



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ „СТЕФАН АНГЕЛОВ“**

Иванка Николова Николова

In vitro и *in vivo* изследване на антивирусната
активност на серии нови диарил етери и техни
аналози – перспективни химиотерапевтици в
анти-ентеровирусната терапия

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на научната степен
„Доктор на науките“

Професионално направление 4.3 Биологически науки

Научно жури:

проф. д-р Нели Корсун, дмн
проф. Райко Пешев, дн
проф. Пенка Петрова, дбн
проф. д-р Петя Христова
доц. д-р Константин Симеонов
доц. д-р Методи Кунчев, д.м.
доц. д-р Райничка Михайлова-Гарнизова, д.м.
(Резерви: доц. д-р Михаил Илиев, доц. д-р Петя Димитрова)

София, 2025

БЕЛЕЖКИ И БЛАГОДАРНОСТИ:

Представените научни резултати са получени в периода от 2014 до 2023 г. и са част от научните ми публикации от този период (31 научни статии в издания, индексирани в Scopus и WoS). Дисертацията е написана на 189 страници и съдържа 46 фигури, 31 таблици, 1 схема и 351 литературни източници. Научните публикации, чиято тематика е включена в настоящата дисертация са 26 (12 в Q1, 8 в Q2, 3 в Q3 и 3 в Q4). Резултатите са представени в 20 устни или постерни доклада на научни конференции в България и чужбина. Резултатите, включени в дисертацията, са получени при изпълнението на научноизследователски проекти, финансирани от Фонд „Научни изследвания“: B02-11 (2014-2019); КП-06-КИТАЙ/31 (2020-2022), КП-06-Н49/2 и КР-06-Н31/7 (2019, текущ проект). Изказвам сърдечни благодарности за съвместната работа и ценните съвети на колегите от Департамент Вирусология към Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН.

Изказвам благодарност и на партньорите ни в разработването на тематиката на дисертационния труд:

Синтез на диарил етери и техни аналози:

- Доц. Георги Добриков, дхн; гл. ас. д-р Ивайло Славчев, гл. ас. д-р Мартин Равуцов - Институт по органична химия с център по фитохимия – Българска академия на науките

QSAR анализ:

- Проф. Виктор Кузмин и Людмила Огниченко – Департамент по молекулярна структура и химична информатика, Институт по физикохимия, Одеса, Украйна
- Проф. д-р Иванка Цаковска и гл. ас. д-р Иглика Лесиярска - Институт по биофизика и биомедицинско инженерство, Българска академия на науките

NGS Секвенционен анализ:

- Francis Delpeyroux, Marie-Line Joffret, Patsy Polston – Департамент Вирусология, Институт Пастьор, Париж, Франция

Във връзка с научни разработки, свързани с пандемията от COVID-19:

- Синтез на хетероциклични производни – доц. д-р Меглена Къндинска и доц. д-р Алексей Василев – Факултет по химия и фармация към СУ „Св. Климент Охридски“
- Синтез на нови биомолекулни пептидни аналози и функционализирани текстилни материали – чл. кор. Иво Грабчев, дхн – МУ на СУ „Св. Климент Охридски“, проф. д-р инж. Десислава Станева – катедра „Текстил, кожи и горива“ към ХТМУ, проф. д-р инж. Петър Тодоров – Факултет по химични технологии към ХТМУ, доц. д-р инж. Стела Георгиева – Катедра „Аналитична химия“ към ХТМУ

Дисертационният труд е обсъден на заседание на Националния семинар по обща вирусология на 18.03.2025 г. и е насочен към защита на заседание на Научния съвет на ИМикБ с Протокол №4/25.03.2025 г. Защитата на дисертационния труд ще се проведе на 2025 г. Материалите по защитата са на разположение в деловодството на Института по микробиология "Стефан Ангелов", ул. "Акад. Г. Бончев", бл. 26, каб. 218.

СЪДЪРЖАНИЕ

	С.
ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	1
УВОД	3
ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР	5
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	13
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	15
РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ	17
1. Изследване на ефекта на тройната комбинация Pleconaril/Guanidine-HCl/Oxoglaucin (PGO) при последователно алтернативно редуване на съединенията (САА курс) спрямо експериментална невроинфекция с коксакивирус В1 в новородени мишки	17
1.1. Ефект на комбинацията PGO върху съдържанието на инфекциозен вирус в мозъците на третираните мишки	20
1.2. Чувствителност на вирусните мозъчни изолати към плеконарил след третиране на животните с PGO в САА курс	21
1.3. Чувствителност на вирусните мозъчни изолати към оксоглауцин след третиране на животните с PGO в САА курс	22
2. Изследване на ефекта на тройната комбинация Pleconaril/MDL-860/Oxoglaucin (PMO) при последователно алтернативно редуване на съединенията (САА курс) спрямо експериментална невроинфекция с коксакивирус В1 в новородени мишки	23
2.1. Ефект на PMO по САА схема върху съдържанието на вирус в мозъците на третираните животни	29
2.2. Чувствителност към плеконарил на мозъчните изолати от животни третиран с PMO в САА курс	30
2.3. Чувствителност към MDL-860 на мозъчните изолати от животни, третиран с PMO в САА курс	32
2.4. Чувствителност към оксоглауцин на мозъчните изолати от животни третиран с PMO в САА курс	33
3. Генотипна характеристика на мозъчни изолати от мишки, заразени с CVB1	35
4. Изследване <i>in vitro</i> на индивидуалните ефекти на синтезирани диарил етери и техни аналози върху репликацията на ентеновируси - коксакивирус В1 (CVB1), коксакивирус В3 (CVB3) и полиовирус 1 Sabin (PV1). <i>In vivo</i> изследване на показателите висока активност съединения при <i>in vitro</i> скрининга	40
4.1. Анти-ентеновирусна активност на съединения 1a-12a	40
4.2. Анти-ентеновирусна активност на новосинтезирани съединения 13в-72в	47
4.3. QSAR анализ за антивирусна активност на 1a-12a и 13в-72в	57
4.4. QSAR анализ на новосинтезирани диарил етери и техните аналози като широкоспектърни антивирусни средства	61
4.5. <i>In vitro</i> антивирусна активност на съединения 73с-114с	63
4.6. QSAR моделиране, регресионен анализ, дискриминантен анализ и оптимизационна стратегия	82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	83
ПРИНОСИ	91

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

CAA – последователно редуващо прилагане
CAR – коксаки-аденовирусен рецептор
CC₅₀ – цитотоксична концентрация 50
CCID₅₀ – клетъчно-културелни инфекциозни дози 50
CDC – Center for Disease Control and Prevention
CREs – cis-acting RNA elements
CVB – коксакивирус В
CVA – коксакивирус А
cVDPV – циркулиращ ваксинален полиовирус
DAF – ускоряващ разпадането клетъчен фактор
DMSO – диметил сулфоксид
Е - еховируси
ED₅₀ – ефективна доза 50
eIF4G – еукариотен инициращ транслацията 4 гама фактор
EMCV – вирус на енцефаломиокардит
EPDA – end-point dilution assay
EV – ентеровирус
FDA – Агенцията за контрол на храните и лекарствата на САЩ
FTIR – Фурие трансформираща инфрачервена спектроскопия
GBF1 – Голджи Брефелдин А устойчив гуанин нуклеотиден обменен фактор 1
HCV – хепатит С вирус
HEp-2 – човешки епителни клетки тип 2
HRV – човешки риновируси
IC₅₀ – инхибираща концентрация 50
ICAM-1 – вътреклетъчна адхезионна молекула-1
ICTV – Международен комитет за таксономия на вирусите
IgSF – суперсемейство имуноглобулини
IRES – вътрешен сайт за навлизане в рибозомата
LC-MS – течна хроматография с маспектрометрия
LDLR – липопротеинов рецептор с ниска плътност
MDL-860 – тривиално наименование на съединението 2-(3,4-дихлорофенокси)-5-нитробензонитрил
MIC₅₀ – минимална инхибираща концентрация 50
MLD₅₀ – миша летална доза 50
MST – средно време на преживяемост
NESS – Национална система за наблюдение на ентеровирусите
NPEV – не-полиомиелитни ентеровируси
NTR – нетранслиращ се регион
NR – неутрално червено
OPV – орална полио ваксина
ORF – отворена рамка на четене
OSBP – оксистерол-свързващ протеин
PABP – поли-А свързващ протеин
PBS – фосфатен буфер
PC – коефициент на протекция
PCBP – поли-С свързващ протеин
PFU – плакоформиращи единици
PGO – плеконарил/гуанидин хидрохлорид/оксоглауцин
PI – индекс на протекция
PI4KB – фосфатидилинозитол 4-киназа бета
PMO – плеконарил/MDL-860/оксоглауцин
Pvr – полиовирусен рецептор CD155
RBP – РНК-свързващ протеин

RdRp – РНК-зависима РНК-полимераза
RGD – аргинин-глицин-аспартамова киселина
SEM - сканираща електронна микроскопия
SI – селективен индекс
UTR – нетранслиращ се регион
VLA-2 – интегрин $\alpha 2\beta 1$
VP – вирусен протеин
VPg – the Viral Protein of the genome
МНС – главен комплекс за тъканна съвместимост
ОП – оптична плътност
РНК – рибонуклеинова киселина
РПК – рибонуклеопротеинов комплекс
СЗО – Световна здравна организация
ЦНС – централна нервна система
ЦПЕ – цитопатичен ефект

УВОД

Ентеровирусите (EV) са най-разпространените човешки патогени, които засягат всички възрастови групи, но най-уязвими са децата и високо-рисковите групи, а именно пациенти с компрометирана имунна система и новородени. EV могат да причинят широк спектър от заболявания, поражаяйки ЦНС, сърцето, бета клетките на панкреаса, скелетната мускулатура и др. Тези вируси могат да причинят симптоми, наподобяващи т. нар. обикновени настинки, които биха могли да доведат до усложнения като развитието на хронична обструктивна белодробна болест и кардиомиопатия. Въпреки, че съществуват повече от 280 човешки EV серотипа, само срещу четири серотипа има лицензирани ваксини (срещу трите типа полиовирус и ентеровирус А-71). Именно поради необичайно големия брой ентеровирусни серотипове, причинители на клинични заболявания, очевидно установяването и въвеждането на ваксинация в близко бъдеще няма да бъде възможно. Много важна стратегия в борбата с ентеровирусните инфекции е разработването на лекарства за инхибиране на вирусната репликация, които са директно насочени към вирусен протеин, но основният проблем е бързата поява на резистентни към съответните лекарства вирусни мутанти като следствие от високия процент на мутации, които се случват при РНК вирусите. Един подход за преодоляване на този проблем е да се използва комбинирана терапия от няколко антивирусни съединения, които са насочени към различни вирусни протеини. Друга възможна перспективна стратегия е разработването на съединения, които пречат или модулират функцията на факторите на гостоприемника, които играят критична роля в репликативния цикъл на вируса. Тъй като е малко вероятно факторите на гостоприемника да мутират и да развият резистентност в отговор на терапията, те са привлекателни мишени за антивирусните лекарства. Важно е, че този подход „насочване към гостоприемника“ може да позволи разработването на широкоспектърни инхибитори, тъй като всички вируси в рамките на един род или дори в рамките на цялото семейство обикновено експлоатират едни и същи фактори на гостоприемника. Потенциален недостатък на насочените към гостоприемника съединения е, че интерференцията с клетъчна мишена може да бъде свързана с токсични странични ефекти. В опит да бъдат открити ефективни антиентеровирусни химиотерапевтици са изпитани голям брой съединения с антиентеровирусен ефект като голяма част от тях инхибират вирусната репликация *in vitro*, много малка част от тях са активни *in vivo* и все още няма наличен ефективен лекарствен препарат, одобрен за приложение в клиниката. Тези вещества, които са достигнали до клинични изпитвания, проявяват нежелани странични ефекти, като ниска избирателност, висока токсичност, както и неблагоприятни фармакокинетични (например лоша бионаличност, бърз метаболизъм, кратък полуживот) и фармакодинамични характеристики (като слаба ефикасност или нежелано взаимодействие с други молекули).

Няма съмнение, че създаването на ефективна химиотерапия би било от голяма полза в борбата с ентеровирусите и в момента усилията трябва да бъдат насочени към разработването на ефективни антивирусни средства за етиотропно лечение на тези инфекции.

Нашият изследователски екип от години провежда проучвания в областта на антивирусната химиотерапия и продължава интензивната си работа, насочена към идентифициране и разработване на перспективни антиентеровирусни химиотерапевтици. Основната цел на тези изследвания е откриването на молекули с висок инхибиторен потенциал спрямо ключови етапи от репликативния цикъл на ентеровирусите, което би могло да допринесе за разработването на нови терапевтични стратегии.

ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР

В Лабораторията по експериментална химиотерапия на ентеровирусните инфекции към Института по микробиология „Стефан Ангелов“ – БАН в продължение на години се извършват целенасочени изследвания в областта на антивирусната химиотерапия. Проучванията, свързани с прилагането на монотерапевтични режими с ентеровирусни инхибитори, разкриват бързото развитие на резистентни вирусни мутанти (*Nikolova, I., 2003; Nikolaeva-Glomb, L., 2008*). В отговор на този предизвикателен проблем са инициирани изследвания върху комбинираната терапия, базирана на инхибитори, насочени към различни етапи от репликативния цикъл на ентеровирусите (*Nikolaeva-Glomb, L. and Galabov, A.S., 1995, 1999, 2000, 2004*).

Трябва да се отбележи, че Лабораторията взе активно участие в усилията за справяне с пандемията от COVID-19 чрез провеждане на изследвания в рамките на различни научни разработки:

В контекста на глобалните предизвикателства като възникването на нови вирусни патогени (SARS-CoV-2, различни щамове на грип и др.), както и появата на устойчиви бактериални и вирусни щамове, беше разширен спектърът от научни направления и подходи, които да адресират не само лечението, но и ефективната превенция на инфекциите. Съвременната вирусология все повече изисква интеграция на интердисциплинарни методи и разработки, насочени към ограничаване на разпространението на патогени още на етапа на контакт със заобикалящата среда. От тази гледна точка, изследването и валидирането на текстилни материали с антимикробни и антивирусни свойства естествено се вписва в мисията и дейността на вирусологичните лаборатории. Тези материали имат ключово значение за създаването на лични предпазни средства (маски, ръкавици, медицински текстил), както и за ограничаване на фомитно предаване на вируси в болнични и обществени условия. В условията на засилена глобална мобилност и бързо възникване на нови патогени, разработването на такива материали съчетава превенция и безопасност.

Бяха тествани различни антивирусни и антимикробни материали, които са разработени чрез иновативни подходи и които биха допринесли за ограничаване разпространението на вирусни и бактериални инфекции, включително тези, причинени от SARS-CoV-2 и други респираторни патогени. В този контекст беше проведено цялостно изследване, включващо органичен синтез, охарактеризирането и биологичната оценка на нови биомолекулни пептидни аналози и функционализирани текстилни материали. Лабораторията разполага със специфичен капацитет и експертиза за прецизна оценка на антивирусната ефективност на разработваните материали, чрез:

- (i) *In vitro* тестове с клинично значими вирусни модели, като човешки респираторен синцитиален вирус (HRSV-S2), човешки аденовирус (HAdV-5), човешки коронавирус ОС 43 и 229Е и др.;
- (ii) Методики за количествена и качествена оценка на вирусна инактивация и редукция на вирусния титър върху различни повърхности;
- (iii) Възможност за съпоставка между различни стратегии за функционализация на текстила (пептидни производни, метални комплекси, биополимери с наночастици).

