, S.J., Vachieri, S.G., Xiong, X., Zhang, J., Martin, S.R., and Skehel, J.J. (2021). Hemagglutinin Structure and Activities. *Cold Spring Harb Perspect Med* 11, a038638. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038638>.
8. Russell, R.J., Haire, L.F., Stevens, D.J., Collins, P.J., Lin, Y.P., Blackburn, G.M., Hay, A.J., Gamblin, S.J., and Skehel, J.J. (2006). The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature* 443, 45–49. <https://doi.org/10.1038/nature05114>.
9. Amaro, R.E., Swift, R.V., Votapka, L., Li, W.W., Walker, R.C., and Bush, R.M.

- (2011). Mechanism of 150-cavity formation in influenza neuraminidase. *Nat Commun* 2, 388. <https://doi.org/10.1038/ncomms1390>.
10. Maruyama, J., Nao, N., Miyamoto, H., Maeda, K., Ogawa, H., Yoshida, R., Igarashi, M., and Takada, A. (2016). Characterization of the glycoproteins of bat-derived influenza viruses. *Virology* 488, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.11.002>.
 11. Rejmanek, D., Hosseini, P.R., Mazet, J.A.K., Daszak, P., and Goldstein, T. (2015). Evolutionary Dynamics and Global Diversity of Influenza A Virus. *J Virol* 89, 10993–11001. <https://doi.org/10.1128/JVI.01573-15>.
 12. Morens, D.M., Taubenberger, J.K., and Fauci, A.S. (2009). The Persistent Legacy of the 1918 Influenza Virus. *New England Journal of Medicine* 361, 225–229. <https://doi.org/10.1056/NEJMp0904819>.
 13. Nayak, D.P., and Barman, S. (2002). Role of lipid rafts in virus assembly and budding. *Adv Virus Res* 58, 1–28. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(02\)58001-5](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(02)58001-5).
 14. Sun, X., and Whittaker, G.R. (2003). Role for Influenza Virus Envelope Cholesterol in Virus Entry and Infection. *Journal of Virology* 77, 12543–12551. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.23.12543-12551.2003>.
 15. Gerl, M.J., Sampaio, J.L., Urban, S., Kalvodova, L., Verbavatz, J.-M., Binnington, B., Lindemann, D., Lingwood, C.A., Shevchenko, A., Schroeder, C., et al. (2012). Quantitative analysis of the lipidomes of the influenza virus envelope and MDCK cell apical membrane. *J Cell Biol* 196, 213–221. <https://doi.org/10.1083/jcb.201108175>.
 16. McAuley, J.L., Gilbertson, B.P., Trifkovic, S., Brown, L.E., and McKimm-Breschkin, J.L. (2019). Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Front Microbiol* 10, 39. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00039>.
 17. Kumari, R., Sharma, S.D., Kumar, A., Ende, Z., Mishina, M., Wang, Y., Falls, Z., Samudrala, R., Pohl, J., Knight, P.R., et al. Antiviral Approaches against Influenza Virus. *Clin Microbiol Rev* 36, e00040-22. <https://doi.org/10.1128/cmr.00040-22>.
 18. Boonstra, S., Blijleven, J.S., Roos, W.H., Onck, P.R., Giessen, E. van der, and Oijen, A.M. van (2018). Hemagglutinin-Mediated Membrane Fusion: A Biophysical Perspective.

Annual Review of Biophysics 47, 153–173. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070317-033018>.

19. Moin, S.M., Boyington, J.C., Boyoglu-Barnum, S., Gillespie, R.A., Cerutti, G., Cheung, C.S.-F., Cagigi, A., Gallagher, J.R., Brand, J., Prabhakaran, M., et al. (2022). Co-immunization with hemagglutinin stem immunogens elicits cross-group neutralizing antibodies and broad protection against influenza A viruses. *Immunity* 55, 2405-2418.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.10.015>.

20. Benton, D.J., Nans, A., Calder, L.J., Turner, J., Neu, U., Lin, Y.P., Ketelaars, E., Kallewaard, N.L., Corti, D., Lanzavecchia, A., et al. (2018). Influenza hemagglutinin membrane anchor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, 10112–10117. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810927115>.

21. Harrison, S.C. (2015). Viral membrane fusion. *Virology* 479–480, 498–507. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.043>.

22. Harris, A., Cardone, G., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Brecher, M., White, J.M., and Steven, A.C. (2006). Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 19123–19127. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607614103>.

23. Takashita, E., Kiso, M., Fujisaki, S., Yokoyama, M., Nakamura, K., Shirakura, M., Sato, H., Odagiri, T., Kawaoka, Y., Tashiro, M., et al. (2015). Characterization of a Large Cluster of Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses Cross-Resistant to Oseltamivir and Peramivir during the 2013-2014 Influenza Season in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59, 2607–2617. <https://doi.org/10.1128/aac.04836-14>.

24. Air, G.M. (2012). Influenza neuraminidase. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 6, 245–256. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00304.x>.

25. Durrant, J.D., Bush, R.M., and Amaro, R.E. (2016). Microsecond Molecular Dynamics Simulations of Influenza Neuraminidase Suggest a Mechanism for the Increased Virulence of Stalk-Deletion Mutants. *J. Phys. Chem. B* 120, 8590–8599. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b02655>.

26. Ernst, A.M., Zacherl, S., Herrmann, A., Hacke, M., Nickel, W., Wieland, F.T., and Brügger, B. (2013). Differential transport of Influenza A neuraminidase signal anchor peptides to the plasma membrane. *FEBS Letters* 587, 1411–1417. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.03.019>.
27. Barman, S., Adhikary, L., Chakrabarti, A.K., Bernas, C., Kawaoka, Y., and Nayak, D.P. (2004). Role of Transmembrane Domain and Cytoplasmic Tail Amino Acid Sequences of Influenza A Virus Neuraminidase in Raft Association and Virus Budding. *Journal of Virology* 78, 5258–5269. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.10.5258-5269.2004>.
28. Sakaguchi, T., Leser, G.P., and Lamb, R.A. (1996). The ion channel activity of the influenza virus M2 protein affects transport through the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 133, 733–747. <https://doi.org/10.1083/jcb.133.4.733>.
29. Mtambo, S.E., Amoako, D.G., Somboro, A.M., Agoni, C., Lawal, M.M., Gumede, N.S., Khan, R.B., and Kumalo, H.M. (2021). Influenza Viruses: Harnessing the Crucial Role of the M2 Ion-Channel and Neuraminidase toward Inhibitor Design. *Molecules* 26, 880. <https://doi.org/10.3390/molecules26040880>.
30. Thomaston, J.L., Woldeyes, R.A., Nakane, T., Yamashita, A., Tanaka, T., Koiwai, K., Brewster, A.S., Barad, B.A., Chen, Y., Lemmin, T., et al. (2017). XFEL structures of the influenza M2 proton channel: Room temperature water networks and insights into proton conduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, 13357–13362. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705624114>.
31. Acharya, R., Carnevale, V., Fiorin, G., Levine, B.G., Polishchuk, A.L., Balannik, V., Samish, I., Lamb, R.A., Pinto, L.H., DeGrado, W.F., et al. (2010). Structure and mechanism of proton transport through the transmembrane tetrameric M2 protein bundle of the influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 15075–15080. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007071107>.
32. Deng, L., Cho, K.J., Fiers, W., and Saelens, X. (2015). M2e-Based Universal Influenza A Vaccines. *Vaccines* 3, 105–136. <https://doi.org/10.3390/vaccines3010105>.
33. Lin, L., Wang, X., Chen, Z., Deng, T., Yan, Y., Dong, W., Huang, Y., and Zhou, J.

- (2023). TRIM21 restricts influenza A virus replication by ubiquitination-dependent degradation of M1. *PLOS Pathogens* 19, e1011472. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011472>.
34. Selzer, L., Su, Z., Pintilie, G.D., Chiu, W., and Kirkegaard, K. (2020). Full-length three-dimensional structure of the influenza A virus M1 protein and its organization into a matrix layer. *PLOS Biology* 18, e3000827. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000827>.
35. Peukes, J., Xiong, X., Erlendsson, S., Qu, K., Wan, W., Calder, L.J., Schraidt, O., Kummer, S., Freund, S.M.V., Kräusslich, H.-G., et al. (2020). The native structure of the assembled matrix protein 1 of influenza A virus. *Nature* 587, 495–498. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2696-8>.
36. Noda, T., Sugita, Y., Aoyama, K., Hirase, A., Kawakami, E., Miyazawa, A., Sagara, H., and Kawaoka, Y. (2012). Three-dimensional analysis of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus. *Nat Commun* 3, 639. <https://doi.org/10.1038/ncomms1647>.
37. Ferhadian, D., Contrant, M., Printz-Schweigert, A., Smyth, R.P., Paillart, J.-C., and Marquet, R. (2018). Structural and Functional Motifs in Influenza Virus RNAs. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00559>.
38. Jakob, C., Paul-Stansilaus, R., Schwemmle, M., Marquet, R., and Bolte, H. (2022). The influenza A virus genome packaging network — complex, flexible and yet unsolved. *Nucleic Acids Res* 50, 9023–9038. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac688>.
39. Turrell, L., Lyall, J.W., Tiley, L.S., Fodor, E., and Vreede, F.T. (2013). The role and assembly mechanism of nucleoprotein in influenza A virus ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun* 4, 1591. <https://doi.org/10.1038/ncomms2589>.
40. Einfeld, A.J., Neumann, G., and Kawaoka, Y. (2015). At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nat Rev Microbiol* 13, 28–41. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3367>.
41. Mondal, A., Dawson, A.R., Potts, G.K., Freiburger, E.C., Baker, S.F., Moser, L.A., Bernard, K.A., Coon, J.J., and Mehle, A. (2017). Influenza virus recruits host protein kinase C to control assembly and activity of its replication machinery. *eLife* 6, e26910. <https://doi.org/10.7554/eLife.26910>.

42. Zhang, B., Xu, S., Liu, M., Wei, Y., Wang, Q., Shen, W., Lei, C.-Q., and Zhu, Q. (2023). The nucleoprotein of influenza A virus inhibits the innate immune response by inducing mitophagy. *Autophagy* 19, 1916–1933. <https://doi.org/10.1080/15548627.2022.2162798>.
43. Zhou, A., Zhang, W., Dong, X., Liu, M., Chen, H., and Tang, B. (2022). The battle for autophagy between host and influenza A virus. *Virulence* 13, 46–59. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2014680>.
44. Fan, H., Walker, A.P., Carrique, L., Keown, J.R., Serna Martin, I., Karia, D., Sharps, J., Hengrung, N., Pardon, E., Steyaert, J., et al. (2019). Structures of influenza A virus RNA polymerase offer insight into viral genome replication. *Nature* 573, 287–290. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1530-7>.
45. te Velthuis, A.J.W., Robb, N.C., Kapanidis, A.N., and Fodor, E. (2016). The role of the priming loop in influenza A virus RNA synthesis. *Nat Microbiol* 1, 16029. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.29>.
46. te Velthuis, A.J.W., and Fodor, E. (2016). Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nat Rev Microbiol* 14, 479–493. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.87>.
47. Fodor, E., and te Velthuis, A.J.W. (2020). Structure and Function of the Influenza Virus Transcription and Replication Machinery. *Cold Spring Harb Perspect Med* 10, a038398. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038398>.
48. Fodor, E. (2013). The RNA polymerase of influenza A virus: mechanisms of viral transcription and replication. *av* 57, 113–122. https://doi.org/10.4149/av_2013_02_113.
49. Peng, Q., Liu, Y., Peng, R., Wang, M., Yang, W., Song, H., Chen, Y., Liu, S., Han, M., Zhang, X., et al. (2019). Structural insight into RNA synthesis by influenza D polymerase. *Nat Microbiol* 4, 1750–1759. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0487-5>.
50. Hao, W., Wang, L., and Li, S. (2020). Roles of the Non-Structural Proteins of Influenza A Virus. *Pathogens* 9, 812. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100812>.

51. Jagger, B.W., Wise, H.M., Kash, J.C., Walters, K.-A., Wills, N.M., Xiao, Y.-L., Dunfee, R.L., Schwartzman, L.M., Ozinsky, A., Bell, G.L., et al. (2012). An Overlapping Protein-Coding Region in Influenza A Virus Segment 3 Modulates the Host Response. *Science* 337, 199–204. <https://doi.org/10.1126/science.1222213>.
52. Rajsbaum, R., Albrecht, R.A., Wang, M.K., Maharaj, N.P., Versteeg, G.A., Nistal-Villán, E., García-Sastre, A., and Gack, M.U. (2012). Species-Specific Inhibition of RIG-I Ubiquitination and IFN Induction by the Influenza A Virus NS1 Protein. *PLOS Pathogens* 8, e1003059. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003059>.
53. Gao, S., Song, L., Li, J., Zhang, Z., Peng, H., Jiang, W., Wang, Q., Kang, T., Chen, S., and Huang, W. (2012). Influenza A virus-encoded NS1 virulence factor protein inhibits innate immune response by targeting IKK. *Cell Microbiol* 14, 1849–1866. <https://doi.org/10.1111/cmi.12005>.
54. Krug, R.M. (2015). Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense. *Current Opinion in Virology* 12, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.01.007>.
55. Min, J.-Y., Li, S., Sen, G.C., and Krug, R.M. (2007). A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. *Virology* 363, 236–243. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.01.038>.
56. Rodriguez, L., Nogales, A., Iqbal, M., Perez, D.R., and Martinez-Sobrido, L. (2018). Identification of Amino Acid Residues Responsible for Inhibition of Host Gene Expression by Influenza A H9N2 NS1 Targeting of CPSF30. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02546>.
57. Wacquiez, A., Coste, F., Kut, E., Gaudon, V., Trapp, S., Castaing, B., and Marc, D. (2020). Structure and Sequence Determinants Governing the Interactions of RNAs with Influenza A Virus Non-Structural Protein NS1. *Viruses* 12, 947. <https://doi.org/10.3390/v12090947>.
58. Burgui, I., Aragón, T., Ortín, J., and Nieto, A. (2003). PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *Journal*

- of General Virology 84, 3263–3274. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19487-0>.
59. Chen, G., Liu, C.-H., Zhou, L., and Krug, R.M. (2014). Cellular DDX21 RNA Helicase Inhibits Influenza A Virus Replication but Is Counteracted by the Viral NS1 Protein. *Cell Host & Microbe* 15, 484–493. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.03.002>.
60. Lin, L., Li, Y., Pyo, H.-M., Lu, X., Raman, S.N.T., Liu, Q., Brown, E.G., and Zhou, Y. (2012). Identification of RNA Helicase A as a Cellular Factor That Interacts with Influenza A Virus NS1 Protein and Its Role in the Virus Life Cycle. *Journal of Virology* 86, 1942–1954. <https://doi.org/10.1128/jvi.06362-11>.
61. Ayllon, J., García-Sastre, A., and Hale, B.G. (2012). Influenza A viruses and PI3K: Are there time, place and manner restrictions? *Virulence* 3, 411–414. <https://doi.org/10.4161/viru.20932>.
62. Wang, X., Shen, Y., Qiu, Y., Shi, Z., Shao, D., Chen, P., Tong, G., and Ma, Z. (2010). The non-structural (NS1) protein of influenza A virus associates with p53 and inhibits p53-mediated transcriptional activity and apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 395, 141–145. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.160>.
63. Heui Seo, S., Hoffmann, E., and Webster, R.G. (2002). Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med* 8, 950–954. <https://doi.org/10.1038/nm757>.
64. Jackson, D., Hossain, Md.J., Hickman, D., Perez, D.R., and Lamb, R.A. (2008). A new influenza virus virulence determinant: The NS1 protein four C-terminal residues modulate pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 4381–4386. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800482105>.
65. Liu, Y.-C., Liao, G.-R., Tsai, A.Y., Tseng, C.-Y., Kuan, C.-Y., Tsai, R.-S., Albrecht, R.A., Kuo, R.-L., Cheng, I.-C., Liang, W.-T., et al. (2023). NS2 is a key determinant of compatibility in reassortant avian influenza virus with heterologous H7N9-derived NS segment. *Virus Research* 324, 199028. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.199028>.
66. Paterson, D., and Fodor, E. (2012). Emerging Roles for the Influenza A Virus Nuclear Export Protein (NEP). *PLOS Pathogens* 8, e1003019.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003019>.