По време на пандемията, като част от работата в лабораторията, съвместно с екип от Химикотехнологичен и металургичен университет (ХТМУ-София), бяха тествани новосинтезирани N- и C-модифицирани биомолекулни пептидни аналози на VV-хеморфин-5 и VV-хеморфин-7 с разнообразни функционални групи, включително аминокиселини като цистеин, глутаминова киселина и хистидин, както и 1-адамантанкарбоксиллова киселина и ниацин (никотинова киселина) (*Todorov, P. et al., 2022*). Синтезът е осъществен чрез твърдофазен пептиден синтез по метода Fmoc (9-флуоренилметоксикарбонил). Получените съединения са характеризирани в различни водни среди с вариращо рН посредством UV-Vis, флуориметрични и електрохимични техники, като е изследвано тяхното киселинно-основно поведение, кинетика и стабилност при физиологични условия. Резултатите показаха запазване на структурната и конформационна цялост на съединенията при взаимодействие със светлина и електричество, което е особено важно при разработката на биоматериали, приложими в медицински условия.

С оглед необходимостта от повишена защита в здравни заведения и обществени пространства по време на пандемията, изследванията ни бяха насочени към тестване за вирусоциден ефект на имобилизирани биоактивни съединения върху текстилни материали, в частност памучни влакна. Проведените FTIR (Fourier-transform infrared spectroscopy) и SEM (Scanning Electron Microscopy) анализи доказаха успешното свързване на пептидите към повърхността на текстила, като бе установено, че дори след изпиране с алкален сапунен разтвор модифицираната структура остава стабилна. Като част от изследването, бяха изследвани новосинтезирани три N-модифицирани аналога на хеморфин-4 с родамин В (*Todorov, P. et al., 2021*). С помощта на хлороацетилова модификация, хлоридна памучна тъкан беше успешно боядисана с тези пептидни деривати и бяха определени цветните координати на обработените текстилни материали. Анализирани бяха основните физикохимични свойства на новите съединения, включително влиянието на рН и типа на разтворителя върху тяхното поведение. Резултатите показват, че чрез промяна на рН може да се осъществи прецизен контрол върху боядисването на текстила. Особено внимание бе отделено на тестването на антивирусната и вирусоцидната активност на новите пептидни производни и модифицираните текстилни материали срещу човешкия респираторен синцитиален вирус (HRSV-S2) и човешкия аденовирус серотип 5 (HAdV-5) като моделни вируси с респираторна

патогенност. В този контекст бе демонстрирано, че най-активно съединение е Rh-3, като активността се запазва дори след нанасянето на съединенията върху памучните влакна. Тези резултати имат практическо значение при създаването на защитни текстилни продукти с допълнителна биозащитна функция, приложими в болнична среда.

Паралелно с това бяха тествани за антивирусна и вирусоцидна активност комплексни съединения на мед (II) с пептидни мотиви на хеморфин в алкални водни разтвори (Georgieva, S. et al., 2023), а също и медни комплекси на хиперразклонени полимери, модифицирани с дансилиеви единици (Bosch, P. et al., 2020). Комплексообразуването беше количествено определено чрез волтаметрични и спектрални анализи (UV-Vis, флуориметрия), като бяха установени стехиометрията и стабилността на комплексите. Получените комплекси бяха успешно използвани за модификация на памучни влакна, като синергичното действие на медните йони допринесе за повишаване на антивирусната защита на текстилния материал.

Като допълнителна мярка за усилване на антимикробната защита, в условията на пандемията беше изследвана и модификацията на текстил с хитозанови филми, включващи бензалдехид и частици цинков оксид, с цел подобряване на антимикробните и вирусоцидни свойства на памучната тъкан (Staneva, D. et al., 2023). Модификацията е осъществена чрез кръстосано свързване с глутаралдехид, а включването на ZnO частици е реализирано *in situ*. Проведени са множество аналитични техники (контактен ъгъл, SEM, FTIR, термичен анализ), които потвърдиха успешната функционализация на текстилната повърхност. Получените материали показаха обещаваща антимикробна и вирусоцидна активност, като частиците ZnO напълно инхибираха растежа на моделни бактериални и гъбични щамове, а самият филм демонстрира висока ефективност срещу HAdV-5 и HRSV-S2.

Проучена бе антивирусната активност на синтезиран нов водоразтворим полиамидамино (PAMAM) дендример, модифициран с 4-сулфо-1,8-нафталимид (DSNI), и неговият мономерен структурен аналог (MSDI). Изследвана беше тяхната *in vitro* микробиологичната активност срещу два вируса - HRSV-2 (човешки респираторен синцитиален вирус тип 2) и HAdV-5 (човешки аденовирус тип 5). Резултатите показват, че тези съединения притежават антивирусна активност, особено изразена срещу обвитите вируси (HRSV-2 и HAdV-5). Антивирусната активност се наблюдава както в разтвори, така и след нанасяне на съединенията върху памучни тъкани, което ги прави подходящи за създаване на антивирусни текстилни материали. След обработката на памучни тъкани с новите съединения, се установи, че микробиологичната активност се запазва, показвайки дълготрайния ефект на дендримера върху текстилните материали. Това е важно за потенциалната им употреба в антивирусни и антибактериални тъкани, които биха могли да се използват за облекла или медицински изделия (Said, A. et al., 2024). Също така бе оценена и антивирусната активност и цитотоксичност на фотоактивни PAMAM дендримери,

модифицирани с 1,8-нафталимиди. Резултатите показаха, че имат голям потенциал за приложение в антибактериални текстилни материали и фотодинамична антибактериална терапия, благодарение на способността им да генерират синглетен кислород и да инхибират бактериалния растеж (Manov, H. et al., 2021).

Изследван и охарактеризиран бе новосинтезиран анионен дендример (D1) чрез модифициране на поли(амидоамин) (РАМАМ) дендример с 3-(6-нитро-1,3-диоксо-1H-бензо[de]изохинолин-2(3H)-ил)пропанова киселина (N11). Въпреки че дендримерът показва малко по-ниска антимикробна активност от мономера, той е значително по-малко цитотоксичен. D1, нанесен върху памучната тъкан, предотвратява образуването на бактериален биофилм върху повърхността. Получените резултати показват, че новият анионен дендример има потенциал за приложение в антибактериални текстилни материали, които могат да бъдат използвани за превенция на бактериални инфекции (Staneva, D. et al., 2020). Чрез периферна модификация на първогенерационен полипропилен-амин дендример са синтезирани два нови фотоактивни дендримера: 4-диметиламино-1,8-нафталимид и 3-бromo-4-диметиламино-1,8-нафталимид. Тествана е антивирусната активност на дендримерите в разтвор и след нанасяне върху памучна тъкан. Резултатите показаха, че фотоактивните дендримери проявяват потенциал за приложение в антимикробната фотодинамична терапия, което ги прави обещаващи кандидати за иновативни медицински и текстилни материали с антимикробни свойства (Staneva, D., et al., 2020).

Пандемията от COVID-19 стимулира значителен напредък в научните изследвания с цел откритие на нови лекарства и терапевтични подходи за борба с вирусни инфекции. В този контекст, тестването на растителни екстракти предлага новаторски стратегии за справяне с нововъзникналите вирусни заплахи и осигуряване на алтернативни или допълващи антивирусни терапии, които да бъдат интегрирани в комбинирани терапевтични подходи. Това е от съществено значение, особено за вируси, за които все още не съществуват ефективни терапевтични средства.

В нашата вирусологична лаборатория бяха извършени обширни изследвания на антивирусната активност на различни природни съединения срещу широк спектър от вируси както облечени, така и необлечени РНК и ДНК вируси, като респираторно-синцитиален вирус (HRSV-2), коронавирус (HCoV OC-43), риновируси (HRV-14), аденовируси (HAdV-5), полиовируси (PV-1) и други. Например, екстракти от *Rhus typhina* и *Hypericum perforatum* демонстрираха антивирусна активност срещу обвити вируси като херпес симплекс вирус тип 1 (HSV-1) и коронавирус HCoV OC-43, като показват по-силна активност срещу обвити вируси в сравнение с необвитите като аденовирус тип 5 (HAdV-5) и риновирус HRV-14 (Antov et al., 2019). Прополисът също демонстрира антивирусна активност срещу редица вируси, включително херпес вируси, коронавируси и риновируси. Проучванията показаха, че прополисът инхибира етапите на вирусната адсорбция и осигурява защитен ефект върху здравите клетки

при предварителна обработка с екстракта (*Vilhelmova-Ilieva et al.*, 2023). Други изследвания на екстракти от *Lycium barbarum* и метилксантини от чаените листа на *Puerh* и *Bancha* показаха значителен инхибиторен ефект върху вируса на херпес симплекс тип 1 (HSV-1), като резултатите са обещаващи и за инфекции с други обвити вируси (*Vilhelmova, N. et al.*, 2022). При екстракти от *Geum urbanum* бе отчетена значителна антивирусна активност срещу аденовирус тип 5 и херпес вирус тип 1, като инхибират репликацията на вирусите и осигуряват защитен ефект върху клетките, без да проявяват токсичност към здрави клетки, което ги прави безопасни за терапевтични приложения (*Zaharieva et al.*, 2022). Също така, изследвания на екстракти от 13 лечебни растения от българската флора показаха, че всички изследвани екстракти намаляват вирусния добив при широк спектър от вирусни инфекции, което ги прави перспективни кандидати за природни антимикробни и антивирусни средства (*Nikolova et al.*, 2022).

Допълнително, антивирусният ефект на етеричното масло от корените на *Carlina acanthifolia* срещу човешкия полиовирус-1 (LSc-2ab) показва, че то инхибира адсорбцията на вирусните частици върху клетки HEp-2 (Human epithelial type 2) (*Saralieva et al.*, 2022). Лактозовият октакоацетат показва антивирусна активност срещу полиовирус 1 (PV-1), но не показва ефект срещу HSV-1, вируса на грип и коксакивирус B1 (*Arabadzhieva et al.*, 2022).

Тези резултати подчертават значението на растителните екстракти и природните съединения като перспективни кандидати за разработване на нови антимикробни и антивирусни терапии. Изследванията показват, че тези съединения могат да намаляват вирусното натоварване и да предотвратят инфекцията чрез различни механизми на действие, което открива нови възможности за създаване на ефективни антивирусни терапии, базирани както на природни продукти, така и на иновативни материали, които могат да бъдат използвани в контекста на пандемични заплахи и бъдещи вирусни инфекции.

Централно място в нашите изследвания заема разработването и внедряването на нова схема за комбинирано прилагане на анти-ентеровирусни вещества при коксаки B1 невроинфекция в новородени мишки. Това нововъведение представлява едно от най-перспективните постижения в нашата лаборатория, тъй като осигурява значителен напредък в терапевтичните стратегии срещу ентеровирусните инфекции. Разработената схема не само разширява възможностите за лечение, но и предоставя нова платформа за бъдещи изследвания върху ефективността и механизма на действие на комбинираните антивирусни терапии. Тази схема е въведена от акад. Ангел Гълъбов, пионер в областта на ентеровирусните изследвания в България. Този курс на лечение се състои в последователно редуващо се (CAA - consecutive alternating administration), а не едновременно, прилагане на веществата в комбинацията и е новост в химиотерапията на вирусните инфекции (*Galabov, A.S. et al.*, 2015). При тази схема на лечение се скъсява времето за въздействие на инхибиторите и по този начин

се избягва селекцията на резистентни мутанти. Бе подбрана една тройна комбинация – дизоксарил-гуанидин хидрохлорид-оксоглауцин (DGO) (Vassileva-Pencheva, R. et al., 2010; Galabov, A.S. et al., 2012), показваща добра антивирусна активност. Нейната ефективност се изразява в отчетливо намаляване на смъртността на заразените животни, при сравнение с плацебо групата, с групите третирани ежедневно с монотерапевтичен курс от партниращите си в комбинацията вещества, както и с комбинацията DGO при ежедневно едновременно прилагане на трите съединения. Впоследствие ние допълнително проучихме САА подхода за комбинирано прилагане на анти-ентеровирусни съединения с доказан ефект чрез замяна на дизоксарил с плеконарил (Stoyanova, A. et al., 2015), едно от най-ефективните WIN съединения (Pevear et al., 1999, Hayden et al., 2003), включено в клинични изпитвания. Второто съединение в комбинацията плеконарил/гуанидин-HCl/оксоглауцин (PGO), гуанидин-HCl, е „класически“ ентеровирусен инхибитор, който пречи на функцията на 2C протеина, като по този начин предотвратява инициирането на синтез на отрицателна РНК верига (Loddo, B. et al. ., 1962 г., Barton, D.J., et al., 1997 г.). Третият партньор, оксоглауцин, е съединение от растителен произход, което специфично инхибира репликацията на широк спектър от ентеровируси (Nikolaeva-Glomb, L. et al., 2008). Неговият механизъм на действие е подобен на enviroxime, насочен към кодиращия регион 3A (Arita, M. et al., 2015). В следващ етап от нашата експериментална работа решихме да заменим втория компонент в комбинацията (гуанидин-HCl), който не показва *in vivo* ефект при монотерапевтичен курс (Caliguiri, L.A et al., 1973) с друг инхибитор - съединението 2-(3,4-дихлорофенокси)-5-нитробензонитрил (MDL-860) (Pürstinger G et al., 2008). Този продукт на Merrill-Dow Pharmaceuticals (синтезиран първоначално от L. Markley) се отличава с широкия си анти-EV обхват и с неговите *in vivo* ефекти върху кардиотропната CVB3 инфекция при възрастни мишки (Padalko, E. et al., 2004). Мишена на действие на съединението е клетъчният фактор фосфатидилинозитол-4-киназа IIIβ (Arita, M., et al., 2017). При третирането на мишки с тази комбинация (PMO – плеконарил/MDL-860/оксоглауцин) се постигна оптимален ефект, изразен чрез приблизително 2-дневно увеличение на средното време на преживяване при дневна доза от 75 mg/kg и се предотвратява развитието на лекарствена резистентност . При по-ниски дози съединението е неактивно, а при по-висока доза от 100 mg/kg ефектът му намалява. (Stoyanova, A. et al., 2016).

Без съмнение, това съединение е важна отправна точка за разработването на ефективна анти-ентеровирусна химиотерапия, поради своя специфичен механизъм на анти-ентеровирусно действие. За да се усили анти-ентеровирусния ефект на този тип съединения (MDL-860 аналози), съвместно с екип от химици (доц. Добриков, дхн и екип) от Института по органична химия-БАН, в съвместни проекти към ФНИ бяха проведени изследвания в две основни направления:

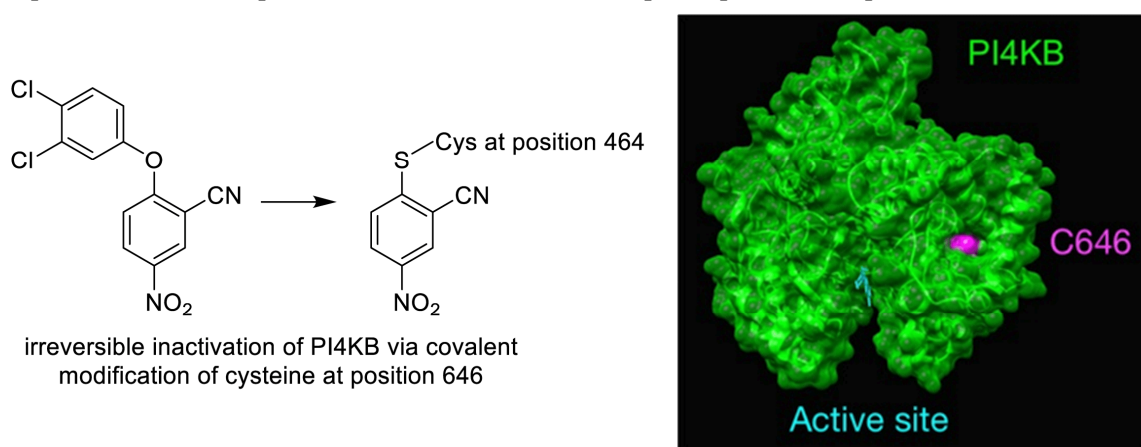
1. Изпитване ефективността на комбинирана терапия (по САА) от анти-ентеровирусни съединения с включен партньор MDL-860 при експериментална невротропна коксаки В1 вирусна инфекция в новородени мишки.

2. Изпитване на анти-ентеровирусния ефект *in vitro* и *in vivo* на новосинтезирани аналози на MDL-860, включително провеждане на анализ на зависимостта структура-активност, и на тази основа - насочен синтез на съединения с по-силен ефект (Pürstinger, G et al., 2008).

По отношение на нашите проучвания за комбинирана терапия на анти-ентеровирусни вещества по схемата на последователно редуващо прилагане при коксаки В1 невроинфекция в новородени мишки, в настоящата дисертация са описани резултатите от изследванията, проведени с тройните комбинации: Плеконарил/Гуанидин хидрохлорид/Оксоглауцин (PGO) и Плеконарил/MDL-860/Оксоглауцин (PMO).

В търсене на мощни анти-ентеровирусни съединения, ние се спряхме на споменатото по-горе съединение MDL-860 (известно още и като DNB), което заслужава специален интерес и без съмнение е важна отправна точка за разработването на ефективна анти-ентеровирусна химиотерапия, поради своя специфичен механизъм на анти-ентеровирусно действие. Съединението спада към нитробензеновите производни и за първи път е съобщено през 80-те години на миналия век. В експериментални постановки показва висока активност *in vitro* срещу редица пикорнавируси. В постановка на плако-инхибиращ тест е установено, че значително намалява броя на плаките, формирани от еховирус 12, риновируси и коксакивирус В4, като инхибиращите концентрации на веществото варират от 0.125 μM до 0.5 μM (Torney, H.L. et al., 1982). Концентрация от 1 $\mu\text{g/mL}$ (3.2 μM) намалява вирусния добив при 80% от изследваните еنتеровируси. В концентрация 50 $\mu\text{g/mL}$ не оказва влияние върху херпес симплекс тип 1, грипен вирус А, парагрипен вирус 1, и други, което е в потвърждение на селективния анти-ентеровирусен ефект на MDL-860 (Powers, R.D. et al., 1982). Механизмът на действие на веществото е изяснен, установено е, че е подобен на енвироксим – действа в ранните етапи на вирусния репликативен цикъл, инхибирайки вирус-специфичния РНК синтез посредством алостерично регулиране на активността на клетъчния фактор phosphatidylinositol-4 kinase III beta (PI4KIII β). Третирането с MDL-860 води до ковалентна модификация на ензима PI4KIII β , като мишена на съединението е аминокиселината цистеин на 646 позиция в PI4KIII β , която се намира в основата на повърхностния джоб встрани от активния център на ензима (Arita, M. et al., 2017) (Фигура 8). Обещаващите резултати вдъхновиха разработването на много аналози на MDL-860 през последните десетилетия. През 1986 г. Markley и екип правят първото мащабно изследване, което включва синтеза на десетки нови аналози на DNB и изследване на *in vitro* активността им срещу пикорнавируси. Синтезирани са над 70 нови диарилетери (и техните изостерични аналози), групирани в 4 серии, като поне по 1-2 представители от всяка група са

показали висока активност (от порядъка на тази на референтното съединение DNB) спрямо два вида риновируси и коксакивирус A21. Проявява се тенденция почти всички съединения да показват изключително ниска цитотоксичност (Markley, L.D. et al., 1986). Последната работа на Pürstinger и екип докладва за синтеза на 60 нови диарил етера, които имат като постоянен елемент ароматно ядро, съдържащо CN и NO₂ групи и тяхната активност срещу CVB3 репликация (Pürstinger, G et al., 2008). Всички получени резултати ясно показват, че 2-циано-4-нитрофенокси групата на този клас съединения, е особено важна за да покажат антивирусна активност. Промяната на заместителите в другия ароматен пръстен обаче може да има допълнително значително влияние както върху антивирусната активност, така и върху цитотоксичността. Идентифицираните активни съединения обикновено съдържат от два до три халогенни атома във втория ароматен пръстен.



Фигура 8. Механизъм на действие на MDL-860 (Arita et al, 2017).

Опирайки се на постигнатото преди нас в областта на антивирусната активност на диарил етери (особено данните на Pürstinger et al. от 2008 г.), както и на задълбочени проучвания в сериозни химически бази данни като Reaxys и SciFinder, участвахме в успешно приключил проект, спечелил финансиране от ФНИ през периода 2014-2018 г. В рамките на проекта бяха тествани за антиентеровирусна активност *in vitro* и *in vivo* на изцяло нови аналози на MDL-860, които имат като постоянен елемент ароматно ядро съдържащо CN и NO₂ групи. За разлика от предишните изследвания, ние тествахме голям брой много по-разнообразни по структура нови аналози на MDL-860, с цел да разберем доколко едни по-значими промени в молекулата му влияят на антивирусната активност. Тези по-значителни промени, които досега не са правени, бяха оптимизирани чрез методите за синтез не само на диарил етерите, но и на диарил амини и диарил сулфиди, явяващи се изостери на диарил етерите. Изключителните успехи бяха продължени с подкрепата на втори проект с ФНИ (2019-2025 г.), когато бяха получени още по-голям брой активни аналози на MDL-860. Бе потвърдено, че най-активни сред тях са именно диарил етерите, но не и техните серни или азотни аналози (диарил амини и диарил сулфиди). Установи се също така

че някои диарил етери имат *in vitro* активност и срещу други вируси (извън ентеровирусите).

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящия дисертационен труд:

Да се проведе *in vitro* и *in vivo* изследване на антиентеровирусната ефективност на инхибитора на клетъчната фосфатидилинозитол-4-киназа бета (PI4KB) MDL-860, както и на библиотека от новосинтезирани негови аналози, за да бъдат идентифицирани по-ефективни и безопасни химиотерапевтични агенти, които биха могли да бъдат приложени както в комбинирани терапевтични схеми, така и в монотерапевтични курсове за лечение на ентеровирусни инфекции.

Поставени бяха следните задачи:

1. *In vivo* изследване на терапевтична схема основана на последователно редуващо се прилагане (САА) на анти-ентеровирусни съединения с включен MDL-860, и оценка на нейния потенциал за преодоляване на феномена лекарствената резистентност при експериментална невротропна инфекция с коксаки В1 вирус в мишки.
2. *In vivo* изследване на токсичността на тройни комбинации от инхибитори на ентеровирусната репликация при лечебни курсове чрез последователно и едновременно прилагане на съединенията.
3. Изследване на фенотипния маркер инхибираща концентрация 50% (IC₅₀) на вирусната популация, изолирана от таргетните органи на животните, подложени на лечебни курсове с комбинации и с монотерапевтични курсове със съединенията-партньори, участващи в комбинациите.
4. Определяне чувствителността на вирусните мозъчни изолати от различните тестови групи към изпитваните анти-ентеровирусни съединения по плаков метод.
5. Изследване на генотипните характеристики на вирусната популация, изолирана от таргетния орган на животните, подложени на лечебни курсове, включващи комбинациите, и на монотерапевтични курсове със съединенията-партньори в комбинациите.
6. *In vitro* изследване на цитотоксичността на новосинтезираните производни на MDL-860 в клетъчна линия HEp-2.
7. *In vitro* изследване на индивидуалните ефекти на новосинтезираните аналози на MDL-860 върху репликацията на ентеровируси - коксакивирус В1 (CVB1), коксакивирус В3 (CVB3) и полиовирус 1 Sabin (PV1) в клетки HEp-2.
8. *In vivo* изследване при експериментална невротропна коксаки В1 вирусна инфекция в новородени мишки на новосинтезираните аналози на MDL-860, показали висока антивирусна активност в клетъчни култури.

9. *In vitro* изследване на ефекта на двойни комбинации от подбрани (показали отчетлива активност) новосинтезирани аналози на MDL-860, с инхибитори на ентеровирусната репликация с различен механизъм на действие върху репликацията на коксаки В1 вирус.
10. *In vitro* изследване на цитотоксичността и антивирусния ефект на новосинтезирани аналози на MDL-860 върху репликацията на човешки коронавирус OC43 (HCoV OC43) и човешки аденовирус тип 5 (HAdV-5) в клетки HCT-8 и HEp-2, съответно.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

- **Референтни инхибитори на ентеровирусната репликация:**
Pleconaril (WIN 63843, Picovir®) 3-{3,5-dimethyl-4-[3-(3-methyl-1,2-isoxazol-5-yl)propoxy]phenyl}-5-(trifluoromethyl)-1,2,4-oxadiazole
MDL-860 (DNB) 2-(3,4-Dichlorophenoxy)-5-nitrobenzonitrile
Охоглаусин{1,2,9,10-tetramethoxy-7 h-dibenzo[de,g]quinolin-7-on},
апорфиноиден алкалоид от *Glaucium flavum* Cranz
Гуанидин хидрохлорид (CH₆ClN₃)
 - **Изпитвани съединения** – 114 новосинтезирани серии диарил етери и техни аналози
 - **Вирусни модели *in vitro***
Coxsackievirus B1, щам Connecticut (CVB1)
Coxsackievirus B3, щам Nancy (CVB3)
Poliovirus type 1, щам Sabin LSc-2ab (PV1)
Human coronavirus OC43 (HCoV OC43)
Human Adenovirus type 5 (HAdV-5)
 - **Вирусен модел за *in vivo* експериментите**
За експериментите *in vivo* е използван коксакивирус B1 (CVB1) невротропен щам Connecticut 5 (Conn-5).
 - **Клетъчни култури:**
HEp-2 (human epithelial type 2 cells човешки клетки от плоскоклетъчен карцином на ларинкса (Национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури, София)
HCT-8 – човешки клетки от колоректален аденокарцином (HRT-18, ATCC CCL-244)
 - **Опитни животни**
Мишките, използвани за *in vivo* опитите са random-bred бели новородени мишки от линията ICR, получени от Експерименталната и развъдна база за опитни животни (ЕРБОЖ, Сливница, България) към Българската академия на науките. Всички опитни процедури са провеждани съобразно с националните изисквания за експерименти с животни, които са в съответствие с Директивите на Европейския съюз (European Communities Council Directives 86/609/ EEC).
- ### 2. Методи
- **Определяне на вирусния инфекциозен титър**
 - **Определяне на индивидуалната цитотоксичност на изследваните съединения**
 - **Определяне на индивидуалния антивирусен ефект на изследваните съединения**

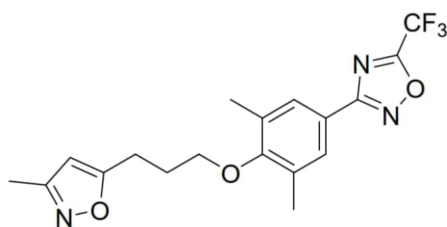
- Определяне на антивирусния ефект *in vitro* на двойни комбинации от изследваните вещества
- Определяне на комбинирана цитотоксичност *in vitro* на двойните комбинации от изследваните вещества
- Експериментална коксаки В1 вирусна инфекция в опитни мишки
- Определяне титъра на вирусите *in vivo*
- Изпитване *in vivo* на тройни комбинации от анти-ентеровирусни съединения
- Получаване на вирусни изолати от мозъка на мишки
- Определяне на титъра и плаково пречистване на мозъчните изолати *in vitro*
- Определяне чувствителността на вирусните изолати към изпитваните съединения по плаков метод
- RT-PCR и секвениране
- Статистически анализ

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

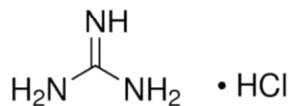
1. Изследване на ефекта на тройната комбинация Pleconaril/Guanidine-HCl/Oxoglaucin (PGO) при последователно алтернативно редуване на съединенията (САА курс) спрямо експериментална невроинфекция с коксакивирус В1 в новородени мишки

Изследван бе ефекта на тройна комбинация от анти-ентеровирусни инхибитори плеконарил-гуанидин HCl-оксоглауцин (PGO), приложена по схемата на последователно алтернативно прилагане (CAA) при новородени мишки, заразени с невротропния вирус CVB1 с вирусен инокулум (s.c. 20 LD₅₀ на мишка). Курсът на лечение започва в деня на вирусната инокулация (1 час след инокулацията) и продължава до края на периода на наблюдение (ден 12-ти). Успоредно с това проучихме ефекта от комбинацията PGO, прилаган едновременно всеки ден след инфекцията, и индивидуалните ефекти на съединенията-партньори в комбинацията. Плеконарил, като представител на WIN съединенията и един от най-активните анти-пикорнавирусни инхибитори, е изследван в няколко различни дози. Гуанидин-HCl и оксоглауцин са тествани при единична дневна доза от 48 mg/kg и 25 mg/kg, съответно.

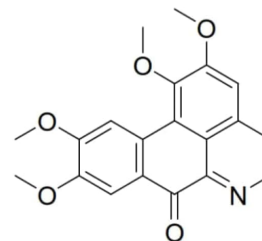
От данните в Таблица 3 се вижда, че лечебният курс по схема САА с комбинацията PGO проявява значителен протективен ефект при прилагане на плеконарил в дози от 25-200 mg/kg, изразяващ се в намаляване на кумулативната смъртност, PI между 31.3% и 67.7% и удължаване на средното време на преживяване (MST) с 4 до 6 дни. Едновременното ежедневно прилагане на PGO няма ефект.



Pleconaril



Guanidine-HCl



Oxoglaucine

Монотерапията с плеконарил демонстрира активност аналогична на тази при PGO комбинацията по САА курс, измерено чрез стойности на PI, при дози от 25–100 mg/kg (Фиг. 9). Активността на курса САА с PGO е представена съответно на Фиг. 10.

Таблица 3. Ефект на комбинацията PGO, приложена по САА схема при невроинфекция с CVB1 в новородени мишки.

Експериментални групи	Преживяли/общо ^a	Смъртност %	MST ± SD, дни ^b	PI%
P _{12.5} GO последователно	0/36	100.0	7.9 ± 0.3	0
P ₂₅ GO последователно	10/32 ^c	68.8	9.1 ± 0.4 ^{c,e}	31.3
P ₅₀ GO последователно	8/30 ^c	73.3	8.3 ± 0.2 ^c	26.7
P ₁₀₀ GO последователно	14/34 ^c	58.8	8.1 ± 0.1	41.2
P ₂₀₀ GO последователно	34/50 ^c	32.0	10.4 ± 0.2	68.0
P _{12.5} GO едновременно	0/27	100.0	4.8 ± 0.4	0
P ₂₅ GO едновременно	0/33	100.0	4.2 ± 0.4	0
P ₂₀₀ GO едновременно	0/24	100.0	3.8 ± 0.5	0
Pleconaril 12.5 mg/kg	0/26	100.0	7.4 ± 0.2	0
Pleconaril 25 mg/kg	14/45 ^d	68.9	7.9 ± 0.6 ^f	31.1
Pleconaril 50 mg/kg	8/29 ^d	72.4	7.5 ± 1.2	27.6
Pleconaril 100 mg/kg	14/32 ^d	56.3	7.9 ± 0.7	43.8
Pleconaril 200 mg/kg	10/29 ^d	65.5	9.9 ± 0.8	34.5
Oxoglucine 25 mg/kg	0/47	100.0	5.8 ± 0.3	0
Guanidine-HCl 48 mg/kg	1/20	95.0	4.5 ± 0.6	5.0
Pleconaril 25 mg/kg 2 days apart	0/23	100.0	4.4 ± 0.2	0
Placebo PBS	0/48	100.0	4.6 ± 0.9	0
Placebo per os	0/29	100.0	4.6 ± 0.3	0
Placebo последователно	0/35	100.0	4.0 ± 0.2	0
Placebo едновременно	0/35	100.0	3.9 ± 0.6	0

Данните са усреднени от три независими експеримента. MST, mean survival time – средно време на преживяемост; PBS, phosphate-buffered saline – фосфатен буфер; PI, protection index – индекс на защита; SD, standard deviation – стандартно отклонение.