67. Huang, S., Chen, J., Chen, Q., Wang, H., Yao, Y., Chen, J., and Chen, Z. (2013). A Second CRM1-Dependent Nuclear Export Signal in the Influenza A Virus NS2 Protein Contributes to the Nuclear Export of Viral Ribonucleoproteins. *Journal of Virology* 87, 767–778. <https://doi.org/10.1128/jvi.06519-11>.

68. Gorai, T., Goto, H., Noda, T., Watanabe, T., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Takano, R., Neumann, G., Watanabe, S., and Kawaoka, Y. (2012). F1Fo-ATPase, F-type proton-translocating ATPase, at the plasma membrane is critical for efficient influenza virus budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 4615–4620. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114728109>.

69. Zhang, L., Shao, Y., Wang, Y., Yang, Q., Guo, J., Gao, G.F., and Deng, T. (2023). Twenty natural amino acid substitution screening at the last residue 121 of influenza A virus NS2 protein reveals the critical role of NS2 in promoting virus genome replication by coordinating with viral polymerase. *Journal of Virology* 98, e01166-23. <https://doi.org/10.1128/jvi.01166-23>.

70. Sun, J., Kuai, L., Zhang, L., Xie, Y., Zhang, Y., Li, Y., Peng, Q., Shao, Y., Yang, Q., Tian, W.-X., et al. (2024). NS2 induces an influenza A RNA polymerase hexamer and acts as a transcription to replication switch. *EMBO reports* 25, 4708–4727. <https://doi.org/10.1038/s44319-024-00208-4>.

71. Hohensee, L., Scheibner, D., Schäfer, A., Shelton, H., Mettenleiter, T.C., Breithaupt, A., Dorhoi, A., Abdelwhab, E.M., and Blohm, U. (2024). The role of PB1-F2 in adaptation of high pathogenicity avian influenza virus H7N7 in chickens. *Veterinary Research* 55, 5. <https://doi.org/10.1186/s13567-023-01257-8>.

72. Wang, R., Zhu, Y., Ren, C., Yang, S., Tian, S., Chen, H., Jin, M., and Zhou, H. (2021). Influenza A virus protein PB1-F2 impairs innate immunity by inducing mitophagy. *Autophagy* 17, 496–511. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1725375>.

73. Yoshizumi, T., Ichinohe, T., Sasaki, O., Otera, H., Kawabata, S., Mihara, K., and Koshihara, T. (2014). Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via

- Tom40 channels and impairs innate immunity. *Nat Commun* 5, 4713. <https://doi.org/10.1038/ncomms5713>.
74. Leymarie, O., Meyer, L., Tafforeau, L., Lotteau, V., Costa, B.D., Delmas, B., Chevalier, C., and Le Goffic, R. (2017). Influenza virus protein PB1-F2 interacts with CALCOCO2 (NDP52) to modulate innate immune response. *Journal of General Virology* 98, 1196–1208. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000782>.
75. Reis, A.L., and McCauley, J.W. (2013). The Influenza Virus Protein PB1-F2 Interacts with IKK β and Modulates NF- κ B Signalling. *PLOS ONE* 8, e63852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063852>.
76. Vidy, A., Maisonnasse, P., Costa, B.D., Delmas, B., Chevalier, C., and Goffic, R.L. (2016). The Influenza Virus Protein PB1-F2 Increases Viral Pathogenesis through Neutrophil Recruitment and NK Cells Inhibition. *PLOS ONE* 11, e0165361. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165361>.
77. Conenello, G.M., Zamarin, D., Perrone, L.A., Tumpey, T., and Palese, P. (2007). A Single Mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 Influenza A Viruses Contributes to Increased Virulence. *PLOS Pathogens* 3, e141. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030141>.
78. Varga, Z.T., Grant, A., Manicassamy, B., and Palese, P. (2012). Influenza Virus Protein PB1-F2 Inhibits the Induction of Type I Interferon by Binding to MAVS and Decreasing Mitochondrial Membrane Potential. *Journal of Virology* 86, 8359–8366. <https://doi.org/10.1128/jvi.01122-12>.
79. Zhang, X., Tao, Y., Wu, L., Shu, J., He, Y., and Feng, H. (2025). PA and PA-X: two key proteins from segment 3 of the influenza viruses. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1560250>.
80. Desmet, E.A., Bussey, K.A., Stone, R., and Takimoto, T. (2013). Identification of the N-Terminal Domain of the Influenza Virus PA Responsible for the Suppression of Host Protein Synthesis. *Journal of Virology* 87, 3108–3118. <https://doi.org/10.1128/jvi.02826-12>.

81. Gaucherand, L., Porter, B.K., Levene, R.E., Price, E.L., Schmaling, S.K., Rycroft, C.H., Kevorkian, Y., McCormick, C., Khapersky, D.A., and Gaglia, M.M. (2019). The Influenza A Virus Endoribonuclease PA-X Usurps Host mRNA Processing Machinery to Limit Host Gene Expression. *Cell Reports* 27, 776-792.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.063>.
82. Hu, J., Mo, Y., Gao, Z., Wang, X., Gu, M., Liang, Y., Cheng, X., Hu, S., Liu, W., Liu, H., et al. (2016). PA-X-associated early alleviation of the acute lung injury contributes to the attenuation of a highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice. *Med Microbiol Immunol* 205, 381–395. <https://doi.org/10.1007/s00430-016-0461-2>.
83. Rigby, R.E., Wise, H.M., Smith, N., Digard, P., and Rehwinkel, J. (2019). PA-X antagonises MAVS-dependent accumulation of early type I interferon messenger RNAs during influenza A virus infection. *Sci Rep* 9, 7216. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43632-6>.
84. Qin, T., Chen, Y., Huangfu, D., Yin, Y., Miao, X., Yin, Y., Chen, S., Peng, D., and Liu, X. (2022). PA-X protein of H1N1 subtype influenza virus disables the nasal mucosal dendritic cells for strengthening virulence. *Virulence* 13, 1928–1942. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2139474>.
85. König, R., Stertz, S., Zhou, Y., Inoue, A., Hoffmann, H.-H., Bhattacharyya, S., Alamares, J.G., Tscherne, D.M., Ortigoza, M.B., Liang, Y., et al. (2010). Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 463, 813–817. <https://doi.org/10.1038/nature08699>.
86. Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R., and Kawaoka, Y. (2013). Identification of Novel Influenza A Virus Proteins Translated from PA mRNA. *Journal of Virology* 87, 2455–2462. <https://doi.org/10.1128/jvi.02656-12>.
87. Wise, H.M., Hutchinson, E.C., Jagger, B.W., Stuart, A.D., Kang, Z.H., Robb, N., Schwartzman, L.M., Kash, J.C., Fodor, E., Firth, A.E., et al. (2012). Identification of a Novel Splice Variant Form of the Influenza A Virus M2 Ion Channel with an Antigenically Distinct Ectodomain. *PLOS Pathogens* 8, e1002998.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002998>.

88. Selman, M., Dankar, S.K., Forbes, N.E., Jia, J.-J., and Brown, E.G. (2012). Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing. *Emerging Microbes & Infections* 1, 1–10.

<https://doi.org/10.1038/emi.2012.38>.

89. Zhu, X., Yi, Y., Fan, Z., Liu, R., Chu, X., Wang, M., Zhang, J., Tretyakova, E., Zhang, Y., Zhang, L., et al. (2023). Novel mono- and multivalent N-acetylneuraminic acid glycoclusters as potential broad-spectrum entry inhibitors for influenza and coronavirus infection. *European Journal of Medicinal Chemistry* 260, 115723.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115723>.

90. Shao, W., Li, X., Goraya, M.U., Wang, S., and Chen, J.-L. (2017). Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 1650. <https://doi.org/10.3390/ijms18081650>.

91. Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H., and Daniels, R. (2018). Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01581>.

92. Rust, M.J., Lakadamyali, M., Zhang, F., and Zhuang, X. (2004). Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. *Nat Struct Mol Biol* 11, 567–573. <https://doi.org/10.1038/nsmb769>.

93. Kaksonen, M., and Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 313–326. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.132>.

94. Barman, D., and Drolia, R. (2025). Caveolin-Mediated Endocytosis: Bacterial Pathogen Exploitation and Host–Pathogen Interaction. *Cells* 14, 2. <https://doi.org/10.3390/cells14010002>.

95. Rossman, J.S., Leser, G.P., and Lamb, R.A. (2012). Filamentous Influenza Virus Enters Cells via Macropinocytosis. *Journal of Virology* 86, 10950–10960. <https://doi.org/10.1128/jvi.05992-11>.

96. Huotari, J., and Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J* 30, 3481–3500.

<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>.

97. Carter, T., and Iqbal, M. (2024). The Influenza A Virus Replication Cycle: A Comprehensive Review. *Viruses* 16, 316. <https://doi.org/10.3390/v16020316>.
98. To, J., and Torres, J. (2019). Viroporins in the Influenza Virus. *Cells* 8, 654. <https://doi.org/10.3390/cells8070654>.
99. Boulo, S., Akarsu, H., Ruigrok, R.W.H., and Baudin, F. (2007). Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Research* 124, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.09.013>.
100. Chou, Y., Heaton, N.S., Gao, Q., Palese, P., Singer, R.H., and Lionnet, T. (2013). Correction: Colocalization of Different Influenza Viral RNA Segments in the Cytoplasm before Viral Budding as Shown by Single-molecule Sensitivity FISH Analysis. *PLOS Pathogens* 9, 10.1371/annotation/8f53e7f2. <https://doi.org/10.1371/annotation/8f53e7f2-2348-436f-b37e-a883a01e9bbd>.
101. De Vlugt, C., Sikora, D., and Pelchat, M. (2018). Insight into Influenza: A Virus Cap-Snatching. *Viruses* 10, 641. <https://doi.org/10.3390/v10110641>.
102. Li, M., Ramirez, B.C., and Krug, R.M. (1998). RNA-dependent activation of primer RNA production by influenza virus polymerase: different regions of the same protein subunit constitute the two required RNA-binding sites. *The EMBO Journal* 17, 5844–5852. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5844>.
103. Wandzik, J.M., Kouba, T., and Cusack, S. (2021). Structure and Function of Influenza Polymerase. *Cold Spring Harb Perspect Med* 11, a038372. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038372>.
104. Coloma, R., Arranz, R., de la Rosa-Trevín, J.M., Sorzano, C.O.S., Munier, S., Carlero, D., Naffakh, N., Ortín, J., and Martín-Benito, J. (2020). Structural insights into influenza A virus ribonucleoproteins reveal a processive helical track as transcription mechanism. *Nat Microbiol* 5, 727–734. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0675-3>.
105. Wandzik, J.M., Kouba, T., Karuppasamy, M., Pflug, A., Drncova, P., Provaznik, J., Azevedo, N., and Cusack, S. (2020). A Structure-Based Model for the Complete

- Transcription Cycle of Influenza Polymerase. *Cell* 181, 877-893.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.061>.<https://doi.org/10.3390/ijms222111767>.
106. De Magistris, P. (2021). The Great Escape: mRNA Export through the Nuclear Pore Complex. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 11767. <https://doi.org/10.3390/ijms222111767>.
107. Robb, N.C., and Fodor, E. (2012). The accumulation of influenza A virus segment 7 spliced mRNAs is regulated by the NS1 protein. *Journal of General Virology* 93, 113–118. <https://doi.org/10.1099/vir.0.035485-0>.
108. Deng, T., Engelhardt, O.G., Thomas, B., Akoulitchev, A.V., Brownlee, G.G., and Fodor, E. (2006). Role of Ran Binding Protein 5 in Nuclear Import and Assembly of the Influenza Virus RNA Polymerase Complex. *Journal of Virology* 80, 11911–11919. <https://doi.org/10.1128/jvi.01565-06>.
109. Deng, T., Vreede, F.T., and Brownlee, G.G. (2006). Different De Novo Initiation Strategies Are Used by Influenza Virus RNA Polymerase on Its cRNA and Viral RNA Promoters during Viral RNA Replication. *Journal of Virology* 80, 2337–2348. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.5.2337-2348.2006>.
110. Li, H., Wu, Y., Li, M., Guo, L., Gao, Y., Wang, Q., Zhang, J., Lai, Z., Zhang, X., Zhu, L., et al. (2023). An intermediate state allows influenza polymerase to switch smoothly between transcription and replication cycles. *Nat Struct Mol Biol* 30, 1183–1192. <https://doi.org/10.1038/s41594-023-01043-2>.
111. Zhu, Z., Fodor, E., and Keown, J.R. (2023). A structural understanding of influenza virus genome replication. *Trends in Microbiology* 31, 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.09.015>.
112. Carrique, L., Fan, H., Walker, A., Keown, J., Sharps, J., Staller, E., Barclay, W., Fodor, E., and Grimes, J. (2020). Host ANP32A mediates the assembly of the influenza virus replicase. *Nature* 587, 638–643. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2927-z>.
113. Moeller, A., Kirchdoerfer, R.N., Potter, C.S., Carragher, B., and Wilson, I.A. (2012). Organization of the Influenza Virus Replication Machinery. *Science* 338, 1631–1634.

<https://doi.org/10.1126/science.1227270>.

114. Brunotte, L., Flies, J., Bolte, H., Reuther, P., Vreede, F., and Schwemmle, M. (2014). The Nuclear Export Protein of H5N1 Influenza A Viruses Recruits Matrix 1 (M1) Protein to the Viral Ribonucleoprotein to Mediate Nuclear Export. *Journal of Biological Chemistry* 289, 20067–20077. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.569178>.

115. Chase, G.P., Rameix-Welti, M.-A., Zvirbliene, A., Zvirblis, G., Götz, V., Wolff, T., Naffakh, N., and Schwemmle, M. (2011). Influenza Virus Ribonucleoprotein Complexes Gain Preferential Access to Cellular Export Machinery through Chromatin Targeting. *PLOS Pathogens* 7, e1002187. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002187>.

116. Veler, H., Fan, H., Keown, J.R., Sharps, J., Fournier, M., Grimes, J.M., and Fodor, E. (2022). The C-Terminal Domains of the PB2 Subunit of the Influenza A Virus RNA Polymerase Directly Interact with Cellular GTPase Rab11a. *Journal of Virology* 96, e01979-21. <https://doi.org/10.1128/jvi.01979-21>.

117. Li, X., and DiFiglia, M. (2012). The recycling endosome and its role in neurological disorders. *Progress in Neurobiology* 97, 127–141. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.10.002>.

118. Amorim, M.J. (2019). A Comprehensive Review on the Interaction Between the Host GTPase Rab11 and Influenza A Virus. *Front. Cell Dev. Biol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00176>.

119. de Castro Martin, I.F., Fournier, G., Sachse, M., Pizarro-Cerda, J., Risco, C., and Naffakh, N. (2017). Influenza virus genome reaches the plasma membrane via a modified endoplasmic reticulum and Rab11-dependent vesicles. *Nat Commun* 8, 1396. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01557-6>.

120. Hutagalung, A.H., and Novick, P.J. (2011). Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiological Reviews* 91, 119–149. <https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2009>.

121. Rossman, J.S., and Lamb, R.A. (2011). Influenza virus assembly and budding. *Virology* 411, 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.12.003>.

122. Rossman, J.S., Jing, X., Leser, G.P., and Lamb, R.A. (2010). Influenza Virus M2 Protein Mediates ESCRT-Independent Membrane Scission. *Cell* 142, 902–913. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.029>.
123. Dou, D., Hernández-Neuta, I., Wang, H., Östbye, H., Qian, X., Thiele, S., Resa-Infante, P., Kouassi, N.M., Sender, V., Hentrich, K., et al. (2017). Analysis of IAV Replication and Co-infection Dynamics by a Versatile RNA Viral Genome Labeling Method. *Cell Reports* 20, 251–263. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.021>.
124. Writing Committee of the WHO Consultation on Clinical Aspects of Pandemic (H1N1) 2009 Influenza. (2010). Clinical Aspects of Pandemic 2009 Influenza A (H1N1) Virus Infection. *N Engl J Med*, 362, 1708-1719. <https://doi.org/10.1056/nejmra1000449>.
125. Dawood, F.S., Iuliano, A.D., Reed, C., Meltzer, M.I., Shay, D.K., Cheng, P.-Y., Bandaranayake, D., Breiman, R.F., Brooks, W.A., Buchy, P., et al. (2012). Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *The Lancet Infectious Diseases* 12, 687–695. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70121-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70121-4).
126. Cozza, V., Campbell, H., Chang, H.H., Iuliano, A.D., Paget, J., Patel, N.N., Reiner, R.C., Troeger, C., Viboud, C., Bresee, J.S., et al. (2021). Global Seasonal Influenza Mortality Estimates: A Comparison of 3 Different Approaches. *Am J Epidemiol* 190, 718–727. <https://doi.org/10.1093/aje/kwaa196>.
127. Hong, M., and DeGrado, W.F. (2008). Structural basis for proton conduction and inhibition by the influenza M2 protein. *Nature* 451, 596–599. <https://doi.org/10.1038/nature06528>.
128. Deyde, V.M., Xu, X., Bright, R.A., Shaw, M., Smith, C.B., Zhang, Y., Shu, Y., Gubareva, L.V., Cox, N.J., and Klimov, A.I. (2007). Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J Infect Dis* 196, 249–257. <https://doi.org/10.1086/518936>.
129. Świerczyńska, M., Mirowska-Guzel, D.M., and Pindelska, E. (2022). Antiviral Drugs in Influenza. *Int J Environ Res Public Health* 19, 3018.

<https://doi.org/10.3390/ijerph19053018>.

130. Bassetti, M., Castaldo, N., and Canelutti, A. (2019). Neuraminidase inhibitors as a strategy for influenza treatment: pros, cons and future perspectives. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 20, 1711–1718. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1626824>.

131. EMA. Tamiflu Summary of Product Characteristic. [Accessed on 13 October 2025]. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tamiflu-epar-product-information_en.pdf.

132. Alame, M.M., Massaad, E., and Zaraket, H. (2016). Peramivir: A Novel Intravenous Neuraminidase Inhibitor for Treatment of Acute Influenza Infections. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00450>.

133. Nakano, T., Yamaguchi, H., Chiba, T., Shiosakai, K., Chikada, S., and Matsuoka, Y. (2021). The safety and efficacy of the long-acting neuraminidase inhibitor laninamivir octanoate hydrate for Inhalation Suspension Set in children under the age of 5 in a post-marketing surveillance. *Journal of Infection and Chemotherapy* 27, 1436–1446. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2021.06.004>.

134. Hussain, S., Meijer, A., Govorkova, E.A., Dapat, C., Gubareva, L.V., Barr, I.G., Brown, S.K., Daniels, R.S., Fujisaki, S., Galiano, M., et al. (2025). Global update on the susceptibilities of influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir, 2020–2023. *Antiviral Research* 241, 106217. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2025.106217>.

135. Dufrasne, F. (2021). Baloxavir Marboxil: An Original New Drug against Influenza. *Pharmaceuticals (Basel)* 15, 28. <https://doi.org/10.3390/ph15010028>.

136. Omoto, S., Speranzini, V., Hashimoto, T., Noshi, T., Yamaguchi, H., Kawai, M., Kawaguchi, K., Uehara, T., Shishido, T., Naito, A., et al. (2018). Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Sci Rep* 8, 9633. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27890-4>.

137. Acocal-Juárez, E., Márquez-Domínguez, L., Vallejo-Ruíz, V., Cedillo, L., and Santos-López, G. (2024). Baloxavir Resistance Markers in Influenza A and B Viruses in

- the Americas. *Drug Healthc Patient Saf* 16, 105–113. <https://doi.org/10.2147/DHPS.S470868>.
138. EMA. Xofluza Summary of Product Characteristics. [Accessed on 14 October 2025]. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xofluza-epar-product-information_en.pdf.
139. Baker, J.B., Block, S.L., Cagas, S.E., Macutkiewicz, L.B., Collins, C., Sadeghi, M., Sarkar, S., and Williams, S. (2023). Safety and Efficacy of Baloxavir Marboxil in Influenza-infected Children 5–11 Years of Age: A Post Hoc Analysis of a Phase 3 Study. *Pediatr Infect Dis J* 42, 983–989. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000004062>.
140. Bonomini, A., Mercorelli, B., and Loregian, A. (2025). Antiviral strategies against influenza virus: an update on approved and innovative therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci* 82, 75. <https://doi.org/10.1007/s00018-025-05611-1>.
141. Zheng, W., Fan, W., Zhang, S., Jiao, P., Shang, Y., Cui, L., Mahesutihan, M., Li, J., Wang, D., Gao, G.F., et al. (2019). Naproxen Exhibits Broad Anti-influenza Virus Activity in Mice by Impeding Viral Nucleoprotein Nuclear Export. *Cell Rep* 27, 1875–1885.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.053>.
142. Luo, D., Ye, Q., Li, R.-T., Zhou, H.-Y., Guo, J.-J., Zhao, S.-Q., Zhang, S., Jiang, T., Deng, Y.-Q., and Qin, C.-F. (2023). PA-E18G substitution in influenza A virus confers resistance to ZX-7101, a cap-dependent endonuclease inhibitor. *Virol Sin* 38, 559–567. <https://doi.org/10.1016/j.virs.2023.06.002>.
143. Chen, X., Ma, Q., Zhao, M., Yao, Y., Zhang, Q., Liu, M., Yang, Z., and Deng, W. (2023). Preclinical Study of ZSP1273, a Potent Antiviral Inhibitor of Cap Binding to the PB2 Subunit of Influenza A Polymerase. *Pharmaceuticals (Basel)* 16, 365. <https://doi.org/10.3390/ph16030365>.
144. Moss, R.B., Hansen, C., Sanders, R.L., Hawley, S., Li, T., and Steigbigel, R.T. (2012). A Phase II Study of DAS181, a Novel Host Directed Antiviral for the Treatment of Influenza Infection. *J Infect Dis* 206, 1844–1851. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis622>.

145. Kati, W.M., Montgomery, D., Carrick, R., Gubareva, L., Maring, C., McDaniel, K., Steffy, K., Molla, A., Hayden, F., Kempf, D., et al. (2002). In Vitro Characterization of A-315675, a Highly Potent Inhibitor of A and B Strain Influenza Virus Neuraminidases and Influenza Virus Replication. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 1014–1021. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.4.1014-1021.2002>.
146. Bauman, J.D., Patel, D., Baker, S.F., Vijayan, R.S.K., Xiang, A., Parhi, A.K., Martínez-Sobrido, L., LaVoie, E.J., Das, K., and Arnold, E. (2013). Crystallographic Fragment Screening and Structure-Based Optimization Yields a New Class of Influenza Endonuclease Inhibitors. *ACS Chem Biol* 8, 2501–2508. <https://doi.org/10.1021/cb400400j>.
147. Yang, F., Pang, B., Lai, K.K., Cheung, N.N., Dai, J., Zhang, W., Zhang, J., Chan, K.-H., Chen, H., Sze, K.-H., et al. (2021). Discovery of a Novel Specific Inhibitor Targeting Influenza A Virus Nucleoprotein with Pleiotropic Inhibitory Effects on Various Steps of the Viral Life Cycle. *J Virol* 95, e01432-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.01432-20>.
148. Liu, X., Liang, J., Yu, Y., Han, X., Yu, L., Chen, F., Xu, Z., Chen, Q., Jin, M., Dong, C., et al. (2022). Discovery of Aryl Benzoyl Hydrazide Derivatives as Novel Potent Broad-Spectrum Inhibitors of Influenza A Virus RNA-Dependent RNA Polymerase (RdRp). *J Med Chem* 65, 3814–3832. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01257>.
149. Kleinpeter, A.B., Jureka, A.S., Falahat, S.M., Green, T.J., and Petit, C.M. (2018). Structural analyses reveal the mechanism of inhibition of influenza virus NS1 by two antiviral compounds. *J Biol Chem* 293, 14659–14668. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004012>.
150. Nannetti, G., Massari, S., Mercorelli, B., Bertagnin, C., Desantis, J., Palù, G., Tabarrini, O., and Loregian, A. (2019). Potent and broad-spectrum cycloheptathiophene-3-carboxamide compounds that target the PA-PB1 interaction of influenza virus RNA polymerase and possess a high barrier to drug resistance. *Antiviral Res* 165, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.03.003>.
151. O’Hanlon, R., Leyva-Grado, V.H., Sourisseau, M., Evans, M.J., and Shaw, M.L.

- (2019). An Influenza Virus Entry Inhibitor Targets Class II PI3 Kinase and Synergizes with Oseltamivir. *ACS Infect Dis* 5, 1779–1793. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00230>.
152. Shahcheraghi, N., Golchin, H., Sadri, Z., Tabari, Y., Borhanifar, F., and Makani, S. (2022). Nano-biotechnology, an applicable approach for sustainable future. *3 Biotech* 12, 65. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-03108-9>.
153. Li, Y., Xiao, Y., Chen, Y., and Huang, K. (2021). Nano-based approaches in the development of antiviral agents and vaccines. *Life Sci* 265, 118761. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118761>.
154. Rios-Ibarra, C.P., Salinas-Santander, M., Orozco-Nunnelly, D.A., and Bravo-Madrigal, J. (2024). Nanoparticle-based antiviral strategies to combat the influenza virus. *Biomed Rep* 20, 65. <https://doi.org/10.3892/br.2024.1753>.
155. Fatima, M., Zaidi, N.-U.-S.S., Amraiz, D., and Afzal, F. (2016). In Vitro Antiviral Activity of Cinnamomum cassia and Its Nanoparticles Against H7N3 Influenza A Virus. *J Microbiol Biotechnol* 26, 151–159. <https://doi.org/10.4014/jmb.1508.08024>.
156. Naumenko, K., Zahorodnia, S., Pop, C.V., and Rizun, N. (2023). Antiviral activity of silver nanoparticles against the influenza A virus. *J Virus Erad* 9, 100330. <https://doi.org/10.1016/j.jve.2023.100330>.
157. Xiang, D., Chen, Q., Pang, L., and Zheng, C. (2011). Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus in vitro. *J Virol Methods* 178, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.09.003>.
158. Xiang, D., Zheng, Y., Duan, W., Li, X., Yin, J., Shigdar, S., O'Connor, M.L., Marappan, M., Zhao, X., Miao, Y., et al. (2013). Inhibition of A/Human/Hubei/3/2005 (H3N2) influenza virus infection by silver nanoparticles in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine* 8, 4103–4114. <https://doi.org/10.2147/IJN.S53622>.
159. Mosidze, E., Franci, G., Dell'Annunziata, F., Capuano, N., Colella, M., Salzano, F., Galdiero, M., Bakuridze, A., and Folliero, V. (2025). Silver Nanoparticle-Mediated Antiviral Efficacy against Enveloped Viruses: A Comprehensive Review. *Glob Chall* 9,

2400380. <https://doi.org/10.1002/gch2.202400380>.

160. Diacon, A., Krupka, O., and Hudhomme, P. (2022). Fullerene-Perylenediimide (C60-PDI) Based Systems: An Overview and Synthesis of a Versatile Platform for Their Anchor Engineering. *Molecules* 27, 6522. <https://doi.org/10.3390/molecules27196522>.

161. Innocenzi, P., and Stagi, L. (2020). Carbon-based antiviral nanomaterials: graphene, C-dots, and fullerenes. A perspective. *Chem. Sci.* 11, 6606–6622. <https://doi.org/10.1039/D0SC02658A>.

162. Shoji, M., Takahashi, E., Hatakeyama, D., Iwai, Y., Morita, Y., Shirayama, R., Echigo, N., Kido, H., Nakamura, S., Mashino, T., Okutani, T., & Kuzuhara, T. (2013). Anti-influenza activity of c60 fullerene derivatives. *PloS one*, 8(6), e66337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066337>.

163. Zhu, X., Xiao, S., Zhou, D., Sollogoub, M., and Zhang, Y. (2018). Design, synthesis and biological evaluation of water-soluble per-O-methylated cyclodextrin-C60 conjugates as anti-influenza virus agents. *Eur J Med Chem* 146, 194–205. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.040>.

164. Wang, D., Zhao, J., Mulder, R.J., Ratcliffe, J., Wang, C., Wu, B., Wang, J., and Hao, X. (2023). Highly aqueously stable C60-polymer nanoparticles with excellent photodynamic property for potential cancer treatment. *Smart Med* 2, e20230033. <https://doi.org/10.1002/SMMD.20230033>.

165. Lei, C., Yang, J., Hu, J., & Sun, X. (2021). On the Calculation of TCID50 for Quantitation of Virus Infectivity. *Virologica Sinica*, 36(1), 141–144. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00230-5>.

166. Melk, M. M., & El-Sayed, A. F. (2024). Phytochemical profiling, antiviral activities, molecular docking, and dynamic simulations of selected *Ruellia* species extracts. *Scientific reports*, 14(1), 15381. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-65387-5>.

167. Schrödinger, L., DeLano, W. (2020). PyMOL. Available at: <http://www.pymol.org/pymol>.

168. Bugnon, M., Goullieux, M., Röhrig, U.F., Perez, M.A.S., Daina, A., Michielin, O., and Zoete, V. (2023). SwissParam 2023: A Modern Web-Based Tool for Efficient Small Molecule Parametrization. *J Chem Inf Model* 63, 6469–6475. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c01053>.
169. Landrum, G. (2016). RDKit: Open-Source Cheminformatics Software. Available at: <https://www.rdkit.org/>
170. Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C., Vandermeersch, T., Zurek, E., and Hutchison, G.R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform* 4, 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.
171. Eberhardt, J., Santos-Martins, D., Tillack, A. F., & Forli, S. (2021). AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings. *Journal of chemical information and modeling*, 61(8), 3891—3898. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203>.
172. Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, Sz., Smith, J. C., Hess, B., & Lindahl, E. (2015). GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1-2, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
173. Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shim, J., Darian, E., Guvench, O., Lopes, P., Vorobyov, I., & Mackerell, A. D., Jr (2010). CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of computational chemistry*, 31(4), 671—690. <https://doi.org/10.1002/jcc.21367>.
174. Zoete, V., Cuendet, M. A., Grosdidier, A., & Michielin, O. (2011). SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. *Journal of computational chemistry*, 32(11), 2359—2368. <https://doi.org/10.1002/jcc.21816>.
175. Pekka, M., Lennart, N. (2001). Structure and Dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E Water Models at 298 K. *J Phys Chem A*, 105(43), 9954—9960. <https://doi.org/10.1021/jp003020w>.