^a Fisher's exact test

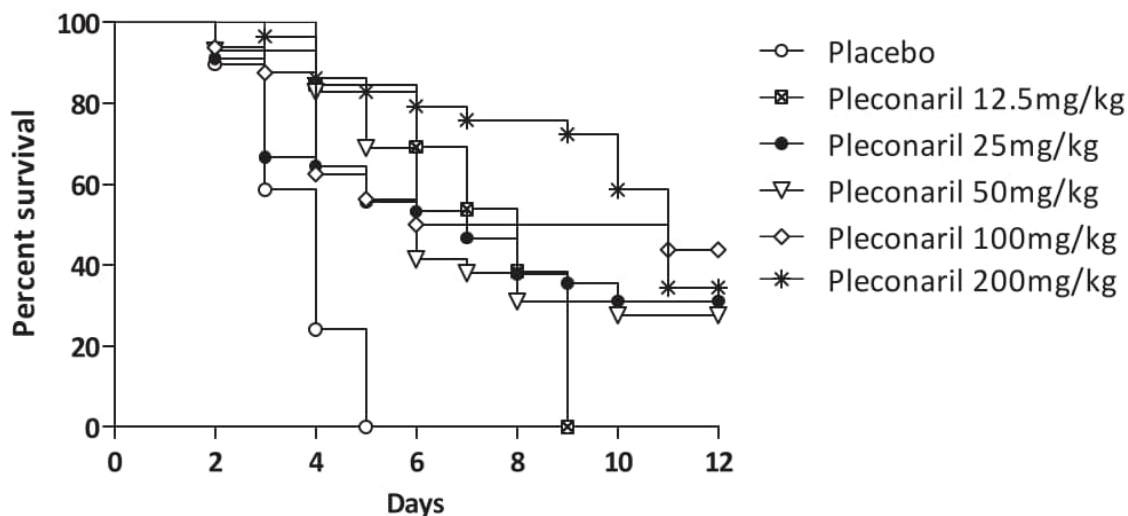
^b One-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparison post-test)

^c $P < 0.001$ към плацебо последователно

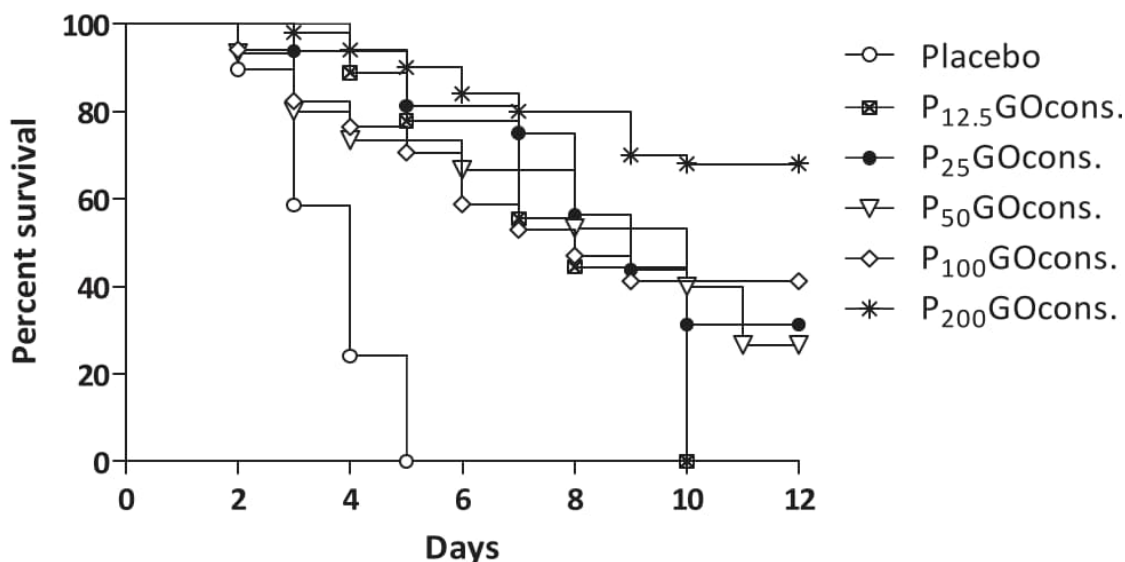
^d $P < 0.001$ към плацебо per os

^e $P < 0.001$ към плеконарил 25mg/kg през 2 дни

^f $P < 0.01$ към плацебо per os



Фигура 9. Преживяемост по дни на животните, лекувани при монотерапевтичен курс с плеконарил в различни дневни дози.



Фигура 10. Ефект на комбинацията PGO, приложена последователно срещу експериментална невротропна инфекция с коксаки В1 вирус в новородени мишки.

Въпреки това беше отчетено потискане на растежа в заразените мишки, особено при 200 mg/kg (Таблица 4). Този токсичен ефект на плеконарил обаче не се наблюдава при курса на САА в дози от 25–100 mg/kg. Очевидно това се дължи на това, че съединението се прилага веднъж на 3 дни. Еднократното приложение на плеконарил (25 mg/kg), прилагано на всеки 3 дни е неефективен (Таблица 3). Оксоглауцин (25 mg/kg) и монотерапиите с гуанидин-НCl (48 mg/kg) също са неефективни.

Таблица 4. Индивидуално тегло на новородени мишки в края на терапевтичния курс.

Плеконарил в дневна доза, mg/kg	Тегло на животните на 11 ^{ти} ден, грамове $\pm$ SD		
	Заразени и лекувани животни		Незаразени и не третиранни животни
	Монотерапия Плеконарил	PGO комбинация по САА курс	
25	5.0 $\pm$ 0.9	5.9 $\pm$ 0.5	6.2 $\pm$ 1.1
50	4.9 $\pm$ 1.1	5.8 $\pm$ 0.3	
100	4.2 $\pm$ 0.3	6.1 $\pm$ 0.8	
200	2.7 $\pm$ 0.3***	4.9 $\pm$ 0.5	

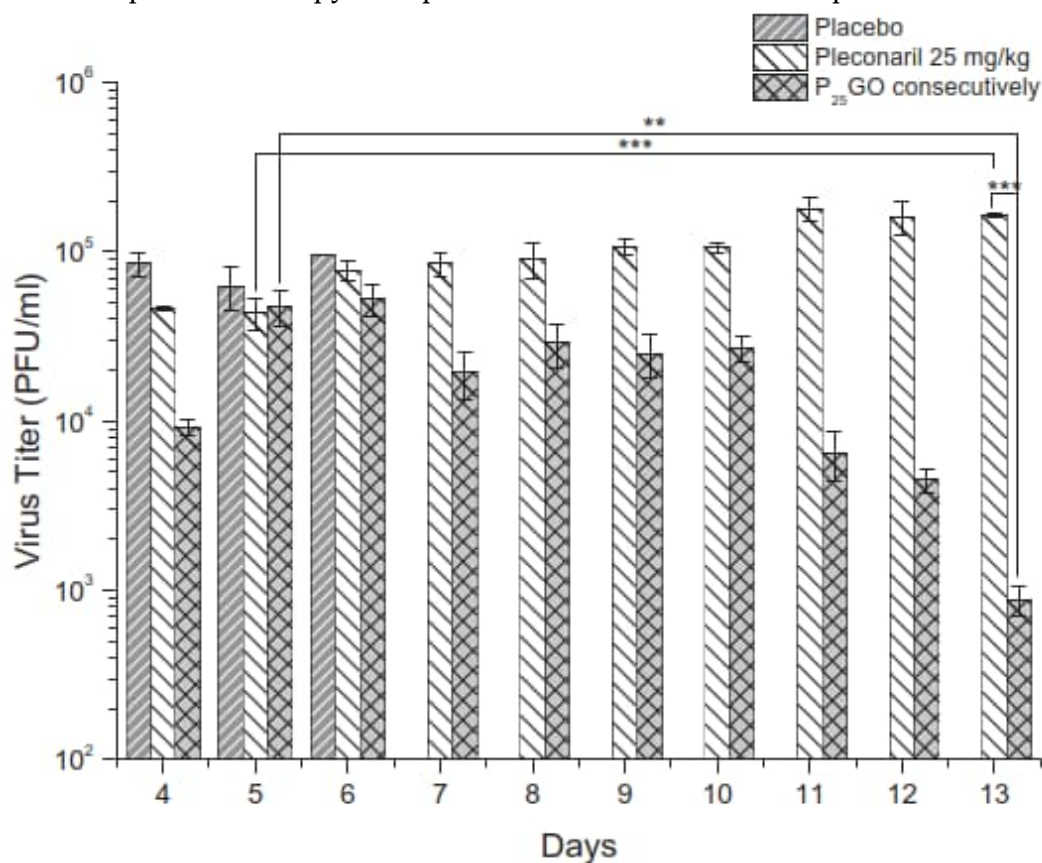
Данните са усреднени от най-малко три независими експеримента

One-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparison post-test)

*** P < 0.0001 към плацебо

1.1. Ефект на комбинацията PGO върху съдържанието на инфекциозен вирус в мозъците на третирани мишки

Фиг. 11 показва съдържанието на инфекциозен вирус в мозъчни изолати на мишка инфектирани с CVB1 и лекувани с комбинация от PGO, приложена последователно. Плеконарил се прилага в дневна доза от 25 mg/kg - най-ниската доза, показваща изразен антивирусен ефект и липса на токсичност при *in vivo* тестове.



Фигура 11. Инфекциозен вирусен титър в мозъчните изолати от групите Плацебо, монотерапия с плеконарил 25 mg/kg и PGO по САА.

Монотерапията с плеконарил не инхибира особено инфекциозния вирусен товар и се наблюдава увеличаване на инфекциозния титър до 11-ия ден след

инокулацията. Както е видно от Фиг. 11, комбинацията от PGO в САА курс на лечение значително намалява съдържание на инфекциозен вирус, особено в дните 10-13 след инокулацията. Плацебо групата има 100% смъртност след 6-ия ден след заразяването.

1.2. Чувствителност на вирусните мозъчни изолати към плеконарил след третиране на животните с PGO в САА курс

Определена бе чувствителността на изолирания вирус от мозъците на животни, заразени с CVB1 от групите, третирани с комбинацията по схемата САА и монотерапия с плеконарил чрез плако-инхибиращия тест на *Hermann-Siminoff*. От резултатите, показани в Таблица 5 се вижда, че чувствителността към плеконарил постепенно намалява при вируса, изолиран от групата, третирана с плеконарил, особено изразено след 8-ия ден от заразяването. Когато комбинацията PGO се прилага последователно, се наблюдава не само повишен инхибиторен ефект, но и отчетливо повишаване на чувствителността към плеконарил още на 5-ия ден и се запазва до 13-ия ден се наблюдава на дни 5–13 след инокулация, с максимум на 8-ия ден след заразяването. Това ясно се вижда при сравняване на стойностите на IC_{50} мозъчните проби от мишки, третирани с PGO по курса САА с пробите, изолирани от групите, подложени на монотерапевтичен курс с плеконарил. Едновременно приложение на комбинацията PGO показва бърза поява на резистентност към плеконарил, още на 3-ия ден след заразяването.

Таблица 5. Чувствителност към плеконарил в плако-инхибиращ тест на мозъчни изолати от мишки, заразени с CVB1.

Група	IC_{50} на плеконарил (μM) срещу CVB1 вирус изолиран от мозъчни проби взети на ден (4-ти до 13-ти ден)									
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Пла	0.069	0.046	0.053	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a
Пле	0.090	0.164 ^b	0.126	0.152	0.222	0.216	0.259	0.175	0.109	0.114
PGOп	0.065	0.0075 ^{b,c}	0.0076	0.0077	0.0042	0.0075	0.0083	0.0098	0.0076	0.0072 ^d
PGOе	0.132	0.130 ^b	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a

^a няма живи животни, 100% смъртност

Статистическият анализ е извършен с one-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparison post-test)

Пла – плацебо; Пле – плеконарил; PGOп – последователно редуване на съединенията от PGO; PGOе – едновременно прилагане на съединенията от PGO;

^b $P < 0.001$ към плацебо 5 ден

^c $P < 0.001$ към плеконарил 25 mg/kg 5 ден

^d $P < 0.001$ към плеконарил 25 mg/kg 13 ден

1.3. Чувствителност на вирусните мозъчни изолати към оксоглауцин след третиране на животните с PGO в САА курс

Значително повишаване на чувствителността на вируса към оксоглауцин, бе наблюдавано в мозъчните изолати от животни, третирани с PGO по схема САА (Таблица 6). В тази група най-висока е чувствителността на 7-ия ден след заразяването, където IC_{50} пада до най-ниското си ниво за целия изследван период – 0.32 μM . При едновременното ежедневно прилагане на PGO комбинацията бе отчетена намалена лекарствена чувствителност, със стойности на IC_{50} близки до тези, регистрирани при монотерапията с оксоглауцин.

Таблица 6. Чувствителност към оксоглауцин в плако-инхибиращ тест на мозъчни изолати от мишки заразни с CVB1.

Група	IC_{50} на оксоглауцин (μM) срещу CVB1 вирус изолиран от мозъчни проби взети на ден (4-ти до 13-ти ден)									
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Пла	1.019	1.379	1.063	-a	-a	-a	-a	-a	-a	-a
Окс	1.198	1.163	-a	-a	-a	-a	-a	-a	-a	-a
PGOп	1.596	1.598	0.360	0.322	0.495	0.855	0.341	0.594	0.998	0.775 [#]
PGOе	1.776	1.918	-a	-a	-a	-a	-a	-a	-a	-a

^a След 6-ти ден няма живи животни, 100% смъртност.

Статистическият анализ е извършен с one-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparison post-test)

Пла – плацебо; Окс – оксоглауцин; Пле – плеконарил; PGOп – последователно редуване на съединенията от PGO;

PGOе – едновременно прилагане на съединенията от PGO;

[#] $P < 0.01$ към PGO последователно 5-ти ден

Тази експериментална работа представя едно по-нататъшно развитие и потвърждение на последователно редуващо се приложение на тройна комбинация от инхибитори на ентеровирусната репликация, като при предишно проучване бе използвана комбинацията дизоксарил/гуанидин-HCl/оксоглауцин (Vassileva-Pencheva and Galabov, 2010; Galabov, A.S. et al., 2012) за лечение на инфектирани с невротропен CVB1 мишки, която демонстрира, че това е нова схема на лечение, която предотвратява развитието на лекарствената резистентност и осигурява значителна антивирусна активност. В нашата работа заменихме дизоксарила с плеконарил (WIN63843), който е едно от най-активните WIN съединения на ентеровирусната репликация (Groarke and Pevear, 1999; Pevear et al., 1999). Pleconaril показва изразена ефикасност при 2 от 3 новородени с ентеровирусен хепатит (Aradottir, W. et al., 2001) и изразена ефикасност срещу хроничен менингоенцефалит (78% подобрение с минимални неблагоприятни ефекти) (Rotbart and Webster, 2001), въпреки, че не е ефективен при двойно-сляпо изпитване на деца с ентеровирусен менингит, където са регистрирани два пъти повече неблагоприятни ефекти (Abzug, M.J. et al., 2003). Въпреки това във фаза III двойно-сляпо, плацебо-контролирано проучване,

плеконарил показва известна ефективност срещу индуцирани от Coxsackievirus A21 респираторни инфекции (обикновена настинка), когато лечението е започнало в рамките на 24 часа от първоначалните симптоми (Hayden, F.G. et al., 2003). Това проучване демонстрира значително предимство на PGO комбинацията, приложена по САА схема на лечение, а именно, че отрицателният ефект (потискане на растежа на животните) е преодолян. Очевидно, администрирането на плеконарил на всеки 3 дни избягва потенциалния токсичен ефект на съединението.

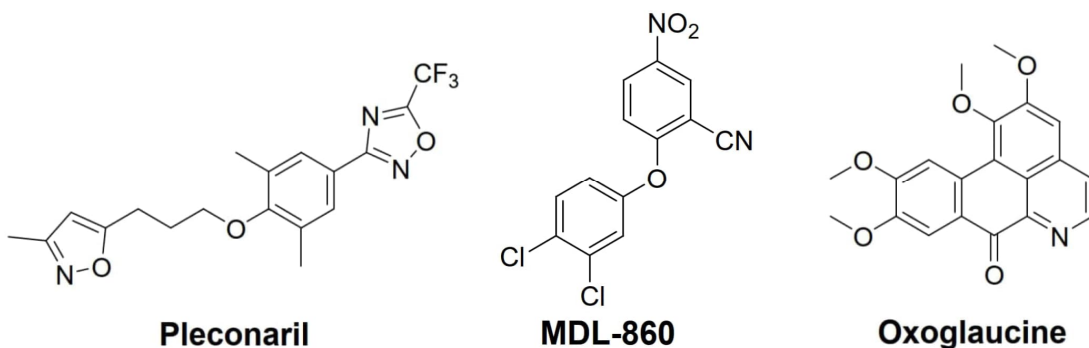
Значителна част от нашето изследване беше анализът на лекарствената чувствителност в мозъчните проби от мишки, заразени с невротропен CVB1. Тази схема на последователно подаване на веществата (САА) значително противодейства на развитието на лекарствена резистентност към плеконарил като компонент на тройната PGO комбинация. Обратно, монотерапията с плеконарил води до лекарствена резистентност, започваща от 5-ия ден след заразяването, достигаща пик на 10-ия ден. Голямото терапевтично предимство на курса САА като бариера за развитието на лекарствена резистентност се наблюдава при сравняване на резултатите спрямо тези от тройната комбинация PGO, прилагана едновременно всеки ден. В този случай резистентност към плеконарил се наблюдава още на 4-ия ден след инфекцията.

Тези данни ясно доказват ефективността на предложения нов подход за комбинирано приложение на ентеровирусни инхибитори на репликацията: последователно алтернативно приложение на курс на лечение. Следвайки този подход, могат да бъдат изследвани и разработени модели с тройна комбинация, което да доведе до възможни основи за нови терапевтични стратегии.

2. Изследване на ефекта на тройната комбинация Pleconaril/MDL-860/Охоглауцин (РМО) при последователно алтернативно редуване на съединенията (САА курс) спрямо експериментална невроинфекция с коксакивирус В1 в новородени мишки

В следващ етап от нашата експериментална работа заменихме гуанидин-НCl с MDL-860 в тройната комбинация, приложена чрез схемата за лечение на САА, с цел да въведем анти-ентеровирусен инхибитор, който показва *in vivo* активност в модел на коксаки А21 вирус при мишки, като се използва подкожно приложение (Markley, L.D., et al., 1986) и при 15 грамови мишки с миокардит, индуциран от кардиотропен щам на коксаки вирус В3 (Padalko, E., et al., 2004). И в двете проучвания е приложена ефективна дневна доза от 250 mg/kg.

В нашия експеримент новородени мишки бяха подложени на 12 дневни лечебни курсове с последователно прилагане на плеконарил, MDL-860 и оксоглауцин (РМО) в САА курс и едновременно ежедневно прилагане на трите вещества, както и монотерапевтични курсове с всяко от съединенията, като терапията започваше в деня на заразяването.



В Таблица 7 са представени данни относно протективния ефект на последователно прилаганите тройни комбинации (САА курс) с различни дози на MDL-860, както и монотерапевтичните курсове със същите дози. За да бъде избрана оптимална терапевтична доза на MDL-860, съединението бе изпитано в четири дневни дози: 25, 50, 75 и 100 mg/kg, както като част от тройната комбинация, така и в монотерапевтичен курс. При експериментите бяха проследени кумулативната смъртност (в проценти), теглото на експерименталните животни (в грамове) и средното време на преживяемост (в дни). Монотерапевтичните курсове с MDL-860 в различни концентрации не показаха отчетлива активност (Фигура 12). В дози на веществото 75 и 100 mg/kg се наблюдава увеличение на времето на преживяемост сравнено с група плацебо, като за 75 mg/kg то е увеличено средно с 3 дни, докато при 100 mg/kg е увеличено средно с 1.5 дни, като въпреки това смъртността в групите достигна 100%.

Ежедневното монотерапевтично приложение на MDL-860 по схема доза-отговор на новородени мишки, инокулирани с CVB1 (20 LD₅₀), увеличава MST с 2,1 дни при 75 mg/kg и с 1.5 дни при 100 mg/kg в сравнение с плацебо (Таблица 7). Въпреки това, комбинацията РМО при последователно въвеждане чрез САА, дозата 75 mg/kg MDL-860 показва висока антивирусна активност - защитен ефект от приблизително 50%, а MST се увеличава с 6.3 дни в сравнение с плацебо. При 50 mg/kg MDL-860 в тройната комбинация е установено само значително удължаване на MST с 4.6 дни. При сравнение със съответните монотерапевтични курсове с MDL-860 средното време за преживяемост се увеличава с 4.4 дни при РМ₅₀О и 2.4 дни при РМ₇₅О (Фигури 13 и 14). Прилагана едновременно всеки ден в дневни дози съответно 25 mg/kg и 75 mg/kg, комбинацията РМО не показва протективен ефект.

Таблица 7. Ефект на комбинацията РМО, приложена по САА схема при невроинфекция с CVB1 в новородени мишки.

Експериментални групи	Преживяли/общо ^a	Смъртност %	MST ± SD, дни ^b	PI%
P ₂₅ M ₂₅ O ₂₅ последов.	0/51	100.0	4.5 ± 0.8	0
P ₂₅ M ₅₀ O ₂₅ последов.	11/67 ^{e,i}	83.6	8.5 ± 1.3 ^{c,h}	16.4
P ₂₅ M ₇₅ O ₂₅ последов.	29/59 ^{c,f}	50.8	>10.2 ± 0.6 ^{c,g}	49.2
P ₂₅ M ₁₀₀ O ₂₅ последов.	0/42	100.0	4.7 ± 1.8	0

Експериментални групи	Преживяли/общо ^a	Смъртност %	MST ± SD, дни ^b	PI%
P ₂₅ M ₂₅ O ₂₅ едновр.	0/24	100.0	3.8 ± 1.2	0
P ₂₅ M ₇₅ O ₂₅ едновр.	0/26	100.0	4.2 ± 0.9	0
MDL-860 25 mg/kg	0/102	100.0	3.5 ± 0.7	0
MDL-860 50 mg/kg	0/66	100.0	4.1 ± 0.8	0
MDL-860 75 mg/kg	0/40	100.0	6.8 ± 1.3 ^d	0
MDL-860 100 mg/kg	0/24	100.0	6.2 ± 0.7	0
Pleconaril 25 mg/kg	14/45 ^d	68.9	>7.9 ± 1.6 ^c	31.1
Pleconaril 25 mg/kg 2 days apart	0/23	100.0	4.4 ± 0.2	0
Oxoglaucine 25 mg/kg	0/59	100.0	5.2 ± 0.9	0
Placebo PBS	0/65	100.0	4.7 ± 0.9	0
Placebo послед.	0/35	100.0	3.9 ± 0.7	0

Данните са усреднени от най-малко три независими експеримента. MST, mean survival time – средно време на преживяване; PBS, phosphate-buffered saline; PI, protection index – индекс на защита; SD, standard deviation – стандартно отклонение; РМО тройна комбинация от плеконарил, MDL-860 и оксоглауцин.

^a Two tailed Fisher's exact test

^b One-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparison post-test)

^c $P < 0.0001$ към плацебо последователно

^d $P < 0.001$ към плацебо последователно

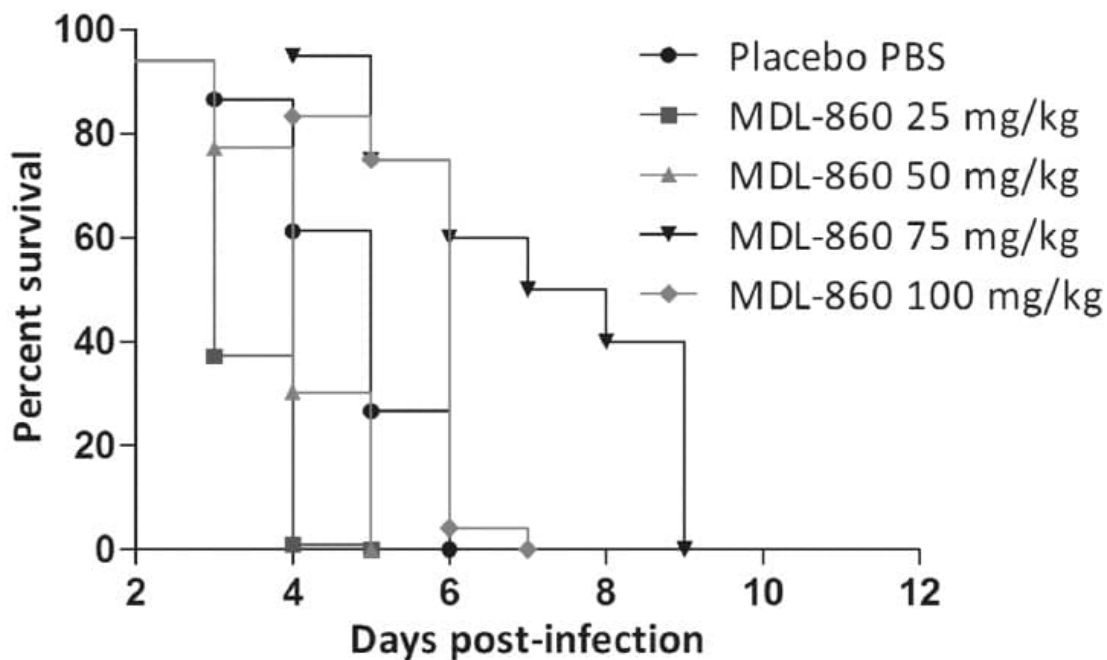
^e $P < 0.05$ към плацебо последователно

^f $P < 0.0001$ към MDL-860 75 mg/kg

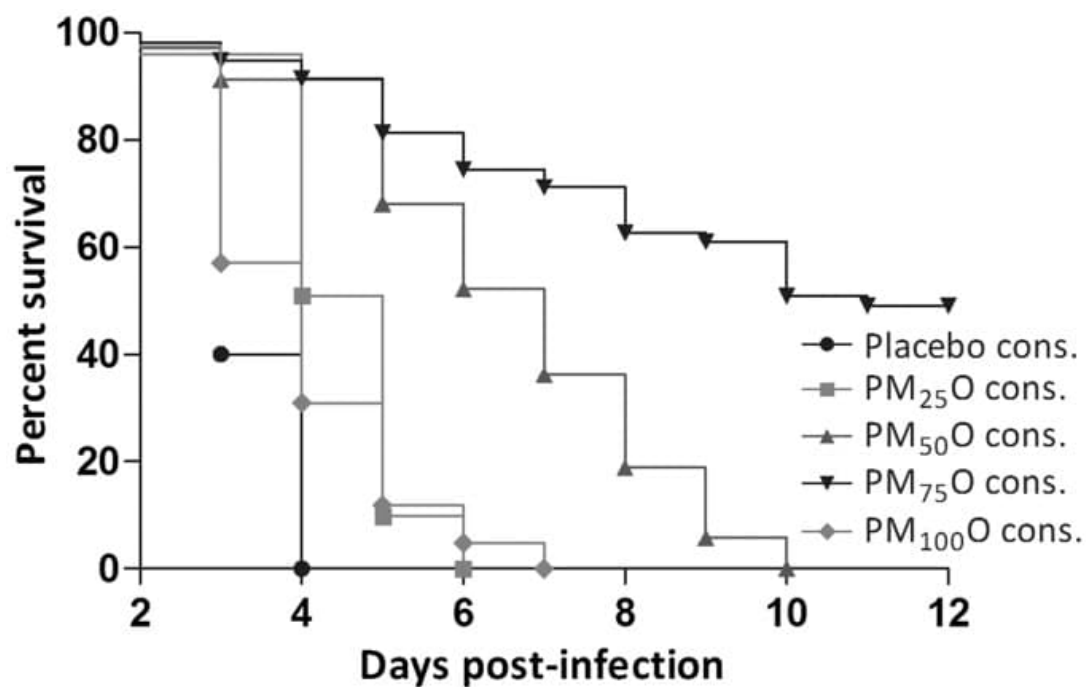
^g $P < 0.01$ към MDL-860 75 mg/kg

^h $P < 0.0001$ към MDL-860 50 mg/kg

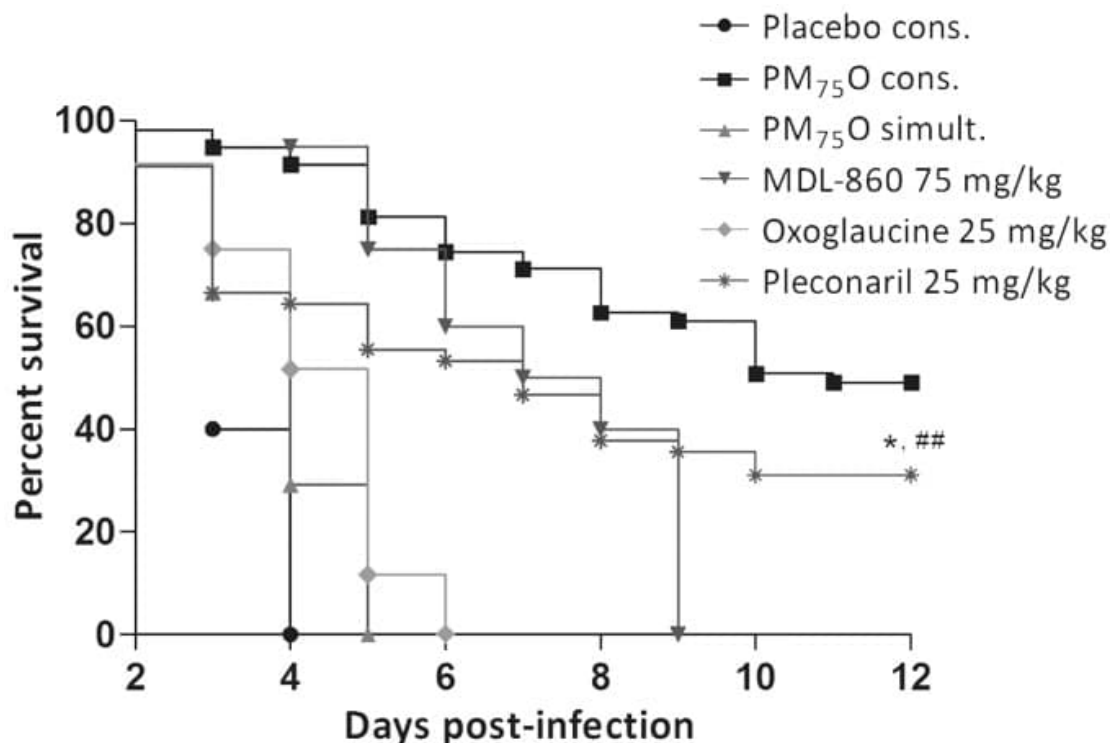
ⁱ $P < 0.001$ към MDL-860 50 mg/kg



Фигура 12. Преживяемост по дни на животните при монотерапевтичен всекидневен курс на MDL-860 в различни дневни дози, в сравнение с група плацебо.