176. Huang, J., and MacKerell Jr, A.D. (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *Journal of Computational Chemistry* 34, 2135–2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>.
177. Kawabata, K., Sato, Y., Kubo, T., Tokumura, A., Nishi, H., & Morimoto, K. (2023). Phospholipid analysis of two influenza A virus-infected cell lines differing in their viral replication kinetics. *Archives of virology*, 168(5), 132. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05766-x>.
178. Ivanova, P. T., Myers, D. S., Milne, S. B., McClaren, J. L., Thomas, P. G., & Brown, H. A. (2015). Lipid composition of viral envelope of three strains of influenza virus - not all viruses are created equal. *ACS infectious diseases*, 1(9), 399–452. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00040>.
179. Valdés-Tresanco, M.S., Valdés-Tresanco, M.E., Valiente, P.A., and Moreno, E. (2021). gmx_MMPBSA: A New Tool to Perform End-State Free Energy Calculations with GROMACS. *J Chem Theory Comput* 17, 6281–6291. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00645>.
180. Duan, L., Liu, X., & Zhang, J. Z. (2016). Interaction Entropy: A New Paradigm for Highly Efficient and Reliable Computation of Protein-Ligand Binding Free Energy. *Journal of the American Chemical Society*, 138(17), 5722–5728. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b02682>.
181. Turner, P. J. (2005). XMGRACE, Version 5.1.19. Beaverton, OR: Center for Coastal and Land-Margin Research, Oregon Graduate Institute of Science and Technology
182. Fu, L., Shi, S., Yi, J., Wang, N., He, Y., Wu, Z., Peng, J., Deng, Y., Wang, W., Wu, C., Lyu, A., Zeng, X., Zhao, W., Hou, T., & Cao, D. (2024). ADMETlab 3.0: an updated comprehensive online ADMET prediction platform enhanced with broader coverage, improved performance, API functionality and decision support. *Nucleic acids research*, 52(W1), W422–W431. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae236>.
183. Про захист тварин від жорстокого поводження, Закон України No 3447-IV, 21 лют. 2006 (Україна). <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15#Text>

184. Guzyr, O. I., Potikha, L. M., Shishkina, S. V., Fetyukhin, V. N., Shermolovich, Y. G., Bas, J. P., Kulyk, I. B., Zaremba, P. Y., and Zahorodnia, S. D. (2025). Synthesis, structure, and antiviral activity 4(6)- β -d-glucopyranosylamino-2-R-1,3-benzothiazoles. *Carbohydrate research*, 558, 109700. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2025.109700>
185. Zaremba, P., Zaremba, A., Zahorodnia, S., and Shalimov, O. (2024). Dependence of anti-influenza activity of [1,2,6]thiadiazino[2,3-a]benzimidazoles on the composition of the halogenomethyl group. The V Scientific Conference "Youth and Modern Problems of Microbiology and Virology, Kyiv, Ukraine, 49.
186. Zaremba, P., Zaremba, A., Siry, S., and Zahorodnia, S. (2024). Antiviral activity of low-molecular-weight fluorinated compounds against influenza A (H1N1) virus. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*, 86(2), 51-64. <https://doi.org/10.15407/microbiolj86.02.051>
187. Zaremba, P., Zaychenko, O., Zaremba, A., Shermolovych, Yu., Naumenko, K., and Zahorodnya, S. (2020). Antiviral Activity of Fluorine-containing Compounds Against Influenza Virus A H1N1, Youth and Progress in Biology: XVI International Scientific Conference, Lviv, Ukraine, 170.
188. Naumenko, K., Zaremba, P., Zahorodnya, S., Siryi, S., Borodkin, Ya., and Shermolovych, Yu. (2019). Antiviral activity of fluorinated compounds against DNA- and RNA-containing viruses, 5th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, online. <https://doi.org/10.3390/ECMC2019-06353>
189. Zaremba, P., Zaremba, A., Naumenko, K., Yelipashev M., and Zahorodnia, S. (2023). In vitro and in silico studies of the antiviral activity of polyhydrated fullerenes against influenza A (H1N1) virus. *Scientific Reports*, 13, 10879. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38128-3>
190. Zaremba, P., Naumenko, K., Zahorodnya, S., and Yelipashev, M. (2021). Antiviral activity of polyhydrated fullerenes against influenza A virus H1N1, 7th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, online. <https://doi.org/10.3390/ECMC2021-11485>

191. Zaremba, P., Zaremba, A., and Zahorodnia, S. Biocompatible polyhydroxylated fullerenes demonstrate complex anti-influenza activity. (2025). 13th International Conference "Nanotechnologies and Nanomaterials" NANO-2025, Bukovel, Ukraine, 251.
192. Заремба, П.Ю., Ниженець, А.П., Заремба А.А., Загородня С.Д. (2025). Інактивуюча дія полігідратованих фулеренів на ліпідну оболонку вірусів. XVI З'їзд Товариства мікробіологів України ім.С.М. Виноградського, Тернопіль, Україна, 278.
193. Zaremba, P., Baranova, G., and Zahorodnia, S. (2023). Toxicity of polyhydrated fullerenes with anti-influenza activity in both in vitro and in vivo systems, Modern aspects of microbiology, virology and biotechnology in wartime and post-war period, Kyiv, Ukraine, 276-277.
194. Zaremba, P., Mucha, Yu., Zahorodnya, S. (2022). The influence of silver nanoparticles on different stages of reproduction of influenza A virus (H1N1), The IV Young Scientists Conference "Youth and modern problems of microbiology and virology", Kyiv, Ukraine, 30.
195. Demchenko, V., Zaremba, P., Rybalchenko, N., Zahorodnia, S., Artiukh, L., Rybalchenko, T., Demchenko, O., Sytnyk, I., Zeng, D., Kobylinskyi, S., Goncharenko, L., & Iurzhenko, M. (2025). Structural peculiarities of the silver-containing nanocomposites based on carboxymethyl cellulose-chitosan polyelectrolyte complexes and their antimicrobial and antiviral applications. Scientific reports, 15(1), 35087. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-18932-9>
196. Zaremba, P., Demchenko, V., and Zahorodnia S. (2023). Virucidal activity of polymer silver-containing nanocomposites obtained by the green synthesis, X International Conference "Bioresources and Viruses", Kyiv, Ukraine, 91.
197. Zaremba, P., Artiukh, L., Demchenko, V., and Zahorodnia, S. (2023). Virucidal activity of polymer silver-containing films against enveloped viruses, 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, online. <https://doi.org/10.3390/ECMC2023-15723>.

198. Chen, E. (2026). Why is flu so bad this year? Highly mutated variant offers answers . *Nature*, 649, 806-807. doi: <https://doi.org/10.1038/d41586-026-00061-6>.
199. Bedford, T., Suchard, M. A., Lemey, P., Dudas, G., Gregory, V., Hay, A. J., McCauley, J. W., Russell, C. A., Smith, D. J., & Rambaut, A. (2014). Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. *eLife*, 3, e01914. <https://doi.org/10.7554/eLife.01914>.
200. ECDC. Early estimates of seasonal influenza vaccine effectiveness against influenza requiring medical attention at primary care level in Europe, week 41 - 49, 2025 Epidemiological update. [Accessed on 29 January 2026]. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/early-estimates-seasonal-influenza-vaccine-effectiveness-against-influenza-requiring>
201. Skoreński, M., & Sieńczyk, M. (2021). The Fellowship of Privileged Scaffolds-One Structure to Inhibit Them All. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 14(11), 1164. <https://doi.org/10.3390/ph14111164>.
202. Cheekatla, S. R. (2025). Benzothiazole-Based Therapeutics: FDA Insights and Clinical Advances. *Chemistry*, 7(4), 118. <https://doi.org/10.3390/chemistry7040118>.
203. Asiri, Y. I., Alsayari, A., Muhsinah, A. B., Mabkhot, Y. N., & Hassan, M. Z. (2020). Benzothiazoles as potential antiviral agents. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 72(11), 1459–1480. <https://doi.org/10.1111/jphp.13331>.
204. Cao, X., Du, X., Jiao, H., An, Q., Chen, R., Fang, P., Wang, J., & Yu, B. (2022). Carbohydrate-based drugs launched during 2000-2021. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 12(10), 3783–3821. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.05.020>.
205. Anand, K., & Wakode, S.R. (2017). Development of drugs based on Benzimidazole Heterocycle: Recent advancement and insights. *IJCS*, 5(2), 350-362.
206. Haider, S., Alam, M. S., & Hamid, H. (2015). 1,3,4-Thiadiazoles: a potent multi targeted pharmacological scaffold. *European journal of medicinal chemistry*, 92, 156–177. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.12.035>.
207. Senthilkumar, N., Sarveswari, S., Choudhari, P., Chaudhari, S., Islam, I., Tamboli,

- Y., & Vijayakumar, V. (2025). Novel benzimidazole-1, 3, 4-thiadiazole derivatives as casein kinase-2 inhibitors: synthesis, in vitro and in silico investigations. *BMC chemistry*, 19(1), 161. <https://doi.org/10.1186/s13065-025-01532-z>.
208. Tawfik, S., Farahat, A., El-Sayed M., Tantawy, A., Bagato, O., & Ali, M. (2018). Synthesis and Anti-influenza Activity of Novel Thiadiazole, Oxadiazole and Triazole Based Scaffolds, *Letters in Drug Design & Discovery*, 15(4),363-374. <https://doi.org/10.2174/1570180814666170512122832>.
209. Tatar, E., Küçükgül, Ş., Karakuş, S., De Clercq, E., Andrei, G., Snoeck, R., Pannecouque, C., Öktem-okullu, S., Ünübol, N., Kocagöz, T., Kalaycı, S., Şahin, F., & Küçükgül, İ. (2015). Synthesis and biological evaluation of some new 1,3,4-thiadiazole and 1,2,4-triazole derivatives from L-methionine as antituberculosis and antiviral agents. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 19(2), 88-102. <https://doi.org/10.12991/mpj.2015199639>.
210. Francesconi, V., Cichero, E., Schenone, S., Naesens, L., & Tonelli, M. (2020). Synthesis and Biological Evaluation of Novel (thio)semicarbazone-Based Benzimidazoles as Antiviral Agents against Human Respiratory Viruses. *Molecules*, 25(7), 1487. <https://doi.org/10.3390/molecules25071487>.
211. Ahmad, N.,Azad M., Khan A., and Azad, I. (2021). Benzimidazole as a promising antiviral heterocyclic scaffold: a review. *Journal of Science and Arts*, 1(54), 273-284. <https://doi.org/10.46939/J.SCI.ARTS-21.1-B05>.
212. Gillis, E. P., Eastman, K. J., Hill, M. D., Donnelly, D. J., & Meanwell, N. A. (2015). Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. *Journal of medicinal chemistry*, 58(21), 8315–8359. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00258>.
213. Fleming, F. F., Yao, L., Ravikumar, P. C., Funk, L., & Shook, B. C. (2010). Nitrile-containing pharmaceuticals: efficacious roles of the nitrile pharmacophore. *Journal of medicinal chemistry*, 53(22), 7902–7917. <https://doi.org/10.1021/jm100762r>.
214. Tanini, D., Angeli, A., and Supuran, C. (2025). Chapter 1 - Prodrugs: General concepts and prodrug design in medicinal chemistry, Editor(s): Supuran, T., Angeli, A.,

Tanini, D. *Advances in Prodrugs*, Elsevier, Pages 3-19, ISBN 9780443156359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15635-9.00003-1>.

215. Sansen, S., Yano, J. K., Reynald, R. L., Schoch, G. A., Griffin, K. J., Stout, C. D., & Johnson, E. F. (2007). Adaptations for the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons exhibited by the structure of human P450 1A2. *The Journal of biological chemistry*, 282(19), 14348–14355. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611692200>.

216. Indelicato, S., Bongiorno, D., Mauro, M., & Cascioferro, S. (2025). Recent Developments of 1,3,4-Thiadiazole Compounds as Anticancer Agents. *Pharmaceuticals*, 18(4), 580. <https://doi.org/10.3390/ph18040580>.

217. Ami, E. I., & Ohrui, H. (2021). Intriguing Antiviral Modified Nucleosides: A Retrospective View into the Future Treatment of COVID-19. *ACS medicinal chemistry letters*, 12(4), 510–517. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.1c00070>.

218. Chen, X., Wang, J., Jin, D., Zhou, W., & Cong, L. (2010). Synthesis and Antitumor Activity of 5'-deoxy-4'-thio-1-nucleosides. *Chemical Biology and Drug Design*, 75(6), 619–627. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2010.00967.x>.

219. Haraguchi, K., Shimada, H., Kimura, K., Akutsu, G., Tanaka, H., Abe, H., Hamasaki, T., Baba, M., Gullen, E. A., Dutschman, G. E., Cheng, Y. C., & Balzarini, J. (2011). Synthesis of 4'-Ethynyl-2'-deoxy-4'-thioribonucleosides and Discovery of a Highly Potent and Less Toxic NRTI. *ACS medicinal chemistry letters*, 2(9), 692–697. <https://doi.org/10.1021/ml2001054>.

220. Rashad, A. E., Shamroukh, A. H., Abdel-Megeid, R. E., Mostafa, A., el-Shesheny, R., Kandeil, A., Ali, M. A., & Banert, K. (2010). Synthesis and screening of some novel fused thiophene and thienopyrimidine derivatives for anti-avian influenza virus (H5N1) activity. *European journal of medicinal chemistry*, 45(11), 5251–5257. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.08.044>.

221. Chen, Y., Lu, K., Rong, B., Wen, Y., Li, G., Li, S., Guo, D., Zhou, Q., Liu, S., & Zhang, X. (2024). Discovery of Novel Thiophene-Based Baloxavir Derivatives as Potent Cap-Dependent Endonuclease Inhibitors for Influenza Treatment. *Journal of medicinal*

- chemistry, 67(24), 22039–22054. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.4c01979>.
222. Huang, Z., Chen, Z., Qin, X., Zhu, Q., & Yang, J. (2025). Discovery of tetrasubstituted tetrahydropyrimidines as novel inhibitors against influenza A virus. *Bioorganic chemistry*, 163, 108785. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2025.108785>.
223. Lou, J., Yang, X., Rao, Z., Qi, W., Li, J., Wang, H., Li, Y., Li, J., Wang, Z., Hu, X., Liu, P., & Hong, X. (2014). Design and synthesis of 6-oxo-1,4,5,6-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate derivatives as neuraminidase inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 83, 466–473. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.06.059>.
224. Lewis W. (2003). Defective mitochondrial DNA replication and NRTIs: pathophysiological implications in AIDS cardiomyopathy. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 284(1), H1–H9. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00814.2002>.
225. Ji, K., Zhang, G. N., Zhao, J. Y., Zhu, M., Wang, M. H., Wang, J. X., Cen, S., Wang, Y. C., & Li, W. Y. (2022). Design, synthesis, and anti-influenza A virus activity evaluation of novel indole containing derivatives of triazole. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 64, 128681. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2022.128681>.
226. Aouad, M. R., Khan, D. J. O., Said, M. A., Al-Kaff, N. S., Rezki, N., Ali, A. A., Bouqellah, N., & Hagar, M. (2021). Novel 1,2,3-Triazole Derivatives as Potential Inhibitors against Covid-19 Main Protease: Synthesis, Characterization, Molecular Docking and DFT Studies. *ChemistrySelect*, 6(14), 3468–3486. <https://doi.org/10.1002/slct.202100522>.
227. Cheng, H., Wan, J., Lin, M. I., Liu, Y., Lu, X., Liu, J., Xu, Y., Chen, J., Tu, Z., Cheng, Y. S., & Ding, K. (2012). Design, synthesis, and in vitro biological evaluation of 1H-1,2,3-triazole-4-carboxamide derivatives as new anti-influenza A agents targeting virus nucleoprotein. *Journal of medicinal chemistry*, 55(5), 2144–2153. <https://doi.org/10.1021/jm2013503>.
228. Ju, H., Xiu, S., Ding, X., Shang, M., Jia, R., Huang, B., Zhan, P., & Liu, X. (2020).

Discovery of novel 1,2,3-triazole oseltamivir derivatives as potent influenza neuraminidase inhibitors targeting the 430-cavity. *European journal of medicinal chemistry*, 187, 111940. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111940>.

229. Saad, K. A., Eldawy, M. A., & Elokely, K. M. (2022). Studies of the symmetric binding mode of daclatasvir and analogs using a new homology model of HCV NS5A GT-4a. *Journal of molecular modeling*, 29(1), 25. <https://doi.org/10.1007/s00894-022-05420-4>

230. Zhang, X., Zhang, Y., & Wei, F. (2024). Research progress on the nonstructural protein 1 (NS1) of influenza A virus. *Virulence*, 15(1), 2359470. <https://doi.org/10.1080/21505594.2024.2359470>.

231. Nippa, D. F., Atz, K., Stenzhorn, Y., Müller, A. T., Tosstorff, A., Benz, J., Binch, H., Bürkler, M., Haider, A., Heer, D., Hochstrasser, R., Kramer, C., Reutlinger, M., Schneider, P., Shema, T., Topp, A., Walter, A., Wittwer, M. B., Wolfard, J., Kuhn, B., ... Schneider, G. (2025). Expediting hit-to-lead progression in drug discovery through reaction prediction and multi-dimensional optimization. *Nature communications*, 16(1), 11646. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-66324-4>.

232. Ojha, D., Woods, T. A., & Peterson, K. E. (2021). Drug-Screening Strategies for Inhibition of Virus-Induced Neuronal Cell Death. *Viruses*, 13(11), 2317. <https://doi.org/10.3390/v13112317>.

233. Saathoff, J. G., Inman, A. O., Xia, X. R., Riviere, J. E., & Monteiro-Riviere, N. A. (2011). In vitro toxicity assessment of three hydroxylated fullerenes in human skin cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 25(8), 2105–2112. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.09.013>.

234. Sosnowska, M., Wierzbicki, M., Nasiłowska, B., Bakalova, T. N., Piotrowska, K., Strojny-Cieślak, B., Sawosz, E., & Kutwin, M. (2024). Fullerenol C60(OH)40 Nanoparticles and Ectoine Protect Human Nasal Epithelial Cells Against the Cytokine Storm After Addition of the Full-Length Spike Protein from SARS-CoV-2. *International journal of nanomedicine*, 19, 12221–12255. <https://doi.org/10.2147/IJN.S482652>.

235. Lurain, N. S., & Chou, S. (2010). Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clinical microbiology reviews*, 23(4), 689–712. <https://doi.org/10.1128/CMR.00009-10>.
236. Asaad, Y., Nemcovsky-Amar, D., Sznitman, J., Mangin, P. H., & Korin, N. (2024). A double-edged sword: The complex interplay between engineered nanoparticles and platelets. *Bioengineering & translational medicine*, 9(4), e10669. <https://doi.org/10.1002/btm2.10669>.
237. Sysmex Europe SE. XN-Series Automated Hematology Systems Flagging Interpretation Guide Document Number: 1166-LSS, Rev. 5 February 2019. Available at: <https://www.scribd.com/document/668853145/XN-Series-Flagging-Interpretation-Guide-v2-0#page=1>
238. Mukha, I., Vityuk, N., Khodko, A. et al. Photo- and temperature-dependent formation of tryptophan/silver nanoparticles. *Res Chem Intermed* 45, 4053–4066 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11164-019-03890-5>.
239. Poon, W. L., Alenius, H., Ndika, J., Fortino, V., Kolhinen, V., Meščeriakovas, A., Wang, M., Greco, D., Lähde, A., Jokiniemi, J., Lee, J. C., El-Nezami, H., & Karisola, P. (2017). Nano-sized zinc oxide and silver, but not titanium dioxide, induce innate and adaptive immunity and antiviral response in differentiated THP-1 cells. *Nanotoxicology*, 11(7), 936–951. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1382600>.
240. Krzyzowska, M., Janicka, M., Chodkowski, M., Patrycy, M., Obuch-Woszczatyńska, O., Tomaszewska, E., Ranoszek-Soliwoda, K., Celichowski, G., & Grobelny, J. (2023). Epigallocatechin Gallate-Modified Silver Nanoparticles Show Antiviral Activity against Herpes Simplex Type 1 and 2. *Viruses*, 15(10), 2024. <https://doi.org/10.3390/v15102024>.
241. Morris, D., Ansar, M., Speshock, J., Ivanciuc, T., Qu, Y., Casola, A., & Garofalo, R. (2019). Antiviral and Immunomodulatory Activity of Silver Nanoparticles in Experimental RSV Infection. *Viruses*, 11(8), 732. <https://doi.org/10.3390/v11080732>.
242. Boroumand, H., Badie, F., Mazaheri, S., Seyedi, Z. S., Nahand, J. S., Nejati, M., Baghi, H. B., Abbasi-Kolli, M., Badehnoosh, B., Ghandali, M., Hamblin, M. R., &

- Mirzaei, H. (2021). Chitosan-Based Nanoparticles Against Viral Infections. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 643953. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.643953>.
243. Al-Amrah, H., Sharawi, Z., Zubair, M., Alatawy, M., Mohamed M., Othman, G., Badawy, A., El-Magd, M. (2025). Impact of propolis and/ or chitosan nanoparticles on H1N1 influenza A virus: In vitro study, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 18(2), 101537. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2025.101537>.
244. Vilhelmova-Ilieva, N. M., Nikolova, I. N., Nikolova, N. Y., Petrova, Z. D., Trepechova, M. S., Holechek, D. I., Todorova, M. M., Topuzova, M. G., Ivanov, I. G., & Tumbarski, Y. D. (2023). Antiviral Potential of Specially Selected Bulgarian Propolis Extracts: In Vitro Activity against Structurally Different Viruses. *Life*, 13(7), 1611. <https://doi.org/10.3390/life13071611>.
245. EPA. Product Performance Test Guideline, OCSPP 810.2200, Disinfectants for Use on Environmental Surfaces, 712-C-17-004. [Accessed on 03 February 2026]. Available at: <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0150-0036>.
246. Guo, W., Ding, X., Zhang, H., Liu, Z., Han, Y., Wei, Q., Okoro, O. V., Shavandi, A., & Nie, L. (2024). Recent Advances of Chitosan-Based Hydrogels for Skin-Wound Dressings. *Gels (Basel, Switzerland)*, 10(3), 175. <https://doi.org/10.3390/gels10030175>.
247. Haji, A., Hadizadeh, M., & Ferdosi, M. (2022). Surface modification of polypropylene nonwoven with chitosan, TiO₂, and Ag nanoparticles for the removal of acid dye from water. *Turkish journal of chemistry*, 47(1), 63–67. <https://doi.org/10.55730/1300-0527.3517>.

Результат оцінки параметрів ADMET β -N-бензотіазоліл глікозидів

* - параметр виходить за межі оптимуму

| Фізико-хімічні параметри | | | | | |
|---|----------|---------|---------|---------|---|
| Параметр | 10S-52 | 10S-53 | 10S-54 | 10S-55 | Коментар |
| | Значення | | | | |
| Молекулярна маса (MW) | 380,07 | 483,03 | 380,07 | 483,03 | Оптимально:100~600 |
| Об'єм | 317,141 | 335,762 | 317,141 | 335,762 | об'єм Ван-дер-Ваальса |
| Густина | 1,198 | 1,305 | 1,198 | 1,305 | MW / Об'єм |
| Кількість акцепторів водневих зв'язків (nHA) | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | Оптимально: 0~12 |
| Кількість донорів водневих зв'язків (nHD) | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | Оптимально: :0~7 |
| Кількість обертових зв'язків (nRot) | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | Оптимально: 0~11 |
| Кількість кілець (nRing) | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | Оптимально: 0~6 |
| Кількість атомів у найбільшому кільці (MaxRing) | 9,0 | 9,0 | 9,0 | 9,0 | Оптимально: 0~18 |
| Кількість гетероатомів (nHet) | 11,0 | 14,0 | 11,0 | 14,0 | Оптимально: 1~15 |
| Формальний заряд (fChar) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | Оптимально: -4 ~4 |
| Кількість негнучких зв'язків (nRig) | 16,0 | 16,0 | 16,0 | 16,0 | Оптимально: 0~30 |
| Гнучкість | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | nRot /nRig |
| Стереосцентри | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | Оптимально: ≤ 2 |
| Topological Polar Surface Area (TPSA) | 115,07 | 115,07 | 115,07 | 115,07 | Оптимально: 0~140 |
| logS | -3,077 | -4,078 | -2,517* | -3,385 | Логарифм значення розчинності у воді |
| logP | 1,313 | 2,146 | 1,106 | 2,009 | Логарифм коефіцієнтів розподілу n-октанолу/води при pH=7,4. |
| logD | 1,775 | 2,328 | 1,524 | 2,144 | Логарифм коефіцієнтів розподілу n-октанолу/води. |
| pKa (Acid) | 6,43 | 6,851 | 6,87 | 6,532 | Значення константи кислотно-основної дисоціації (pKa) відображає силу кислотності молекули. |
| pKa (Base) | 4,871 | 4,777 | 4,291 | 4,323 | Значення константи кислотно-основної дисоціації (pKa) відображає силу основності молекули. |
| Температура плавлення, | 174,009 | 177,245 | 147,16 | 148,498 | Температура плавлення |

| °C | | | | | <25°C класифікується як рідини, >25°C - як тверді речовини. |
|---------------------------------|----------|---------|---------|---------|--|
| Температура кипіння, °C | 280,36 | 295,215 | 288,135 | 303,892 | Нормальна температура кипіння <25°C класифікується як газ. |
| Параметри Медичної хімії | | | | | |
| Параметр | 10S-52 | 10S-53 | 10S-54 | 10S-55 | Коментар |
| | Значення | | | | |
| QED | 0,528* | 0,465* | 0,528* | 0,465* | Міра схожості з лікарським препаратом, що базується на концепції бажаності; приваблива: > 0,67; неприваблива: 0,49~0,67; занадто складна: < 0,34A. |
| GASA | 0 | 0 | 0 | 0 | Вихідне значення представляє ймовірність того, як важко синтезувати молекулу, і може варіювати від 0 до 1. |
| Synth | 3 | 4 | 4 | 4 | Шкала синтетичної доступності розроблена для оцінки легкості синтезу молекул, подібних до ліків. ≥6 - важко синтезувати; <6 - легко синтезувати. |
| Fsp3 | 0,5 | 0,462 | 0,5 | 0,462 | Кількість sp ³ -гібридизованих атомів C / загальна кількість атомів C, що корелює з температурою плавлення та розчинністю. Оптимально: Fsp3 ≥0,42. |
| Правило Ліпінського | 0 | 0 | 0 | 0 | MW ≤ 500; logP ≤ 5; Hacc ≤ 10; Hdon ≤ 5. Якщо дві властивості виходять за межі допустимого діапазону, можливе погане поглинання або проникність, якщо одна – прийнятно |
| Правило Pfizer | 0 | 0 | 0 | 0 | logP > 3; TPSA < 75 Сполуки з високим log P та низьким TPSA ймовірно будуть токсичними. |
| Правило GSK | 0 | 1* | 0 | 1* | MW ≤ 400; logP ≤ 4 Сполуки, що задовольняють правило GSK, можуть мати більш сприятливий профіль ADMET |

| Правило Золотого трикутника | 0 | 0 | 0 | 0 | 200 ≤ MW ≤ 500; -2 ≤ logD ≤ 5 Сполуки, що задовольняють правило Золотого трикутника, можуть мати більш сприятливий профіль ADMET |
|---|----------|---------|---------|---------|---|
| Promiscuous compounds | 0,007 | 0 | 0,004 | 0 | Здатність малих молекул специфічно взаємодіяти з кількома мішенями. Значення – це ймовірність того, що молекула є нерозбірливою сполукою, в діапазоні від 0 до 1. |
| Параметри Абсорбції | | | | | |
| Параметр | 10S-52 | 10S-53 | 10S-54 | 10S-55 | Коментар |
| | Значення | | | | |
| Сасо-2 проникність | -5,41* | -5,373* | -5,765* | -5,59* | Оптимально: вище за -5.15 Log unit |
| MDCK проникність | -4,83* | -4,79* | -4,914* | -4,943* | низька проникність: < 2 × 10 ⁻⁶ cm/s; середня: 2-20 × 10 ⁻⁶ cm/s; висока: > 20 × 10 ⁻⁶ cm/s |
| Human Intestinal Absorption (HIA) | 0,062 | 0,004 | 0,052 | 0,005 | Вихідне значення – ймовірність молекули бути HIA+ |
| F _{20%} | 0,042 | 0,001 | 0,042 | 0,001 | 20% біодоступність 1 = біодоступність < 20%; 0 = біодоступність ≥ 20%. |
| F _{30%} | 0,583* | 0,129 | 0,593* | 0,169 | 30% біодоступність 1 = біодоступність < 30%; 0 = біодоступність ≥ 30%. |
| F _{50%} | 0,729* | 5,757* | 0,496* | 0,275 | 50% біодоступність 1 = біодоступність < 50%; 0 = біодоступність ≥ 50%. |
| Параметри Розподілу | | | | | |
| Параметр | 10S-52 | 10S-53 | 10S-54 | 10S-55 | Коментар |
| | Значення | | | | |
| Зв'язування з білками плазми (PPB) | 94,187* | 97,57* | 94,262* | 95,632* | Оптимально: < 90%. Препарати з високим PPB можуть мати низький терапевтичний індекс. |
| Volume Distribution (V _{dss}) | -0,03* | 0,048 | 0,006* | 0,175 | Оптимально: 0.04-20L/kg |
| Проникнення крізь гематоенцефалічний бар'єр (BBB) | 0,012 | 0,007 | 0,135 | 0,271 | Вихідне значення – ймовірність молекули бути BBB+ |
| Фракція незв'язаного вмісту в плазмі (Fu) | 3,61* | 1,057* | 3,622* | 2,046* | Низька: <5%; Середня: 5~20%; Висока: > 20% |
| Параметри Метаболізму | | | | | |

| Параметр | 10S-52 | 10S-53 | 10S-54 | 10S-55 | Коментар |
|---|----------|--------|--------|--------|--|
| | Значення | | | | |
| CYP1A2 інгібітор | 0 | 0 | 0,52* | 0,557* | - |
| CYP1A2 субстрат | 0,002 | 0,001 | 0,101 | 0,052 | - |
| CYP2C19 інгібітор | 0 | 0 | 0,238 | 0,42* | - |
| CYP2C19 субстрат | 0 | 0,027 | 0 | 0 | - |
| CYP2C9 інгібітор | 0,002 | 0,007 | 0,353 | 0,76* | - |
| CYP2C9 субстрат | 0,003 | 0,196 | 0,12 | 0,02 | - |
| CYP2D6 інгібітор | 0 | 0 | 0,122 | 0,044 | - |
| CYP2D6 субстрат | 0 | 0,028 | 0,002 | 0,001 | - |
| CYP3A4 інгібітор | 0 | 0 | 0,018 | 0,1 | - |
| CYP3A4 субстрат | 0 | 0,026 | 0,022 | 0,175 | - |
| CYP2B6 інгібітор | 0,042 | 0 | 0,12 | 0,185 | - |
| CYP2B6 субстрат | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| CYP2C8 інгібітор | 0,977* | 0,685* | 0,962* | 0,928* | - |
| Метаболічна стабільність у мітосомах печінки людини (HLM) | 0,1 | 0,058 | 0,532* | 0,461* | 0 = стабільний (HLM > 30 хв); 1 = нестабільний (HLM ≤ 30 хв). Вихідне значення – це ймовірність мітосомальної нестабільності, де значення ближче до 1 вказує на вищу ймовірність нестабільності. |
| Параметри Виведення | | | | | |
| Параметр | 10S-52 | 10S-53 | 10S-54 | 10S-55 | Коментар |
| | Значення | | | | |
| CL _{plasma} | 1,924 | 1,307 | 2,032 | 1,493 | >15 ml/min/kg: високий кліренс; 5-15 ml/min/kg: помірний кліренс; < 5 ml/min/kg: низький кліренс. |
| T _{1/2} | 1,994 | 2,124 | 1,714 | 1,881 | Період напів виденення. Ультра короткий: 1/2 < 1 год; короткий: 1-4 год; проміжний: 4-8 год; довгий: > 8 год. |
| Параметри Токсичності | | | | | |
| Параметр | 10S-52 | 10S-53 | 10S-54 | 10S-55 | Коментар |
| | Значення | | | | |
| hERG Blockers | 0,029 | 0,03 | 0,016 | 0,023 | Молекули з IC ₅₀ ≤ 10 мкМ або ≥ 50% інгібування при 10 мкМ були класифіковані як hERG+. Вихідне значення – це ймовірність бути hERG+ у діапазоні від 0 до 1. |

| | | | | | |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--|
| Drug Induced Liver Injury (DILI) | 0,981* | 1* | 0,934* | 1* | - |
| AMES Mutagenicity/Toxicity | 0,885* | 0,835* | 0,766* | 0,695* | Здатність речовин викликати зворотні мутації |
| Carcinogenicity | 0,255 | 0,076 | 0,07 | 0,025 | - |
| Human Hepatotoxicity | 0,867* | 0,775* | 0,824* | 0,822* | - |
| Drug-induced Nephrotoxicity | 0,944* | 0,353 | 0,944* | 0,467 | - |
| Hematotoxicity | 0,456 | 0,001 | 0,26 | 0,001 | - |
| Genotoxicity | 0,999* | 1* | 0,989* | 1* | - |
| Drug-induced Neurotoxicity | 0,079 | 0 | 0,043 | 0 | - |