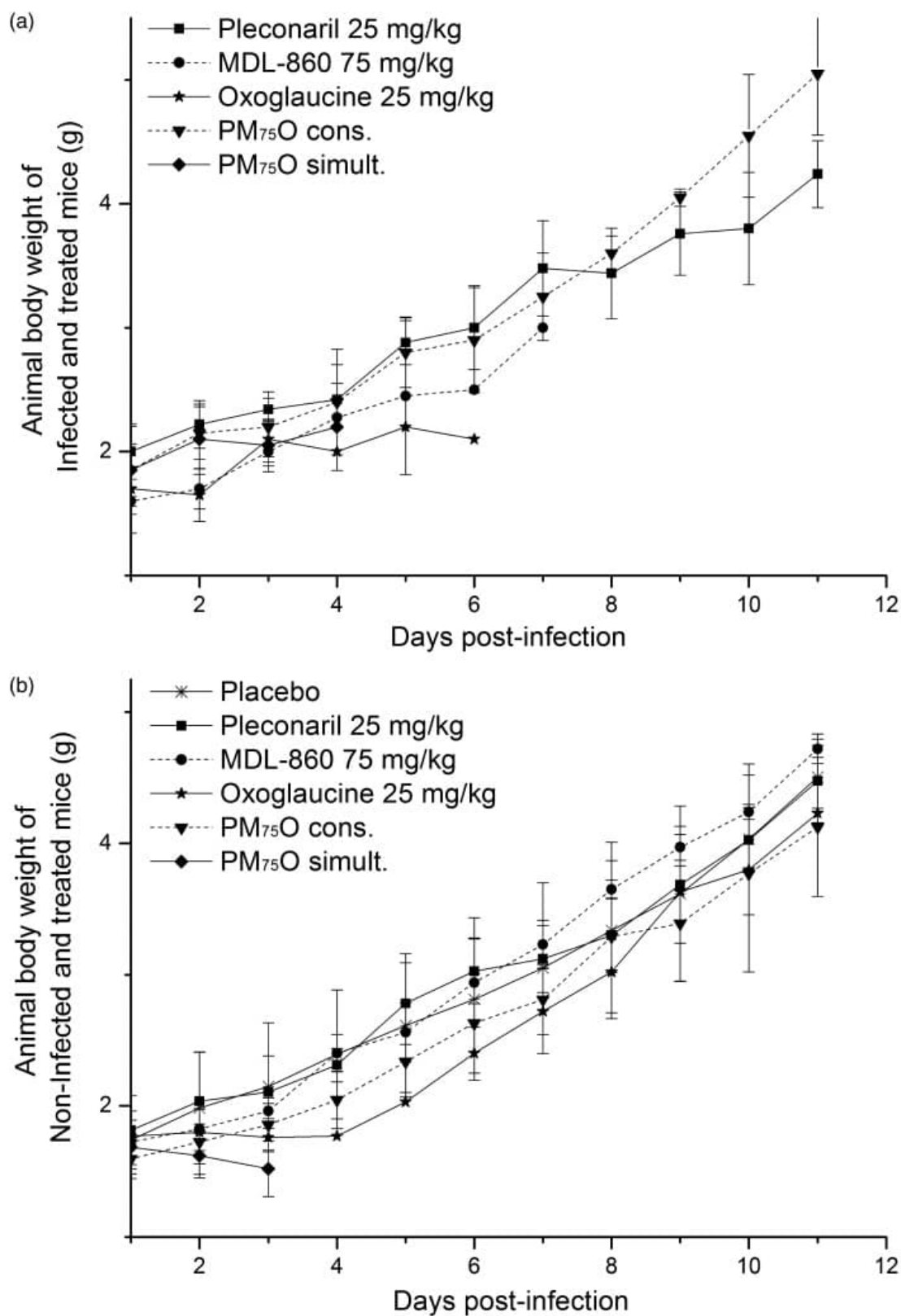


Фигура 13. Преживяемост по дни на животните при последователно прилагане на тройната комбинация РМО с MDL-860 в различни дневни дози, сравнени с група плацебо.



Фигура 14. Преживяемост по дни в групите, третирани с комбинация РМО в САА курс и едновременно спрямо монотерапевтичните курсове със съединенията-партньори.

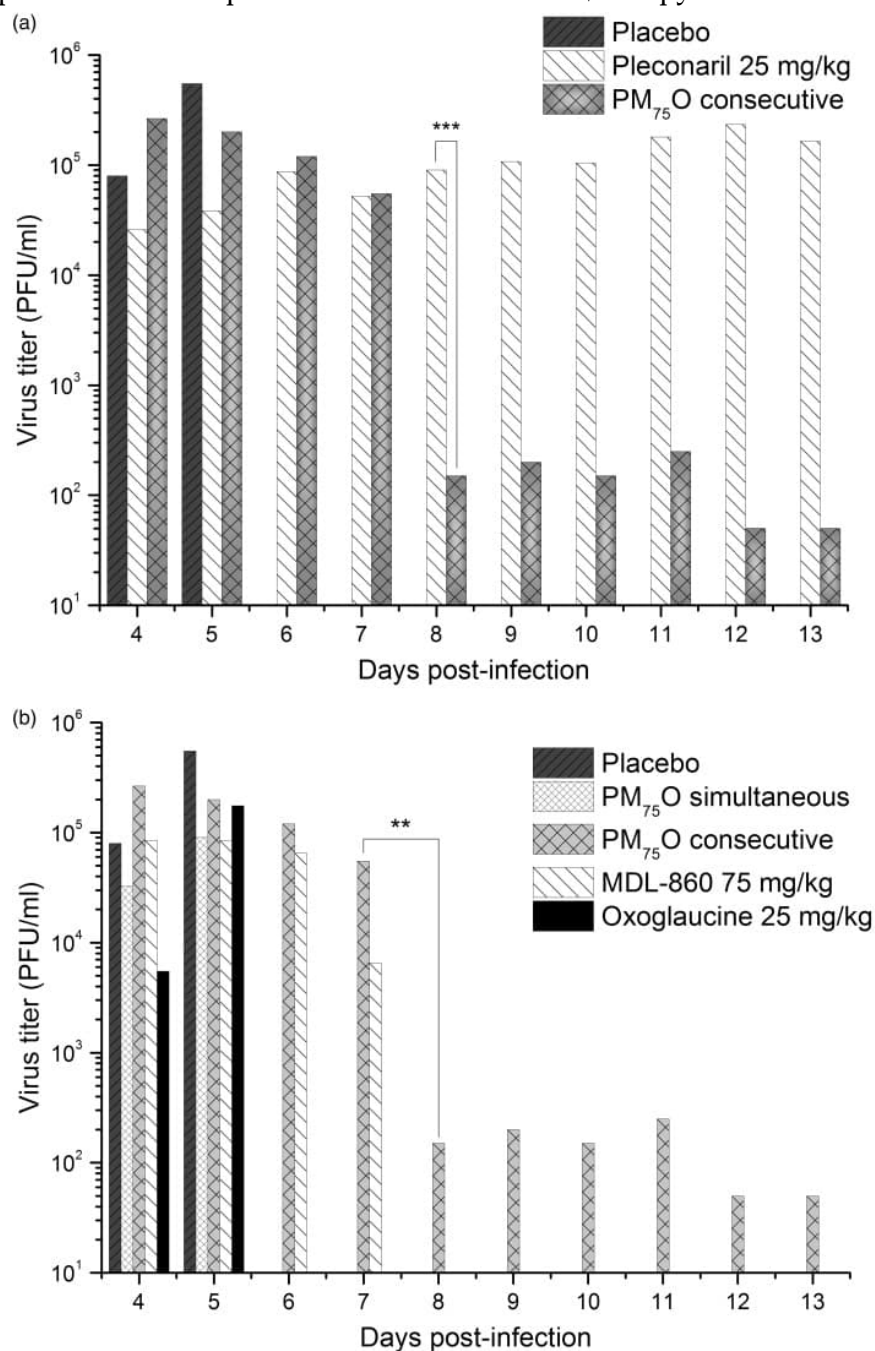
При проследяване на телесното тегло, не е наблюдавана комбинирана токсичност, при мишките, третирани с $P_{25}M_{75}O_{25}$ чрез курс на САА, сравнение с неинфектираните животни. В края на наблюдавания период от време (11-ия ден след заразяването) е регистрирано средно телесно тегло от 5.1 ± 0.4 g на заразени животни, третирани с $P_{25}M_{75}O_{25}$ чрез САА лечебен курс (Фигура 15a), докато при неинфектирани и третирани мишки, беше 4.2 ± 0.5 g (Фигура 15b). Едновременното ежедневно прилагане на $P_{25}M_{75}O_{25}$ води до по-ранна смъртност в групата незаразени животни, дължаща се най-вероятно на комбинираната токсичност (Фигура 15b), докато при заразените мишки ефектът от вирусната инфекция се допълва (Фигура 15a).



Фигура 15. Индивидуално телесно тегло на новородени мишки, подложени на курсове на лечение (средни стойности от два до три експеримента):
(а) инфектирани и (б) неинфектирани.

2.1. Ефект на РМО по САА схема върху съдържанието на вирус в мозъците на третираните животни

Антивирусната активност на РМО чрез САА срещу инфекцията с CVB1 е особено изразена при сравняване на съдържанието на инфекциозен вирус в мозъка на третираните с монотерапия животни и на плацебо групата.



Фигура 16. (a) Инфекциозен вирусен титър на мозъчните изолати от групи плацебо, плеконарил монотерапия и РМО, прилагана по САА схема; (b) Вирусен титър на мозъчните изолати от групи плацебо, MDL-860, оксоглауцин и РМО, прилагана в САА курс и едновременно. Статистическите анализи са извършени с one-way ANOVA и Bonferroni's multiple comparison post-test. **P < 0.01.

При този анализ РМО с доза 75 mg/kg MDL-860 е и най-ефективната комбинация (Фигура 16а и 16б). След 7-ия ден след инокулацията мозъчните проби

на групата с РМО чрез САА са имали титър на вируса 4-5 logs по-нисък от този на групата с монотерапия с плеконарил 25 mg/kg. Титрите са приблизително еднакви до 7-ия ден. В двете тройни комбинации: РМО прилагана в САА курс и РМО прилагана едновременно, плеконарил бе даван в доза 25 mg/kg, MDL-860 бе в дозата, показала най-висока ефективност *in vivo*, а именно 75 mg/kg, оксоглауцин - в доза 25 mg/kg. Лечебният курс с комбинацията РМО, прилагана последователно, значително намалява инфекциозното вирусно съдържание, особено ясно изразено след 8-ия ден от заразяването до края на изследвания период. В група плацебо бе наблюдавано увеличение в титъра на вируса, изолиран от 5-ия ден след заразяването, след което смъртността на животните в групата достига 100%.

Инфекциозното вирусно съдържание в мозъчни проби взети от монотерапевтичните курсове с MDL-860 (75 mg/kg) и оксоглауцин (25 mg/kg) е представено на Фигура 16b. Прилагана едновременно РМО комбинацията не показва протективен ефект, като титърът на вируса се запазва висок до смъртта на животните в групата. При монотерапията с оксоглауцин бе наблюдавано плавно повишаване във вирусното съдържание, което съвпада и със смъртта на животните в групата. Монотерапията с MDL-860 показва понижаване на вирусния титър след 6-ия ден от заразяването, въпреки това смъртността в групата достигна 100% на 7-ия ден.

2.2. Чувствителност към плеконарил на мозъчните изолати от животни третирани с РМО в САА курс

Вирусните проби, изолирани от мозъците на животните, заразени с CVB1 и третирани с последователно приложената (САА курс) тройна комбинация, както и вирусните проби, от групите, третирани само с плеконарил бяха тествани за тяхната чувствителност към плеконарил чрез плако-инхибиращия тест на *Hermann-Siminoff* в HEp-2 клетки. От резултатите, представени в Таблица 8 се вижда, че вирусният изолат от групата, третирана чрез монотерапевтичен курс с плеконарил, показва постепенно развитие на резистентност към съединението, особено отчетливо към 7-13-ти ден след вирусната инокулация.

Таблица 8. Чувствителност към плеконарил в плако-инхибиращ тест на мозъчни изолати от мишки, заразени с CVB1.

Група	IC ₅₀ на плеконарил (μM) срещу CVB1, изолиран от мозък (4-ти до 13-ти ден)									
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Плацебо	0.018	0.022	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a
Плеконарил	0.046	0.037	0.062	0.164	0.114	0.119	0.135	0.139	0.387	0.543
РМОп	0.016	0.018	0.016	0.024	0.018	0.017	0.012	0.0087	0.0092	0.011 ^b
РМОе	0.014	0.042	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a

^a След 5-ти ден няма живи животни, 100% смъртност.

Статистическият анализ е извършен с one-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparison post-test)

^b $P < 0.0001$ към плеконарил 25 mg/kg ден 13

РМОп – последователно редуване на съединенията от РМО-комбинацията; РМОе - едновременно прилагане съединенията от РМО-комбинацията;

В групата, третирана с комбинацията РМО, прилагана чрез последователно редуване на съединенията по САА, освен, че има значителен инхибиращ ефект *in vivo*, има отношение и към пълното запазване на чувствителността към плеконарил на изолирания от мишите мозъци вирус. Наред с това се установява повишена чувствителност на вируса още в първите дни на лечебния курс, която се запазва до края на изследвания период, достигайки максимум на 11-ти ден след заразяването. Едновременно, ежедневно прилагане на трите вещества-партньори в комбинацията РМО, води до понижена чувствителност и развитие на лекарствена резистентност към плеконарил.

Вирусните изолати от мозъците на мишки, третирани с комбинацията РМО (със 75 mg/kg MDL-860) чрез САА схема, проявяват липса на лекарствена резистентност към плеконарил в рамките на дни 4 до 10, последвано от известно повишаване на чувствителността към плеконарил, проявяващо се на 11-ия до 13-ия ден. Съотношенията между стойностите на IC₅₀ на плеконариловата група и групата, третирана с РМО чрез САА е както следва: ден 4 = 2.9; ден 5 = 2.1; ден 6 = 3.8; ден 7 = 6.8; ден 8 = 6.3; ден 9 = 7; ден 10 = 11.3; ден 11 = 16.0; ден 12 = 42.0; ден 13 = 49.4

Когато чувствителността към плеконарил в мозъчни проби от мишки, подложени на монотерапевтичен курс на плеконарил, беше сравнена с пробите от групата на плацебо, беше регистрирано развитие на изразена резистентност към плеконарил от 7-ия ден след инфекцията (7.4-кратно увеличение на IC₅₀), достигайки максимум на 13-ия ден (24.7-кратно увеличение на IC₅₀). Същият анализ към тройната комбинация по схема на САА демонстрира липса на резистентност към плеконарил до 9-ия ден (съотношение САА към плацебо около 1) и липса на статистически значимо повишаване на чувствителността към лекарството в рамките на дни 11 до 13 (съотношение под 0.5).

2.3. Чувствителност към MDL-860 на мозъчните изолати от животни, третирани с РМО в САА курс

Подобно на резултатите, получени при плеконарил и тук се наблюдава плавно увеличение на чувствителността спрямо MDL-860 на вируса, изолиран от групата животни, третирани с РМО по САА схема. В края на изследвания период, вирусът, изолиран на 13-ти ден от прилагането на комбинацията РМО по САА е почти 8 пъти по-чувствителен към веществото, сравнен с този изолиран на 5-тия ден от прилагането на същата комбинация, монотерапевтичната група или група плацебо. Както се вижда в Таблица 9, изразена резистентност към MDL-860 при доза от 75 mg/kg е регистрирана при монотерапевтичен курс с MDL-860. Влиянието на комбинацията РМО чрез курс САА беше добре демонстрирано: стойността на IC₅₀ при монотерапия с MDL-860 беше 5.9 пъти по-висока на ден 6 след инокулацията в сравнение с тази на курса РМО чрез САА и беше 28.9 пъти по-висока на ден 7. Чувствителността към MDL-860, изразена като съотношение САА към плацебо, беше близо 1 до ден 5. След това, чувствителността към MDL-860 (съотношението плацебо/САА) беше значително повишена: 2 пъти на ден 6; 8.2 пъти на ден 7 и 8.9 пъти на ден 13. Чувствителността на CVB1, изолиран на ден 13 по време на курса на РМО чрез САА, беше 6.8 пъти по-висока отколкото вируса, изолиран на ден 5 (P < 0,001).

Таблица 9. Чувствителност към MDL-860 в плако-инхибиращ тест на мозъчни изолати от мишки, заразени с CVB1.

Група	IC ₅₀ на MDL-860 (µM) срещу CVB1, изолиран от мозък (4-ти до 13-ти ден)									
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Плацебо	3.372	2.843	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a
MDL-860	2.057	2.582	8.206	>10.0	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a
РМОп	2.165	2.388	1.418	0.346	0.319	0.173	0.153	0.313	0.316	0.318 [#]
РМОе	1.894	2.477	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a	– ^a

^a След 5-ти ден няма живи животни, 100% смъртност.

Статистическият анализ е извършен с one-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparison post-test)

[#] P < 0.001 към РМО, приложена последователно (ден 5-ти)

РМОп – последователно редуване на съединенията от РМО-комбинацията; РМОе - едновременно прилагане съединенията от РМО-комбинацията;

Монотерапевтичният курс с MDL-860 води до изразено понижение на чувствителността на вируса към веществото – почти 5-кратно, бързо развитие на резистентност, което е причина за липсата на протективен ефект на самостоятелната терапия с MDL-860 при този вирусен щам.