Результат оцінки параметрів ADMET галогеновмісних [1,2,6]тіадіазино-
[2,3a]бензімідазолів

* - параметр виходить за межі оптимуму

| Фізико-хімічні параметри | | | | | | | | | |
|---|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------------------------------|
| Параметр | 2618 | 1792 | 1752 | 1790 | 1634 | 1870 | 1796 | 1782 | Коментар |
| | Значення | | | | | | | | |
| Молекулярна маса (MW) | 249,06 | 296,02 | 373,93 | 361,92 | 307,06 | 343,04 | 420,95 | 408,95 | Оптимально: 100~600 |
| Об'єм | 229,04 | 246,89 9 | 266,18 3 | 280,39 7 | 278,57 6 | 290,71 1 | 309,99 5 | 324,21 | об'єм Ван-дер-Ваальса |
| Густина | 1,087 | 1,199 | 1,405 | 1,291 | 1,102 | 1,18 | 1,358 | 1,261 | MW / Об'єм |
| Кількість акцепторів водневих зв'язків (nHA) | 5,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | 7,0 | Оптимально: 0~12 |
| Кількість донорів водневих зв'язків (nHD) | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | Оптимально: :0~7 |
| Кількість обертових зв'язків (nRot) | 0,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 3,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | Оптимально: 0~11 |
| Кількість кілець (nRing) | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | Оптимально: 0~6 |
| Кількість атомів у найбільшому кільці (MaxRing) | 13,0 | 13,0 | 13,0 | 13,0 | 13,0 | 13,0 | 13,0 | 13,0 | Оптимально: 0~18 |
| Кількість гетероатомів (nHet) | 6,0 | 9,0 | 10,0 | 10,0 | 8,0 | 10,0 | 11,0 | 11,0 | Оптимально: 1~15 |
| Формальний заряд (fChar) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | Оптимально: -4 ~4 |
| Кількість негнучких зв'язків (nRig) | 17,0 | 18,0 | 18,0 | 18,0 | 18,0 | 18,0 | 18,0 | 18,0 | Оптимально: 0~30 |
| Гнучкість | 0,0 | 0,056 | 0,056 | 0,056 | 0,167 | 0,222 | 0,222 | 0,222 | nRot /nRig |
| Сtereоцентри | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | Оптимально: ≤ 2 |
| Topological Polar Surface Area (TPSA) | 61,77 | 87,78 | 85,56 | 85,56 | 88,07 | 88,07 | 88,07 | 88,07 | Оптимально: 0~140 |
| logS | -3,479 | -3,42 | -3,738 | -3,999 * | -3,386 | -3,864 | -4,164 * | -4,047 * | Логарифм значення розчинності у воді |
| logP | 0,814 | 1,695 | 1,648 | 1,845 | 0,879 | 1,434 | 2,114 | 2,374 | Логарифм коефіцієнтів розподілу н- |

| | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--|
| | | | | | | | | | октанолу/води при рН=7,4. |
| logD | 1,067* | 1,757 | 1,675 | 1,731 | 1,121* | 1,549 | 1,645 | 1,912 | Логарифм коефіцієнтів розподілу н-октанолу/води. |
| pKa (Acid) | 8,706 | 7,07 | 6,171 | 6,303 | 8,582 | 7,549 | 7,007 | 6,995 | Значення константи кислотно-основної дисоціації (рКа) відображає силу кислотності молекули. |
| pKa (Base) | 2,854 | 1,198 | 1,412 | 1,261 | 3,002 | 2,37 | 2,124 | 2,505 | Значення константи кислотно-основної дисоціації (рКа) відображає силу основності молекули. |
| Температура плавлення, °С | 224,37 6 | 199,92 1 | 200,49 2 | 200,34 5 | 190,07 9 | 179,47 | 172,43 4 | 171,95 4 | Температура плавлення <25°С класифікується як рідини, >25°С - як тверді речовини. |
| Температура кипіння, °С | 331,60 8 | 308,90 5 | 320,96 5 | 322,28 3 | 312,68 1 | 318,04 9 | 318,14 8 | 321,20 4 | Нормальна температура кипіння <25°С класифікується як газ. |
| Параметри Медичної хімії | | | | | | | | | |
| Параметр | 2618 | 1792 | 1752 | 1790 | 1634 | 1870 | 1796 | 1782 | Коментар |
| | Значення | | | | | | | | |
| QED | 0,763 | 0,857 | 0,764 | 0,718 | 0,835 | 0,843 | 0,597* | 0,598* | Міра схожості з лікарським препаратом, що базується на концепції бажаності; приваблива: > 0,67; неприваблива: 0,49~0,67; занадто складна: < 0,34А. |
| GASA | 1,0* | 1,0* | 1,0* | 1,0* | 0,0 | 0,0 | 1,0* | 1,0* | Вихідне значення представляє ймовірність того, як важко синтезувати молекулу. |
| Synth | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | Шкала синтетичної доступності. ≥6 - важко синтезувати; |

| | | | | | | | | | |
|---|----------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|--|
| | | | | | | | | | <6 - легко синтезувати. |
| Fsp3 | 0,182* | 0,091* | 0,091* | 0,091* | 0,231* | 0,231* | 0,231* | 0,231* | Оптимально: Fsp3 $\geq 0,42$. |
| Правило Ліпінського | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | MW ≤ 500 ; logP ≤ 5 ; Hacc ≤ 10 ; Hdon ≤ 5 . |
| Правило Pfizer | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | logP > 3; TPSA < 75 |
| Правило GSK | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,0* | 1,0* | MW ≤ 400 ; logP ≤ 4 |
| Правило Золотого трикутника | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 200 \leq MW \leq 500; -2 \leq logD \leq 5 |
| Promiscuous compounds | 0,103 | 0,012 | 0,012 | 0,021 | 0,212 | 0,252 | 0,337 | 0,354 | Здатність малих молекул специфічно взаємодіяти з кількома мішенями. |
| Параметри Абсорбції | | | | | | | | | |
| Параметр | 2618 | 1792 | 1752 | 1790 | 1634 | 1870 | 1796 | 1782 | Коментар |
| | Значення | | | | | | | | |
| Сасо-2 проникність | -4,826 | -5,479* | -5,097 | -4,995 | -5,612* | -5,226* | -5,284* | -5,073 | Оптимально: вище за -5.15 Log unit |
| MDCK проникність | -4,796* | -4,764* | -4,782* | -4,73* | -4,764* | -4,697* | -4,814* | -4,742* | низька проникність: < 2 $\times 10^{-6}$ cm/s; середня: 2-20 $\times 10^{-6}$ cm/s; висока: > 20 $\times 10^{-6}$ cm/s |
| Human Intestinal Absorption (HIA) | 0,0 | 0,005 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | Вихідне значення – ймовірність молекули бути HIA+ |
| Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) | 0,017 | 0,312 | 0,169 | 0,991* | 0,061 | 0,031 | 0,265 | 0,994* | Значення ефективної проникності (Peff) представлені як log Peff |
| F _{20%} | 0,0 | 0,011 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 20% біодоступність 1 = біодоступність < 20%; 0 = біодоступність \geq 20%. |
| F _{30%} | 0,0 | 0,047 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 30% біодоступність 1 = біодоступність < 30%; 0 = біодоступність \geq 30%. |
| F _{50%} | 0,0 | 0,352 | 0,343 | 0,997* | 0,014 | 0,0 | 0,041 | 0,999* | 50% біодоступність 1 = біодоступність < 50%; 0 = біодоступність \geq 50%. |
| Параметри Розподілу | | | | | | | | | |
| Параметр | 2618 | 1792 | 1752 | 1790 | 1634 | 1870 | 1796 | 1782 | Коментар |

| | Значення | | | | | | | | |
|---|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|---|
| Зв'язування з білками плазми (PPB) | 91,202* | 90,32* | 98,164* | 98,36* | 97,788* | 98,386* | 98,429* | 98,111* | Оптимально: < 90%. |
| Volume Distribution (Vdss) | -0,545* | -0,152* | -0,31* | -0,379* | -0,481* | -0,522* | -0,271* | -0,0341* | Оптимально: 0.04-20L/kg |
| Проникнення крізь гематоенцефалічний бар'єр (BBB) | 0,976* | 0,005 | 0,466 | 1,0* | 0,149 | 0,033 | 0,664 | 1,0* | Вихідне значення – ймовірність молекули бути BBB+ |
| Фракція незв'язаного вмісту в плазмі (Fu) | 6,629 | 6,831 | 1,444* | 1,388* | 1,618* | 1,475* | 1,477* | 1,767* | Низька: <5%; Середня: 5~20%; Висока: > 20% |
| Параметри Метаболізму | | | | | | | | | |
| Параметр | 2618 | 1792 | 1752 | 1790 | 1634 | 1870 | 1796 | 1782 | Коментар |
| | Значення | | | | | | | | |
| СYP1A2 інгібітор | 0,991* | 0,262 | 0,994* | 0,557 | 0,998* | 1,0* | 1,0* | 0,998* | - |
| СYP1A2 субстрат | 0,957* | 0,524 | 0,962* | 0,983* | 0,023 | 0,043 | 0,026 | 0,999* | - |
| СYP2C19 інгібітор | 0,269 | 0,209 | 0,482 | 0,185 | 0,862* | 1,0* | 0,994* | 0,995* | - |
| СYP2C19 субстрат | 0,642 | 0,001 | 0,041 | 0,395 | 0,0 | 0,001 | 0,0 | 0,66 | - |
| СYP2C9 інгібітор | 0,061 | 0,995* | 0,221 | 0,294 | 0,728* | 0,993* | 0,997* | 0,999* | - |
| СYP2C9 субстрат | 0,906 | 0,003 | 0,252 | 0,955* | 0,001 | 0,002 | 0,013 | 0,831* | - |
| СYP2D6 інгібітор | 0,014 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,02 | 0,004 | 0,0 | 0,001 | - |
| СYP2D6 субстрат | 0,211 | 0,0 | 0,015 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | - |
| СYP3A4 інгібітор | 0,027 | 0,026 | 0,014 | 0,0 | 0,011 | 0,079 | 0,004 | 0,107 | - |
| СYP3A4 субстрат | 0,929* | 0,125 | 0,888* | 0,995* | 0,08 | 0,995* | 0,975* | 1,0* | - |
| СYP2B6 інгібітор | 0,303 | 0,0 | 0,003 | 0,001 | 0,551 | 0,51 | 0,279 | 0,999* | - |
| СYP2B6 субстрат | 0,021 | 0,0 | 0,006 | 0,393 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,996* | - |
| СYP2C8 інгібітор | 0,122 | 0,414 | 0,248 | 0,063 | 0,723* | 0,999* | 0,991* | 0,946* | - |
| Метаболічна стабільність у мікосомах печінки людини (HLM) | 0,825* | 0,015 | 0,469 | 0,764* | 0,878* | 0,638 | 0,646 | 0,974* | 0 = стабільний (HLM > 30 хв); 1 = нестабільний (HLM ≤ 30 хв). |
| Параметри Виведення | | | | | | | | | |
| Параметр | 2618 | 1792 | 1752 | 1790 | 1634 | 1870 | 1796 | 1782 | Коментар |
| | Значення | | | | | | | | |
| CL _{plasma} | 7,331 | 1,337 | 3,827 | 3,299 | 5,322 | 5,458 | 5,207 | 3,776 | >15 ml/min/kg: високий кліренс; 5-15 ml/min/kg: помірний кліренс; < 5 ml/min/kg: низький кліренс. |

| | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| $T_{1/2}$ | 1,196 | 1,655 | 1,151 | 1,368 | 0,506* | 0,663* | 0,739* | 1,059 | Період напів виденення. Ультра короткий: 1/2 < 1 год; короткий: 1-4 год; проміжний: 4-8 год; довгий: > 8 год. |
| Параметри Токсичності | | | | | | | | | |
| Параметр | 2618 | 1792 | 1752 | 1790 | 1634 | 1870 | 1796 | 1782 | Коментар |
| | Значення | | | | | | | | |
| hERG Blockers | 0,021 | 0,014 | 0,019 | 0,013 | 0,031 | 0,037 | 0,029 | 0,026 | Молекули з $IC_{50} \leq 10$ мкМ або $\geq 50\%$ інгібування при 10 мкМ були класифіковані як hERG+. |
| Drug Induced Liver Injury (DILI) | 0,997* | 1,0* | 0,972* | 0,452 | 0,998* | 0,991* | 0,972* | 0,521 | - |
| AMES Mutagenicity/Toxic ity | 0,351 | 0,011 | 0,249 | 0,627 | 0,151 | 0,124 | 0,171 | 0,493 | Здатність речовин викликати зворотні мутації |
| Carcinogenicity | 0,748* | 0,008 | 0,495 | 0,328 | 0,608 | 0,558 | 0,532 | 0,582 | - |
| Human Hepatotoxicity | 0,936* | 0,945* | 0,756* | 0,515 | 0,91* | 0,91* | 0,724* | 0,673 | - |
| Drug-induced Nephrotoxicity | 0,674 | 0,175 | 0,236 | 0,092 | 0,569 | 0,495 | 0,396 | 0,149 | - |
| Hematotoxicity | 0,811* | 0,185 | 0,488 | 0,585 | 0,579 | 0,486 | 0,342 | 0,341 | - |
| Genotoxicity | 1,0* | 1,0* | 1,0* | 0,998* | 1,0* | 1,0* | 1,0* | 0,991* | - |
| Drug-induced Neurotoxicity | 0,645 | 0,022 | 0,193 | 0,061 | 0,342 | 0,386 | 0,27 | 0,059 | - |

Результат оцінки параметрів ADMET флуоровмісних похідних тіофену та аналогів
нуклеозидів на їх основі

* - параметр виходить за межі оптимуму

| Фізико-хімічні параметри | | | | | |
|---|----------|--------|--------|---------|---|
| Параметр | 10S-45 | 10S-46 | 10S-48 | 10S-49 | Коментар |
| | Значення | | | | |
| Молекулярна маса (MW) | 202,03 | 296,04 | 312,04 | 218,02 | Оптимально:100~600 |
| Об'єм | 158,068 | 241,57 | 250,36 | 166,858 | об'єм Ван-дер-Ваальса |
| Густина | 1,278 | 1,225 | 1,246 | 1,307 | MW / Об'єм |
| Кількість акцепторів водневих зв'язків (nHA) | 2,0 | 5,0 | 6,0 | 3,0 | Оптимально: 0~12 |
| Кількість донорів водневих зв'язків (nHD) | 2,0 | 2,0 | 3,0 | 3,0 | Оптимально: :0~7 |
| Кількість обертових зв'язків (nRot) | 2,0 | 3,0 | 3,0 | 2,0 | Оптимально: 0~11 |
| Кількість кілець (nRing) | 1,0 | 2,0 | 2,0 | 1,0 | Оптимально: 0~6 |
| Кількість атомів у найбільшому кільці (MaxRing) | 5,0 | 6,0 | 6,0 | 5,0 | Оптимально: 0~18 |
| Кількість гетероатомів (nHet) | 6,0 | 9,0 | 10,0 | 7,0 | Оптимально: 1~15 |
| Формальний заряд (fChar) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | Оптимально: -4 ~4 |
| Кількість негнучких зв'язків (nRig) | 5,0 | 13,0 | 13,0 | 5,0 | Оптимально: 0~30 |
| Гнучкість | 0,4 | 0,231 | 0,231 | 0,4 | nRot /nRig |
| Стерецентри | 2,0 | 2,0 | 3,0 | 3,0 | Оптимально: ≤ 2 |
| Topological Polar Surface Area (TPSA) | 40,46 | 75,09 | 95,32 | 60,69 | Оптимально: 0~140 |
| logS | -1,032 | -1,52 | -1,678 | -0,918 | Логарифм значення розчинності у воді |
| logP | 1,358 | 0,793 | 0,639 | 0,805 | Логарифм коефіцієнтів розподілу н-октанолу/води при pH=7,4. |
| logD | 1,44 | 0,914* | 0,972* | 0,962* | Логарифм коефіцієнтів розподілу н-октанолу/води. |
| pKa (Acid) | 7,355 | 6,602 | 6,577 | 5,481 | Значення константи кислотно-основної дисоціації (pKa) відображає силу кислотності молекули. |
| pKa (Base) | 4,865 | 2,778 | 3,198 | 4,277 | Значення константи кислотно-основної дисоціації (pKa) відображає силу основності молекули. |

| | | | | | |
|---------------------------------|----------|---------|---------|---------|--|
| Температура плавлення, °C | 74,48 | 153,568 | 153,265 | 119,848 | Температура плавлення <25°C класифікується як рідини, >25°C - як тверді речовини. |
| Температура кипіння, °C | 169,598 | 238,802 | 253,347 | 209,98 | Нормальна температура кипіння <25°C класифікується як газ. |
| Параметри Медичної хімії | | | | | |
| Параметр | 10S-45 | 10S-46 | 10S-48 | 10S-49 | Коментар |
| | Значення | | | | |
| QED | 0,669* | 0,848 | 0,704 | 0,584* | Міра схожості з лікарським препаратом, що базується на концепції бажаності; приваблива: > 0,67; неприваблива: 0,49~0,67; занадто складна: < 0,34A. |
| GASA | 0,0 | 1,0* | 1,0* | 1,0* | Вихідне значення представляє ймовірність того, як важко синтезувати молекулу, і може варіювати від 0 до 1. |
| Synth | 4,0 | 4,0 | 4,0 | 4,0 | Шкала синтетичної доступності розроблена для оцінки легкості синтезу молекул, подібних до ліків. ≥6 - важко синтезувати; <6 - легко синтезувати. |
| Fsp3 | 1,0 | 0,6 | 0,6 | 1,0 | Кількість sp ³ -гібридизованих атомів C / загальна кількість атомів C, що корелює з температурою плавлення та розчинністю. Оптимально: Fsp3 ≥0,42. |
| Правило Ліпінського | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | MW ≤ 500; logP ≤ 5; Hacc ≤ 10; Hdon ≤ 5. Якщо дві властивості виходять за межі допустимого діапазону, можливе погане поглинання або проникність, якщо одна – прийнятно |
| Правило Pfizer | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | logP > 3; TPSA < 75 Сполуки з високим log P та низьким TPSA ймовірно будуть токсичними. |
| Правило GSK | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | MW ≤ 400; logP ≤ 4 Сполуки, що задовольняють правило GSK, можуть мати більш сприятливий профіль |

| ADMET | | | | | |
|---|----------|---------|---------|---------|---|
| Правило Золотого трикутника | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 200 ≤ MW ≤ 500; -2 ≤ logD ≤ 5 Сполуки, що задовольняють правило Золотого трикутника, можуть мати більш сприятливий профіль ADMET |
| Promiscuous compounds | 0,061 | 0,029 | 0,185 | 0,032 | Здатність малих молекул специфічно взаємодіяти з кількома мішенями. Значення – це ймовірність того, що молекула є нерозбірливою сполукою, в діапазоні від 0 до 1. |
| Параметри Абсорбції | | | | | |
| Параметр | 10S-45 | 10S-46 | 10S-48 | 10S-49 | Коментар |
| | Значення | | | | |
| Сасо-2 проникність | -4,733 | -5,596* | -5,62* | -5,405* | Оптимально: вище за -5.15 Log unit |
| MDCK проникність | -4,781* | -5,097* | -5,008* | -4,635 | низька проникність: < 2 × 10 ⁻⁶ cm/s; середня: 2-20 × 10 ⁻⁶ cm/s; висока: > 20 × 10 ⁻⁶ cm/s |
| Human Intestinal Absorption (HIA) | 0,101 | 0,01 | 0,037 | 0,057 | Вихідне значення – ймовірність молекули бути HIA+ |
| F _{20%} | 0,349 | 0,012 | 0,011 | 0,157 | 20% біодоступність 1 = біодоступність < 20%; 0 = біодоступність ≥ 20%. |
| F _{30%} | 0,239 | 0,015 | 0,042 | 0,154 | 30% біодоступність 1 = біодоступність < 30%; 0 = біодоступність ≥ 30%. |
| F _{50%} | 0,358 | 0,015 | 0,076 | 0,206 | 50% біодоступність 1 = біодоступність < 50%; 0 = біодоступність ≥ 50%. |
| Параметри Розподілу | | | | | |
| Параметр | 10S-45 | 10S-46 | 10S-48 | 10S-49 | Коментар |
| | Значення | | | | |
| Зв'язування з білками плазми (PPB) | 76,73 | 82,351 | 63,404 | 56,936 | Оптимально: < 90%. Препарати з високим PPB можуть мати низький терапевтичний індекс. |
| Volume Distribution (V _{dss}) | 0,302 | 0,008* | -0,192* | -0,06* | Оптимально: 0.04-20L/kg |
| Проникнення крізь гематоенцефалічний бар'єр (BBB) | 0,698 | 0,762* | 0,57 | 0,39 | Вихідне значення – ймовірність молекули бути BBB+ |
| Фракція незв'язаного вмісту в плазмі (Fu) | 18,193 | 12,855 | 27,728* | 39,125 | Низька: <5%; Середня: 5~20%; Висока: > 20% |

| Параметри Метаболізму | | | | | |
|---|----------|--------|--------|--------|--|
| Параметр | 10S-45 | 10S-46 | 10S-48 | 10S-49 | Коментар |
| | Значення | | | | |
| CYP1A2 інгібітор | 0,021 | 0,001 | 0,0 | 0,007 | - |
| CYP1A2 субстрат | 0,903* | 0,991* | 0,479 | 0,461 | - |
| CYP2C19 інгібітор | 0,07 | 0,0 | 0,0 | 0,35 | - |
| CYP2C19 субстрат | 0,859* | 0,99* | 0,789* | 0,531 | - |
| CYP2C9 інгібітор | 0,005 | 0,001 | 0,0 | 0,018 | - |
| CYP2C9 субстрат | 0,606 | 0,884* | 0,996* | 0,283 | - |
| CYP2D6 інгібітор | 0,009 | 0,0 | 0,0 | 0,048 | - |
| CYP2D6 субстрат | 0,253 | 0,079 | 0,0 | 0,043 | - |
| CYP3A4 інгібітор | 0,017 | 0,001 | 0,0 | 0,027 | - |
| CYP3A4 субстрат | 0,031 | 0,914* | 0,996* | 0,498 | - |
| CYP2B6 інгібітор | 0,38 | 0,001 | 0,0 | 0,832* | - |
| CYP2B6 субстрат | 0,102 | 0,018 | 0,0 | 0,018 | - |
| CYP2C8 інгібітор | 0,256 | 0,001 | 0,0 | 0,922* | - |
| Метаболічна стабільність у мікосомах печінки людини (HLM) | 0,397 | 0,135 | 0,135 | 0,431 | 0 = стабільний (HLM > 30 хв); 1 = нестабільний (HLM ≤ 30 хв). Вихідне значення – це ймовірність мікосомальної нестабільності, де значення ближче до 1 вказує на вищу ймовірність нестабільності. |
| Параметри Виведення | | | | | |
| Параметр | 10S-45 | 10S-46 | 10S-48 | 10S-49 | Коментар |
| | Значення | | | | |
| CL _{plasma} | 5,515 | 4,013 | 2,343 | 3,851 | >15 ml/min/kg: високий кліренс; 5-15 ml/min/kg: помірний кліренс; < 5 ml/min/kg: низький кліренс. |
| T _{1/2} | 1,669 | 1,49 | 2,082 | 2,223 | Період напів виведення. Ультра короткий: 1/2 < 1 год; короткий: 1-4 год; проміжний: 4-8 год; довгий: > 8 год. |
| Параметри Токсичності | | | | | |
| Параметр | 10S-45 | 10S-46 | 10S-48 | 10S-49 | Коментар |
| | Значення | | | | |
| hERG Blockers | 0,055 | 0,058 | 0,027 | 0,045 | Молекули з IC ₅₀ ≤ 10 мкМ або ≥ 50% інгібування при 10 мкМ були класифіковані як hERG+. Вихідне значення – це ймовірність бути hERG+ у |

| | | | | | діапазоні від 0 до 1. |
|----------------------------------|-------|--------|--------|--------|--|
| Drug Induced Liver Injury (DILI) | 0,466 | 0,923* | 0,974* | 0,606 | - |
| AMES Mutagenicity/Toxicity | 0,379 | 0,183 | 0,394 | 0,759* | Здатність речовин викликати зворотні мутації |
| Carcinogenicity | 0,616 | 0,448 | 0,44 | 0,519 | - |
| Human Hepatotoxicity | 0,687 | 0,828* | 0,751* | 0,598 | - |
| Drug-induced Nephrotoxicity | 0,195 | 0,204 | 0,364 | 0,194 | - |
| Hematotoxicity | 0,25 | 0,33 | 0,54 | 0,586 | - |
| Genotoxicity | 0,247 | 0,996* | 0,998* | 0,443 | - |
| Drug-induced Neurotoxicity | 0,12 | 0,481 | 0,821* | 0,141 | - |

Результат оцінки параметрів ADMET сполуки 10S-47, озельтамівіру (ОЗ) та фавіпіравіру (ФВП)

* - параметр виходить за межі оптимуму

| Фізико-хімічні параметри | | | | |
|---|----------|---------|---------|---|
| Параметр | 10S-47 | ОЗ | ФВП | Коментар |
| | Значення | | | |
| Молекулярна маса (MW) | 468,12 | 312,2 | 157,03 | Оптимально: 100~600 |
| Об'єм | 384,441 | 325,981 | 132,572 | об'єм Ван-дер-Ваальса |
| Густина | 1,218 | 0,958 | 1,184 | MW / Об'єм |
| Кількість акцепторів водневих зв'язків (nHA) | 10,0 | 6,0 | 5,0 | Оптимально: 0~12 |
| Кількість донорів водневих зв'язків (nHD) | 0,0 | 3,0 | 3,0 | Оптимально: :0~7 |
| Кількість обертових зв'язків (nRot) | 6,0 | 9,0 | 1,0 | Оптимально: 0~11 |
| Кількість кілець (nRing) | 4,0 | 1,0 | 1,0 | Оптимально: 0~6 |
| Кількість атомів у найбільшому кільці (MaxRing) | 6,0 | 6,0 | 6,0 | Оптимально: 0~18 |
| Кількість гетероатомів (nHet) | 15,0 | 6,0 | 6,0 | Оптимально: 1~15 |
| Формальний заряд (fChar) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | Оптимально: -4 ~4 |
| Кількість негнучких зв'язків (nRig) | 24,0 | 8,0 | 8,0 | Оптимально: 0~30 |
| Гнучкість | 0,25 | 1,125 | 0,125 | nRot / nRig |
| Стереосцентри | 2,0 | 3,0 | 0,0 | Оптимально: ≤ 2 |
| Topological Polar Surface Area (TPSA) | 114,02 | 90,65 | 88,84 | Оптимально: 0~140 |
| logS | -2,412 | -1,37 | -1,204 | Логарифм значення розчинності у воді |
| logP | 1,854 | 1,118 | -0,715* | Логарифм коефіцієнтів розподілу н-октанолу/води при рН=7,4. |
| logD | 1,998 | 1,023 | -0,482* | Логарифм коефіцієнтів розподілу н-октанолу/води. |
| pKa (Acid) | 5,246 | 10,515 | 8,384 | Значення константи кислотно-основної дисоціації (pKa) відображає силу кислотності молекули. |
| pKa (Base) | 5,048 | 6,842 | 1,794 | Значення константи кислотно-основної дисоціації (pKa) відображає силу основності молекули. |
| Температура плавлення, °C | 104,725 | 85,666 | 197,312 | Температура плавлення <25°C класифікується як рідини, >25°C - як тверді речовини. |

| Температура кипіння, °C | 222,394 | 277,578 | 291,761 | Нормальна температура кипіння <25°C класифікується як газ. |
|-----------------------------|----------|---------|---------|--|
| Параметри Медичної хімії | | | | |
| Параметр | 10S-47 | O3 | ФВП | Коментар |
| | Значення | | | |
| QED | 0,595* | 0,691 | 0,548* | Міра схожості з лікарським препаратом, що базується на концепції бажаності; приваблива: > 0,67; неприваблива: 0,49~0,67; занадто складна: < 0,34A. |
| GASA | 0,0 | 1,0* | 0,0 | Вихідне значення представляє ймовірність того, як важко синтезувати молекулу, і може варіювати від 0 до 1. |
| Synth | 4,0 | 3,0 | 2,0 | Шкала синтетичної доступності розроблена для оцінки легкості синтезу молекул, подібних до ліків. ≥6 - важко синтезувати; <6 - легко синтезувати. |
| Fsp3 | 0,75 | 0,75 | 0,0* | Кількість sp ³ -гібридизованих атомів C / загальна кількість атомів C, що корелює з температурою плавлення та розчинністю. Оптимально: Fsp3 ≥0,42. |
| Правило Ліпінського | 0,0 | 0,0 | 0,0 | MW ≤ 500; logP ≤ 5; Hacc ≤ 10; Hdon ≤ 5. Якщо дві властивості виходять за межі допустимого діапазону, можливе погане поглинання або проникність, якщо одна – прийнятно |
| Правило Pfizer | 0,0 | 0,0 | 0,0 | logP > 3; TPSA < 75 Сполуки з високим log P та низьким TPSA ймовірно будуть токсичними. |
| Правило GSK | 1,0* | 0,0 | 0,0 | MW ≤ 400; logP ≤ 4 Сполуки, що задовольняють правило GSK, можуть мати більш сприятливий профіль ADMET |
| Правило Золотого трикутника | 0,0 | 0,0 | 1,0* | 200 ≤ MW ≤ 500; -2 ≤ logD ≤ 5 Сполуки, що задовольняють правило Золотого трикутника, можуть мати більш сприятливий профіль ADMET |
| Promiscuous compounds | 0,298 | 0,018 | 0,042 | Здатність малих молекул специфічно взаємодіяти з кількома мішенями. Значення – це ймовірність того, що молекула є нерозбірливою сполукою, в діапазоні від 0 до 1. |
| Параметри Абсорбції | | | | |
| Параметр | 10S-47 | O3 | ФВП | Коментар |
| | Значення | | | |
| Сасо-2 проникність | -4,972 | -5,466* | -4,969 | Оптимально: вище за -5.15 Log unit |
| MDCK проникність | -4,639* | -4,816* | -4,865* | низька проникність: < 2 × 10 ⁻⁶ cm/s; середня: 2-20 × 10 ⁻⁶ cm/s; висока: > 20 × |

| | | | | |
|---|----------|--------|---------|---|
| | | | | 10-6 cm/s |
| Human Intestinal Absorption (HIA) | 0,0 | 0,003 | 0,0 | Вихідне значення – ймовірність молекули бути HIA+ |
| F _{20%} | 0,0 | 0,0 | 0,001 | 20% біодоступність 1 = біодоступність < 20%; 0 = біодоступність ≥ 20%. |
| F _{30%} | 0,0 | 0,579* | 0,002 | 30% біодоступність 1 = біодоступність < 30%; 0 = біодоступність ≥ 30%. |
| F _{50%} | 0,0 | 0,677* | 0,002 | 50% біодоступність 1 = біодоступність < 50%; 0 = біодоступність ≥ 50%. |
| Параметри Розподілу | | | | |
| Параметр | 10S-47 | ОЗ | ФВП | Коментар |
| | Значення | | | |
| Зв'язування з білками плазми (PPB) | 93,322* | 21,685 | 51,92 | Оптимально: < 90%. Препарати з високим PPB можуть мати низький терапевтичний індекс. |
| Volume Distribution (V _{dss}) | -0,019* | 0,05 | -0,017* | Оптимально: 0.04-20L/kg |
| Проникнення крізь гематоенцефалічний бар'єр (BBB) | 0,0 | 0,033 | 0,484 | Вихідне значення – ймовірність молекули бути BBB+ |
| Фракція незв'язаного вмісту в плазмі (F _u) | 6,114 | 77,693 | 42,437 | Низька: <5%; Середня: 5~20%; Висока: > 20% |
| Параметри Метаболізму | | | | |
| Параметр | 10S-47 | ОЗ | ФВП | Коментар |
| | Значення | | | |
| CYP1A2 інгібітор | 0,0 | 0,001 | 0,002 | - |
| CYP1A2 субстрат | 0,0 | 0,0 | 0,874* | - |
| CYP2C19 інгібітор | 0,65 | 0,006 | 0,005 | - |
| CYP2C19 субстрат | 0,669 | 0,03 | 0,0 | - |
| CYP2C9 інгібітор | 0,786* | 0,0 | 0,002 | - |
| CYP2C9 субстрат | 0,949* | 0,0 | 0,048 | - |
| CYP2D6 інгібітор | 0,0 | 0,001 | 0,0 | - |
| CYP2D6 субстрат | 0,002 | 0,0 | 0,001 | - |
| CYP3A4 інгібітор | 0,114 | 0,003 | 0,0 | - |
| CYP3A4 субстрат | 0,001 | 0,058 | 0,295 | - |
| CYP2B6 інгібітор | 0,0 | 0,616 | 0,0 | - |
| CYP2B6 субстрат | 0,004 | 0,0 | 0,0 | - |
| CYP2C8 інгібітор | 0,0 | 0,2 | 0,004 | - |
| Метаболічна стабільність у мікосомах печінки людини (HLM) | 0,0 | 0,246 | 0,023 | 0 = стабільний (HLM > 30 хв); 1 = нестабільний (HLM ≤ 30 хв). Вихідне значення – це ймовірність мікосомальної нестабільності, де значення ближче до 1 вказує на вищу ймовірність нестабільності. |
| Параметри Виведення | | | | |