2.4. Чувствителност към оксоглауцин на мозъчните изолати от животни третирани с РМО в САА курс

Наблюдава се повишена чувствителност към третия партньор в комбинацията РМО - оксоглауцин, вещество, което не показва самостоятелен защитен ефект *in vivo*. Въпреки това, РМО чрез САА (със 75 mg/kg MDL-860) показва шесткратно намаление на стойностите на IC_{50} за оксоглауцин от ден 5 до ден 13 ($P < 0,001$) (Таблица 10). Чувствителността към оксоглауцин, изразена като съотношение САА към плацебо, беше около 1 до ден 7. След това повишаването на чувствителността към оксоглауцин (съотношение САА/плацебо) беше значително повишено 4.9 пъти (6.8 пъти спрямо монотерапия).

От получените резултати се вижда, че изолираният вирус повишава чувствителността си и към третия партньор в комбинацията при сравнение с пробите взети от монотерапията и пробите от едновременно ежедневно прилаганата РМО комбинация. Изолираният от тази група вирус показва плавно увеличаване на чувствителността към оксоглауцин, като на 13-ти ден тя е 6 пъти по-висока от тази на 4-ти ден. Монотерапевтичният курс с оксоглауцин, води до понижена чувствителност на вируса към веществото още на 4-я ден на курса, което е причина за ранната смърт на животните в експерименталната група. Комбинацията, прилагана едновременно ежедневно показва намалена лекарствена чувствителност, със стойности на IC_{50} близки до тези регистрирани при монотерапевтичен курс с оксоглауцин.

Таблица 10. Чувствителност към оксоглауцин в плако-инхибиращ тест на мозъчни изолати от мишки, заразени с CVB1.

Група	IC ₅₀ на оксоглауцин (μM) срещу CVB1, изолиран от мозък (4-ти до 13-ти ден)									
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Пла	0.411	0.743	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
Окс	1.198	1.048	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
РМОп	0.914	0.979	0.851	0.727	0.299	0.396	0.287	0.299	0.221	0.153 [#]
РМОе	1.894	2.477	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a

^a След 5-ти ден няма живи животни, 100% смъртност. Статистическият анализ е извършен с one-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparison post test)

[#] $P < 0.001$ към РМО, приложена последователно (ден 5-ти)

Пла – плацебо; Окс – оксоглауцин; РМОп – последователно редуване на съединенията от РМО-комбинацията; РМОе - едновременно прилагане съединенията от РМО-комбинацията;

При настоящото изследване на новородени мишки, заразени с CVB1, оптимален ефект, изразен чрез приблизително 2-дневно увеличение на MST, е постигнат при дневна доза от 75 mg/kg. При по-ниски дози съединението е неактивно, а при по-висока доза от 100 mg/kg ефектът му намалява. Последният резултат може да се дължи на токсичност, която е наблюдавана по време на изследването върху 15 g мишки, третирани с 250 mg/kg дози от MDL-860.

Комбинацията РМО, съдържаща ефективната доза от 75 mg/kg MDL-860 и приложена по курса на САА, демонстрира забележително висок антиентеровирусен ефект, който се изразява като защитен ефект от ~50% срещу масивна инфекция (20 LD₅₀) с коксаки вирус В1, който провокира смъртоносен, бързо протичащ енцефалит при новородени мишки. Очевидно блокерът на VP1, плеконарил, играе особена роля в активността на комбинацията, както беше установено в предишно проучване (Stoyanova, A. et al., 2015). Трябва да се подчертае, че ефектът на Р₂₅М₇₅О₂₅ в това проучване е по-висок от този на комбинацията Р₂₅Г₄₅О₂₅, използвана срещу същата инфекция (CVB1 20LD₅₀ при новородени мишки) в предишно проучване (Stoyanova, A. et al., 2015). Р₂₅М₇₅О₂₅ комбинацията също показва значително по-изразено потискане на вирусните титри в мозъчни проби от третирани мишки. Освен това този ефект се е появил три дни по-рано - на 8-ия ден. По този начин включването на MDL-860 изглежда е подобрило ефекта на комбинацията.

Това проучване убедително потвърждава друго важно свойство на последователното редуващо се прилагане на инхибитори на EV репликация с различни механизми на действие: САА не само ограничава лекарствената резистентност, но също така повишава чувствителността към лекарството (лекарствена чувствителност). Чувствителността към MDL-860 (IC₅₀ стойности) се повишава по време на САА курс с РМО 8.2 пъти спрямо плацебо на ден 7 и 28.9 пъти спрямо монотерапия с MDL-860. Чувствителността към оксоглауцин при курс на РМО САА се повишава шест пъти на ден 13 в сравнение с ден 4 (6.8 пъти спрямо монотерапия с оксоглауцин и 4.8 пъти спрямо плацебо). Очевидно този необичаен феномен е водеща характеристика на подхода за лечение на САА. Наблюдава се във всички проучвания на *in vivo* анти-EV активност на тройни комбинации чрез тази нова схема на приложение на лекарства - DGO срещу CVB1 (Vassileva-Pencheva, R. et al, 2010); PGO срещу CVB1 (Stoyanova, A. et al., 2015) и при настоящето изследване РМО срещу CVB1 (Stoyanova, A. et al., 2016).

По отношение на плеконарила, в настоящото проучване се установи, че неговата чувствителност в комбинацията РМО чрез САА курс е напълно запазена до края на периода на наблюдение (ден 13). Това е в контраст с ясно изразеното развитие на резистентност по време на курса на монотерапия с плеконарил: 7 пъти по-ниски стойности на IC₅₀ на ден 7 при РМО комбинация чрез САА курс, 42 пъти на ден 12-ти и повече от 49 пъти на ден 13-ти. Освен това, не е наблюдавано статистически значимо повишаване на чувствителността към плеконарил на 12/13 дни. Считаме, че констатацията за влияние върху чувствителността към лекарствата е много важна за насърчаване на САА като подход за лечение при анти-ентеровирусна химиотерапия.

Двойно-слепите плацебо-контролирани клинични изпитвания на инхибитори на ентеновиралната репликация, избрани чрез предклинични проучвания, досега са се проваляли. Това несъмнено се дължи основно на липсата на селективност и многото странични ефекти в човешкия организъм (disoxaril (WIN51711), WIN 54954

(Diana, G.D. et al., 1995), pleconaril (WIN63843) (Senior, K. et al., 2002) и BTA-798 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01175226>). Резултатите от тези опити потвърждават наблюдаваната липса на ефикасност в *in vivo* модели на повечето вещества, които са активни *in vitro*. Около 20 от стотиците инхибитори на EV репликация са проявили някаква *in vivo* активност. Тези резултати от изпитванията показват, че понастоящем не съществуват клинично ефективни антивирусни средства за лечение на ентеровирусни инфекции. Следователно реализацията на анти-ентеровирусна химиотерапия е проблем за бъдещето.

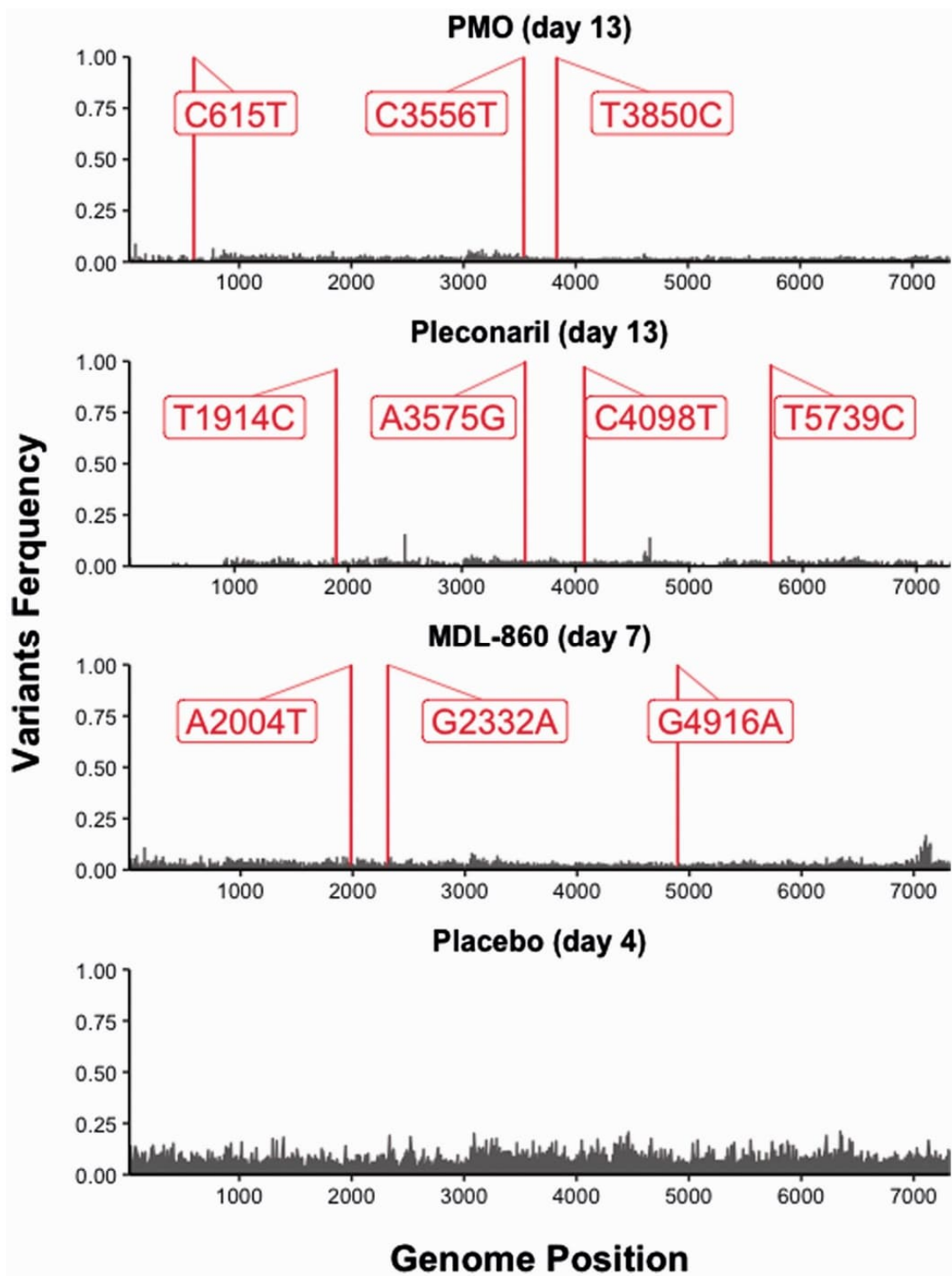
Продължаващото развитие на подхода за лечение, обсъден тук - тройни анти-ентеровирусни комбинации чрез последователно редуващо се приложение - може да допринесе за важна перспектива за установяване на ефикасна анти-ентеровирусна химиотерапия.

3. Генотипна характеристика на мозъчни изолати от мишки, заразени с CVB1

Молекулярно-генетичните изследвания бяха от изключителна важност, за да изясним механизма на потискане на развитието на лекарствена резистентност и последващата поява на феномена на повишена лекарствена чувствителност на вирусните изолати през целия период на курса на САА с РМО (Grozdanov, P. et al., 2020).

От мозъчните вирусни изолати от мишки, заразени с CVB1, екстрахирахме РНК и бе секвенирана по метода на следващо поколение секвениране, за да се определят и идентифицират възможни мутации, възникнали по време на лечебния курс.

При сравняване на целите геномни секвенции между плацебо групата и групите, третирани с антивириали установихме степен на идентичност около 99.88%. В изследваните проби не са наблюдавани делеции или инсерции, а само нуклеотидни замени. Направени са анализи на подравняване (нуклеотидно (NA) и аминокиселинно (AA)) (Таблица 11) на всички мозъчни проби, съдържащи вирус, в сравнение с плацебо пробата от Ден 4. Използвахме тази проба, тъй като няма оцелели животни в плацебо групата след този ден. Основните варианти (честота > 0.5) са представени на Фигура 17. Фигурата е генерирана с помощта на R пакет ggplot2 (R версия 3.6.1).



Фигура 17. Основни секвенционни варианти, получени чрез NGS: следващо поколение секвениране.

Подравняването на пълните геномни последователности на вируси, резистентни към плеконарил (25 mg/kg), взети на ден 13, разкри пет нуклеотидни мутации — T109C (5'UTR), T1914C (VP3 област), A3575G (2A област), C4098T (2C област) и T5739C (3C област). АА последователности на вирусните проби от група плацебо (Ден 4) и тези, показващи резистентност към плеконарил на Ден 13, показват едно аминокиселинно заместване — H945R (в 2A област) (Таблица 11). Това заместване на хистидин с аргинин, разположено в протеина 2A, е консервативна промяна, която замества ароматен хидрофилен полярен остатък с една неароматна положително заредена аминокиселина.

Три нуклеотидни замествания бяха открити в пробата MDL-860 Ден 7 — A2004T (VP3 регион), G2332A (VP3 регион) и G4916A (2C регион) — което води до две аминокиселинни замествания — валин с изолевцин V531I (в VP3 регион) и аргинин с лизин R1392K (в 2C). И двете са консервативни замествания. Проба от ден 7 на този курс на монотерапия е избрана поради смъртността на животните в тази група след този ден.

Таблица 11. Нуклеотидни мутации и аминокиселинни замествания в изследваните групи.

Region	5UTR		VP3			VP1	2A		2B	2C		3C	3D
Position in genome	109	615	1914	2004	2332	3040	3556	3575	3850	4098	4916	5739	6876
Placebo (Day 4)	T	C	T	A	G	A	C	A	T	C	G	T	C
PMO (Day 13)	T	T	T	A	G	A	T P→S ^a	A	C	C	G	T	C
Pleconaril (Day 13)	C	C	C	A	G	A	C	G H→R ^a	T	T	G	C	C
MDL-860 (Day 7)	T	C	T	T	A V→I ^a	A	C	A	T	C	A R→K ^a	T	C
Oxoglaucine (Day 4)	T	C	T	A	G	T T→S ^a	C	A	T	C	G	T	T

^aAmino acid substitution.

PMO: pleconaril/MDL-860/oxoglaucine.

Аминокиселинните секвенции, отговарящи на съответните вирусни белтъци на коксакивирус В1 са както следва: 1-69 (VP4); 70-332 (VP2); 333-570 (VP3); 571-848 (VP1); 849-998 (2A); 999-1098 (2B); 1099-1426 (2C); 1427-1515 (3A); 1516-1537 (3B); 1538-1720 (3C); 1721-2182 (3D).

Геномният анализ на вирусната проба, взета на 4-ия ден от мишките, подложени на монотерапията с оксоглауцин, показва две нуклеотидни мутации — A3040T (VP1 област) и T6876C (3D област) — и АА анализ регистрира едно заместване — T767S (VP1 област) (Таблица 12). Ден 4 от тази проба е избран поради смъртността на животните в тази група след този ден.

Анализът на пробата, третирана с САА курса на РМО и взета на пробата от 13-ия ден, се проявява в три нуклеотидни замествания — C615T (5'UTR), C3556T (2A област) и T3850C (2B област); въпреки това, АА анализ показва само една аминокиселинна промяна - P939S (2A област) (Таблица 12). Заместването на пролин със серин, разположено в 2A протеина, е неконсервативна промяна, която замества

ароматен хидрофилен полярен остатък с една неароматна положително заредена аминокиселина.

Таблица 12. Аминокиселинни замествания.