| Параметр | 10S-47 | ОЗ | ФВП | Коментар |
|----------------------------------|----------|--------|--------|---|
| | Значення | | | |
| CL _{plasma} | 5,519 | 6,425 | 4,682 | >15 ml/min/kg: високий кліренс; 5-15 ml/min/kg: помірний кліренс; < 5 ml/min/kg: низький кліренс. |
| T _{1/2} | 1,369 | 1,026 | 1,961 | Період напів виденення. Ультра короткий: 1/2 < 1 год; короткий: 1-4 год; проміжний: 4-8 год; довгий: > 8 год. |
| Параметри Токсичності | | | | |
| Параметр | 10S-47 | ОЗ | ФВП | Коментар |
| | Значення | | | |
| hERG Blockers | 0,068 | 0,232 | 0,085 | Молекули з IC ₅₀ ≤10 мкМ або ≥50% інгібування при 10 мкМ були класифіковані як hERG+. Вихідне значення – це ймовірність бути hERG+ у діапазоні від 0 до 1. |
| Drug Induced Liver Injury (DILI) | 0,986* | 0,814* | 0,9* | - |
| AMES Mutagenicity/Toxicity | 0,207 | 0,234 | 0,549 | Здатність речовин викликати зворотні мутації |
| Carcinogenicity | 0,447 | 0,303 | 0,409 | - |
| Human Hepatotoxicity | 0,922* | 0,598 | 0,754* | - |
| Drug-induced Nephrotoxicity | 0,747* | 0,36 | 0,556 | - |
| Hematotoxicity | 0,227 | 0,118 | 0,634 | - |
| Genotoxicity | 1,0* | 0,837* | 1,0* | - |
| Drug-induced Neurotoxicity | 0,863* | 0,678 | 0,954* | - |

Результат гематологічного аналізу зразків крові з експерименту по визначенню
гострої токсичності суміші фулеренолів на моделі мишей BALB/c

| Показник | Одини- ці вимірю- вання | Межі | 3 доба | | | | 21 доба | | | |
|---|----------------------------------|---------|------------------|------------------|----------------------|------------------|------------------|-----------------|--------------------|---------------------|
| | | | Контр. | 0,07 мг/кг | 0,76 мг/кг | 7,62 мг/кг | Контр. | 0,07 мг/кг | 0,76 мг/кг | 7,62 мг/кг |
| Рівень лейкоцитів у крові | 10 ⁹ /л | 4-10 | 2,87 ±0,49 | 2,95 ±1,34 | 1,97 ±0,32 | 2,37 ±1,78 | 3,43 ±1,72 | 1,43 ±0 | 1,20 ±0,25 | 1,77 ±0,49 |
| Рівень лімфоцитів у крові | 10 ⁹ /л | 0,6-4,1 | 1,03 ±0,31 | 0,90 ±0 | 0,90 ±0,26 | 0,67 ±0,47 | 1,67 ±0,76 | 0,77 ±0,07 | 0,65 ±0,06 | 0,90 ±0,26 |
| Рівень середніх клітин у крові | 10 ⁹ /л | 0,1-1,8 | 0,37 ±0,15 | 0,40 ±0,14 | 0,20 ±0 | 0,23 ±0,15 | 0,37 ±0,15 | 0,13 ±0,07 | 0,15 ±0,06 | 0,17 ±0,06 |
| Рівень гранулоцитів у крові | 10 ⁹ /л | 2-7,8 | 1,47 ±0,12 | 1,65 ±1,20 | 0,87 ±0,31 | 1,47 ±1,16 | 1,40 ±0,82 | 0,53 ±0 | 0,40 ±0,15 | 0,70 ±0,36 |
| Відсотковий вміст лімфоцитів | % | 20-50 | 36,50 ±6,01 | 33,25 ±14,35 | 45,47 ±10,5 9 | 28,10 ±1,61 | 50,83 ±5,35 | 55,17 ±3,18 | 53,95 ±3,53 | 50,33 ±12,0 7 |
| Відсотковий вміст середніх клітин | % | 1-15 | 12,77 ±2,08 | 12,65 ±0,21 | 9,90 ±0,53 | 10,73 ±1,08 | 11,40 ±1,68 | 11,73 ±2,83 | 10,10 ±2,70 | 9,07 ±1,43 |
| Відсотковий вміст гранулоцитів | % | 40-70 | 50,73 ±7,06 | 54,10 ±14,14 | 44,63 ±10,0 9 | 61,17 ±2,15 | 37,77 ±6,99 | 33,10 ±0,35 | 35,9 5±1,4 7 | 40,60 ±11,0 3 |
| Рівень еритроцитів у крові | 10 ¹² /л | 3,8-5,8 | 8,47 ±1,06 | 7,66 ±0,08 | 7,88 ±0,32 | 7,56 ±1,56 | 8,33 ±0,09 | 8,78 ±0,08 | 8,42 ±0,31 | 8,48 ±0,41 |
| Рівень гемоглобіну у крові | г/л | 110-165 | 150,67 ±9,71 | 139,00 ±0 | 142,33 ±7,09 | 133,00 ±26,96 | 161,00 ±1,73 | 146,67 ±2,83 | 149,00 ±5,77 | 151,3 3±6,6 6 |
| Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті | г/л | 320-360 | 394,67 ±32,47 | 378,50 ±21,92 | 368,67 ±14,5 7 | 367,00 ±14,42 | 413,00 ±17,06 | 399,00 ±0,71 | 408,50 ±9,17 | 405,0 0±6,2 4 |
| Середній вміст | пг | 26,5- | 17,97 | 18,15 | 18,03 | 17,60 | 19,30 | 16,73 | 17,70 | 17,87 |

| | | | | | | | | | | |
|--|--------------------|---------|------------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|
| гемоглобіну в еритроциті | | 33,5 | ±2,57 | ±0,21 | ±0,45 | ±0,17 | ±0 | ±0,14 | ±0,15 | ±1,52 |
| Середній об'єм еритроцита | фл | 80-99 | 45,40 ±2,69 | 48,10 ±3,25 | 49,03 ±2,72 | 47,93 ±2,20 | 46,77 ±2,01 | 41,90 ±0,42 | 43,40 ±1,31 | 44,23 ±4,10 |
| Ширина розподілу еритроцитів по об'єму, коефіцієнт варіації (КВ) | % | 10-15 | 13,43 ±0,21 | 13,25 ±0,07 | 13,23 ±0,25 | 13,00 ±0,70 | 13,93 ±0,57 | 13,33 ±0,07 | 13,75 ±0,60 | 13,77 ±0,40 |
| Ширина розподілу еритроцитів по об'єму, середньоквадратичне відхилення (СКВ) | фл | 35-56 | 29,77 ±1,15 | 31,10 ±1,84 | 31,37 ±1,93 | 30,33 ±0,87 | 31,57 ±1,98 | 27,30 ±0,49 | 29,25 ±0,26 | 29,67 ±3,16 |
| Гематокрит | % | 30-50 | 38,30 ±3,37 | 36,80 ±2,12 | 38,63 ±2,41 | 36,03 ±6,26 | 38,97 ±1,42 | 36,80 ±0,71 | 36,50 ±1,95 | 37,37 ±1,82 |
| Рівень тромбоцитів | 10 ⁹ /л | 100-300 | 451,00 ±52,51 | 344,50 ±4,95 | 313,00 ±44,31 | 400,33 ±77,14 | 353,67 ±6,03 | 369,33 ±7,78 | 386,50 ±56,89 | 409,67 ±51,73 |
| Середній об'єм тромбоцита | фл | 7-11 | 6,13 ±0,31 | 6,10 ±0 | 6,00 ±0,10 | 6,10 ±0,36 | 6,80 ±0,20 | 6,83 ±0,07 | 6,45 ±0,23 | 6,73 ±0,25 |
| Ширина розподілу тромбоцитів по об'єму | % | 10-18 | 9,73 ±1,27 | 10,15 ±0,49 | 9,13 ±0,61 | 10,60 ±1,15 | 15,90 ±4,13 | 13,83 ±0,49 | 10,85 ±0,81 | 13,93 ±3,36 |
| Тромбокрит | % | 0,1-0,5 | 0,28 ±0,02 | 0,21 ±0,002 | 0,19 ±0,03 | 0,24 ±0,06 | 0,24 ±0,01 | 0,25 ±0,01 | 0,25 ±0,05 | 0,27 ±0,03 |
| Коефіцієнт великих тромбоцитів | % | 13-43 | 7,70 ±2,17 | 7,30 ±0 | 7,70 ±0,10 | 6,70 ±1,74 | 11,60 ±2,46 | 12,47 ±0,57 | 10,60 ±1,03 | 11,10 ±2,00 |

Наукові статті за основною темою наукової роботи

(* – особистий внесок здобувачки)

1. Demchenko, V., Zaremba, P., Rybalchenko, N., Zahorodnia, S., Artiukh, L., Rybalchenko, T., Demchenko, O., Sytnyk, I., Zeng, D., Kobylinskyi, S., Goncharenko, L., and Iurzhenko, M. (2025). Structural peculiarities of the silver-containing nanocomposites based on carboxymethyl cellulose-chitosan polyelectrolyte complexes and their antimicrobial and antiviral applications. *Scientific reports*, 15(1), 35087. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-18932-9>. (*виконано дослідження протівірусної активності відносно вірусу грипу типу А, проаналізовано результати та підготовано їх до публікації)

2. Guzyr, O. I., Potikha, L. M., Shishkina, S. V., Fetyukhin, V. N., Shermolovich, Y. G., Bas, J. P., Kulyk, I. B., Zaremba, P. Y., and Zahorodnia, S. D. (2025). Synthesis, structure, and antiviral activity 4(6)- β -d-glucopyranosylamino-2-R-1,3-benzothiazoles. *Carbohydrate research*, 558, 109700. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2025.109700>. (*виконано дослідження цитотоксичності та протівірусної активності відносно вірусу грипу типу А, проаналізовано результати та підготовано їх до публікації)

3. Zaremba, P., Zaremba, A., Siry, S., and Zahorodnia, S. (2024). Antiviral activity of low-molecular-weight fluorinated compounds against influenza A (H1N1) virus. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*, 86(2), 51-64. <https://doi.org/10.15407/microbiolj86.02.051>. (*виконано всі експериментальні дослідження та їх аналіз, проведено аналіз результатів симуляційних експериментів, підготовано рукопис до публікації)

4. Zaremba, P., Zaremba, A., Naumenko, K., Yelipashev M., and Zahorodnia, S. (2023). In vitro and in silico studies of the antiviral activity of polyhydrated fullerenes against influenza A (H1N1) virus. *Scientific Reports*, 13, 10879. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38128-3>. (*виконано всі експериментальні дослідження та їх аналіз, проведено аналіз результатів симуляційних експериментів, підготовано рукопис до публікації)

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

5. Zaremba P., Zaremba A., and Zahorodnia S. Biocompatible polyhydroxylated fullerenes demonstrate complex anti-influenza activity. 13th International Conference "Nanotechnologies and Nanomaterials" NANO-2025, 20-23 August 2025, Bukovel, Ukraine, P.251

6. Заремба П.Ю., Ниженець А.П., Заремба А.А., Загородня С.Д. Інактивуюча дія полігідратованих фулеренів на ліпідну оболонку вірусів. XVI З'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, 2-6 червня 2025, Тернопіль, Україна, С.278

7. Zaremba P., Zaremba A., Zahorodnia S., and Shalimov O. Dependence of anti-influenza activity of [1,2,6]thiadiazino[2,3-a]benzimidazoles on the composition of the halogenomethyl group. The V Scientific Conference "Youth and Modern Problems of Microbiology and Virology, 19-20 November 2024, Kyiv, Ukraine, P.49

8. Nyzhenets A., Zaremba P., and Zahorodnia S. Virucidal activity of fullerenols against influenza A virus, Modern Problems of Biology, Biotechnology and Biomedicine, 3-4 July 2024, Odesa, Ukraine, P.32

9. Zaremba P., Baranova G., and Zahorodnia S. Toxicity of polyhydrated fullerenes with anti-influenza activity in both in vitro and in vivo systems, Modern aspects of microbiology, virology and biotechnology in wartime and post-war period, 15-16 November 2023, Kyiv, Ukraine, P.276-277

10. Zaremba P., Demchenko V., and Zahorodnia S. Virucidal activity of polymer silver-containing nanocomposites obtained by the green synthesis, X International Conference „Bioresources and Viruses“, 11-13 September 2023, Kyiv, Ukraine, P.91

11. Zaremba P., Artiukh L., Demchenko V., and Zahorodnia S. Virucidal activity of polymer silver-containing films against enveloped viruses, 9th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 1-30 November 2023, online

12. Zaremba P., Mucha Yu., Zahorodnya S. The influence of silver nanoparticles on different stages of reproduction of influenza A virus (H1N1), The IV Young Scientists Conference “Youth and modern problems of microbiology and virology”, 15-17 November 2022, Kyiv, Ukraine, P.30

13. Zaremba P., Naumenko K., Zahorodnya S., and Yelipashev M. Antiviral activity of polyhydrated fullerenes against influenza A virus H1N1, 7th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 01-30 November 2021, online

14. Zaremba A., Zaremba P., Zahorodnya S. In vitro and in silico study of anti-influenza activity of 2-dioxypyrimidin-5-trifluoromethyl-tetrahydrothiophene with subsequent increase in its affinity for the target protein, 7th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 01-30 November 2021, online

15. Zaremba P., Zaychenko O., Zaremba A., Shermolovych Yu., Naumenko K., and Zahorodnya S. Antiviral activity of fluorine-containing compounds against influenza virus A H1N1, Youth and Progress in Biology: XVI International Scientific Conference, 27-29 April 2020, Lviv, Ukraine, P.170

16. Naumenko K., Zaremba P., Zahorodnya S., Siryi S., Borodkin Ya., and Shermolovych Yu. Antiviral activity of fluorinated compounds against DNA- and RNA-containing viruses, 5th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry, 01-30 November 2019, online

Документ підписано у сервісі Вчасно (продовження)

Дисертація_Заремба_П_Ю_fin.pdf

Документ відправлено (05417087): 07:27 17.04.2026

Документ отримано (05417087): 07:27 17.04.2026

Відправник документу

Електронний підпис

07:27 17.04.2026

Ідентифікаційний код: 3610407701

Заремба Поліна Юріївна

Власник ключа: Заремба Поліна Юріївна

Час перевірки КЕП/ЕЦП: 07:27 17.04.2026

Статус перевірки сертифікату: Сертифікат діє

Серійний номер: 514B5C86A1E5DA1104000000D49F1600F7E21605

Тип підпису: кваліфікований

Тип сертифікату: кваліфікований