АА замествания	Позиция								
	371	531	767	939	942	945	1392	1400	1405
Вирусни протеини	VP3	VP3	VP1	2A	2A	2A	2C	2C	2C
Пла 4 ден	R	V	T	P	Y	H	R	L	I
РМО 4 ден	Q	V	T	P	Y	H	R	L	T
РМО 13 ден	R	V	T	S	Y	H	R	L	T
Пле 4 ден	R	V	T	P	H	H	R	L	T
Пле 13 ден	R	V	T	P	Y	R	R	P	T
MDL-860 4 ден	R	V	T	P	Y	H	R	L	T
MDL-860 7 ден	R	I	T	P	Y	H	K	L	T
Окс 4 ден	R	V	S	P	Y	H	R	L	T

Пла – плацебо; Окс – оксоглауцин; Пле - плеконарил;

При ентеровирусите мутации и рекомбинациите са често срещано явление. Вирусната РНК-зависима РНК-полимераза (3D) допуска висок процент грешки по време на репликативния цикъл (Agol, V.I. et al., 1995; Wang et al., 2010; Nidaira et al., 2014). Мутациите, установени в различните региони на ентеровирусния геном - 5'-UTR, VP1, VP2, 2A, 2C, и 3D, са свързани с промени във вирулентността при експериментални модели лабораторни животни и при хора (Cordey et al., 2012; Wang et al., 2012). Наше изследване на VP1-специфични dsRNA и siRNA за лечение на CVB3 инфекция показва ефективност при ниски, нецитотоксични концентрации, което е от значение в контекста на ентеровирусите, където мутациите и рекомбинациите водят до повишена вирулентност и развитие на лекарствена резистентност, като молекулярно-генетичните изследвания предоставят основа за преодоляване на тези проблеми чрез комбинирани терапевтични подходи (Petrov, N. et al., 2022).

Молекулярно-генетичните изследвания дават яснота относно механизма на потискане развитието на лекарствена резистентност и появата на феномена на повишена чувствителност към ентеровирусните инхибитори, включени в тройната комбинация при САА курс. Така, РМО комбинацията, прилагана по САА схема, предотвратява развитието на отчетлива лекарствена резистентност за разлика от монотерапията с плеконарил при мишки с невроинфекция, предизвикана от CVB1. Експериментални данни от монотерапията с плеконарил в CVB1-инфектираните мишки показват развитието на подчертана лекарствена резистентност след ден 5, достигайки максимално ниво на 12-13 дни, докато при комбинацията РГО, използваща курса САА, това явление се предотвратява (Stoyanova A. et al., 2015). Секвенционният анализ на вирусните мозъчни изолати от групите, третирани с монотерапия показва нуклеотидно заместване в първата бримка на вътрешното рибозомно входно място (IRES) в 5' UTR и аминокиселинно заместване в областта 2A.

5' UTR на коксаки вирус В1 съдържа бримки, които вероятно са от съществено значение за синтеза на вирусна РНК и съдържат IRES, необходими за започване на транслацията. Границите на IRES и намиращите се в тази структура специфични последователности са картографирани за полиовирус и резултатите показват, че мотивът обхваща nt 140–631. Тези структурни елементи са критично важни за жизнеспособността на вируса (Xiao, C. *et al.*, 2005; Hunziker, I.P. *et al.*, 2007). Вирусният протеин 2A е цистеинова протеаза, който разцепва вирусния полипротеин и специфични протеини на гостоприемника като е отговорен за разцепването между Р1 и Р2 регионите. Също така той разцепва клетъчния инициращ фактор eIF4G1 за прекъсване на транслацията на клетъчните иРНК. Освен това блокира трафика на протеини и РНК на гостоприемника между ядрото и цитоплазмата.

При анализа на проби от монотерапия с плеконарил от ден 13 бе открита мутация в 5' -UTR IRES в рамките на курса на лечение. Тези промени могат да бъдат свързани с развитието на лекарствена резистентност. Една от целите на това проучване бе да се определят преобладаващите мутации, свързани с вирусния фенотип, чрез секвениране директно на мозъчни хомогенати. Този подход може да прикрие нискоскоростните мутации и считаме, че това е причината за липсата на характерните мутации в резистентния на плеконарил вирусен изолат.

Развитието на лекарствена резистентност в хода на монотерапията с MDL-860 може да бъде свързано с регистрираните мутации в VP3 и 2C региони. Протеин 2C притежава РНК-свързваща, нуклеотидно-свързваща и NTP-азна активност. Въпреки, че мутацията, открита в областта 2C, е тиха, смятаме, че това може да играе роля в морфогенезата на вириона и РНК капсулирането чрез взаимодействие с капсидния протеин VP3 (de Jong AS *et al.*, 2002; Burns C., *et al.*, 2006; Burns, C. *et al.*, 2009; Asare, E. *et al.*, 2016). Когато изследвахме влиянието на курса на РМО по схема САА, открихме: (1) нуклеотидна мутация в шестата верига на 5'-UTR IRES; (2) мутация в областта 2A с едно заместване на аминокиселина; (3) мутации с липса на аминокиселинно заместване в VP3, 2A и 2C, които присъстват в пробите от курсовете на монотерапия. Тези мутации доведоха до възпрепятстване на развитието на резистентност към всяко от антивирусните лекарства, включени в комбинацията. Освен това те биха могли да обяснят феномена на повишената лекарствена чувствителност, наблюдавана в курса на САА с тройна комбинация РМО срещу експериментална CVB1 инфекция *in vivo*. Причина за това явление може да се дължи на мутация, локализирана в шестата бримка на 5' UTR IRES, което може да наруши функционирането на EV репликативни комплекси или промяната в свойствата на 2A протеина поради аминокиселинните замествания на ароматен хидрофилен полярен остатък с една неароматна положително заредена аминокиселина.

Наблюдаваните фенотипни и генотипни мутации доведоха до лекарствена резистентност на CVB1 в случаите на монотерапия (плеконарил, MDL-860 и

оксоглауцин) и до по-висока чувствителност на вируса към тези вещества, когато са включени в САА лечението.

4. Изследване *in vitro* на индивидуалните ефекти на синтезирани диарил етери и техни аналози върху репликацията на ентеровируси - коксакивирус В1 (CVB1), коксакивирус В3 (CVB3) и полиовирус 1 Sabin (PV1). *In vivo* изследване на показалите висока активност съединения при *in vitro* скрининга

От досегашните ни проучвания в областта на експерименталната химиотерапия на ентеровирусните инфекции и по-специално разработването на тройни комбинации от ентеровирусни инхибитори за приложение *in vivo*, включването на диарил етера MDL-860 се оказа с ключово значение за изграждане на високоефективна комбинация за *in vivo* приложение. Въпреки докладваните обещаващи резултати в литературата, напоследък този клас съединения беше изоставен от гледна точка на по-нататъшно изследване на тяхната антивирусна активност. По този начин нашето първо проучване върху антивирусните средства беше фокусирано върху синтеза и оценката на антивирусната активност и цитотоксичността на серия от нови диарил етери и техни аналози. Наши предварителни данни с прилагане на MDL-860 *in vitro* и *in vivo* показват, че са налице сериозни експериментални проблеми, свързани с ниската му разтворимост във вода (респ. в биологични среди) и от тук сравнително ниското ниво на индивидуалната му активност *in vivo* на модела на CVB1 невроинфекция в новородени мишки. Без съмнение това съединение е важна отправна точка за разработването на ефективна анти-ентеровирусна химиотерапия, поради своя специфичен механизъм на анти-ентеровирусно действие. За да се усили анти-ентеровирусния ефект на този тип съединения (аналози на MDL-860), целта бе да се проведе синтез на нови диарил етери и техни аналози с анти-ентеровирусна активност, включително провеждане на анализ на зависимостта структура-активност и на тази основа - насочен синтез на съединения с по-силен ефект (Pürstinger, G. et al., 2008). Настоящото изследване беше фокусирано върху оценката на антивирусната активност и цитотоксичността на новосинтезирана библиотека от съединения.

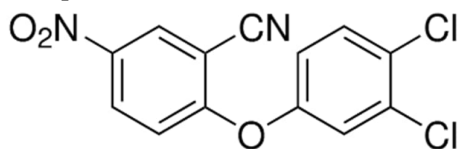
4.1. Анти-ентеровирусна активност на съединения 1a-12a

Нашите по-нататъшни изследвания продължиха с определяне на цитотоксичността и антивирусната активност на серия новосинтезирани аналози на MDL-860, които притежават 2-циано-4-нитрофенилов остатък, свързан с различни ароматни или алифатни групи чрез О, N и S атоми (Dobrikov, G. et al., 2017) (Фигура 18). Всички целеви съединения са изолирани и пречистени чрез колонна хроматография, а изясняването на химическата структура е постигнато чрез ЯМР и

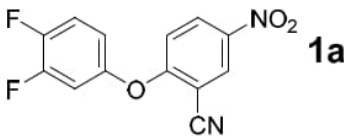
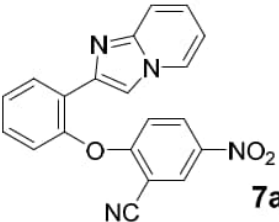
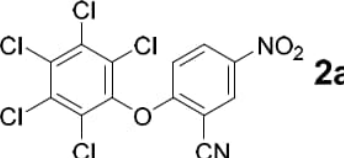
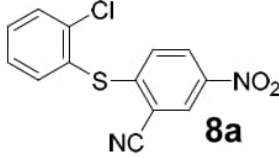
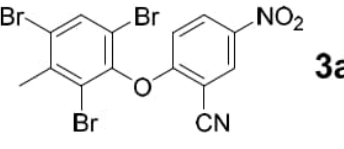
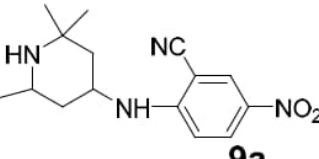
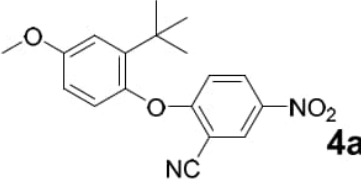
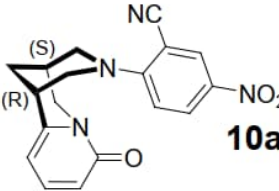
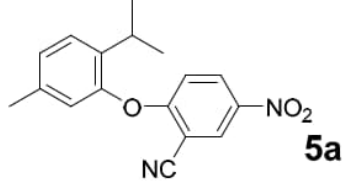
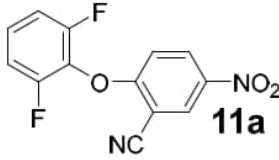
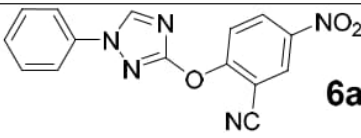
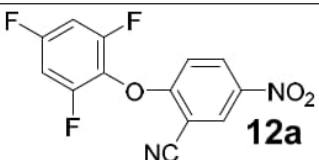
мас-спектроскопия. Структурата на **1a** допълнително е потвърдена чрез рентгено-структурен анализ. Информацията, която е получена може да послужи за по-нататъшни молекулярни докинг изследвания на тези съединения.

Серията съединения **1a-12a** бе тествана в клетъчни култури (HEp-2) срещу три ентеровируса, а именно полиовирус 1 (PV1), коксаки вирус B1 (CVB1) и коксаки B3 (CVB3) и бе определена цитотоксичната концентрация. Съединението MDL-860 бе използвано като референтна субстанция (Таблица 13). Диарил етер **1a** показва силен антивирусен ефект срещу PV1 и CVB1 (стойности на SI съответно 118 и 405), като е неактивен срещу CVB3. Съединения **2a** и **3a** показваха умерен ефект (SI 20.5 и 19.6, съответно) срещу CVB3. Гранична активност към CVB1 беше установена за **2a** (SI 10.9). Съединения **3a-10a** могат да се считат за неактивни срещу трите вируса, включени в скрининга (с изключение на ниска активност на съединение **3a** срещу CVB3). Забележителна активност на **11a** и особено на **12a** беше демонстрирана срещу PV1 и CVB1 вируси. Нито едно от тестваните съединения не повтори антивирусния спектър на MDL-860 и ефектите, обхващащи и трите ентеровируса (стойности на MDL-860 SI от 72.5, 586.9 и 182 спрямо PV1, CVB1 и CVB3, съответно). Трябва да се подчертае забележителната нечувствителност на CVB3 към активните съединения. Освен това, съединение **1a** (с най-голяма структурна прилика спрямо MDL-860) демонстрира една от най-високите активности спрямо два други вируса (PV1 и CVB1).

По отношение на цитотоксичността на изследваните съединения (срещу HEp-2 клетки), всички като цяло са нетоксични (с изключение на **4a**). Някои от тях (**3a**, **6a**, **7a**, **8a** и **10a**) показват дори по-ниска токсичност от MDL-860.



2-(3,4-дихлорофенокси)-5-нитробензонитрил (MDL-860)

 1a	 7a
 2a	 8a
 3a	 9a
 4a	 10a
 5a	 11a
 6a	 12a

Фигура 18. Структурни формули на новосинтезирани аналози 1a-12a.

Конкретно в това изследване броят на съединенията не е достатъчен, за да осигури адекватен QSAR анализ, но някои връзки структура-активност могат да бъдат коментирани. Първоначалният анализ на структурата и активността показва, че подчертана ефективност обикновено се демонстрира от два- или три халоген-заместени диарил етерни аналози на MDL-860 (Markley, L. D. et al., 1986; Pürstinger, G. et al., 2008).

Таблица 13. *In vitro* анти-ентеровирусна активност и цитотоксичност в клетки HEp-2 на съединения 1a-12a.

Съед.	Цитотокс. CC ₅₀ (μM)	PV1		CVB1		CVB3	
		IC ₅₀ (μM)*	SI	IC ₅₀ (μM)*	SI	IC ₅₀ (μM)*	SI
1a	320.0	2.7	118.0	0.8	405.0	NA	-
2a	119.1	NA	-	10.9	10.9	5.8	20.5
3a	570.3	NA	-	256.1	2.2	29.6	19.6
4a	22.0	NA	-	NA	-	NA	-
5a	94.3	NA	-	16.2	5.8	NA	-
6a	570.8	NA	-	190.1	3.0	NA	-
7a	718.0	NA	-	NA	-	NA	-
8a	53.8	NA	-	NA	-	9.9	5.4
9a	675.0	NA	-	NA	-	426.0	1.5
10a	492.2	234.0	2.1	152.2	3.2	NA	-
11a	355.0	6.8	52.2	0.7	507.1	NA	-
12a	517.5	2.7	191.6	0.75	690	NA	-
MDL-860	493.0	6.8	72.5	0.8	586.9	2.7	182.0

*NA-not active

Резултатите за съединения 1a, 11a и 12a потвърждават това заключение. Други заместители (ароматни хетероцикли в 6a и 7a) или замествания на свързан с мост кислороден атом с друг хетероатом (8a-10a) водят до липса на активност. Подобен ефект се наблюдава, когато халогенните заместители се заменят с други (4a-5a). Интересно е да се отбележи, че съединение 1a (структурно най-близкият дифлуоро аналог на MDL-860) няма активност само срещу CVB3. От друга страна, не са известни аналози на MDL-860, съдържащи повече от три халогенни атома във втория пръстен. В това проучване само едно пентахлоро замествено съединение (2a) демонстрира умерен антивирусен ефект. Разбира се, този единичен пример не е представителен, така че това може да бъде една от посоките за по-нататъшни изследвания.

Във връзка с *in vivo* експериментите първоначално изследвахме ефекта на референтното съединение MDL-860. Осъществен е монотерапевтичен курс с MDL-860, прилаган подкожно в различни дневни дози, и група плацебо. Данните са представени в Таблица 14 и Фигура 19. Групи от 30-40 новородени мишки бяха заразени подкожно с 20 MLD₅₀ от коксакивирус В1 до 24-тия час след раждането им. Животните бяха подложени на 12 дневни лечебни курсове MDL-860, като терапията започваше в деня на заразяването. За подбиране на оптимална терапевтична доза, MDL-860 бе изпитван в четири дневни дози: 25, 50, 75 и 100 мг/кг. При експериментите

бяха проследени кумулативната смъртност (в проценти), теглото (в грамове) и средното време на преживяемост на животните в групите (в дни). Лечебният курс продължава 12 дни след вирусната инокулация. Ежедневно се отчита леталитета и теглото на животните. Ефектът на прилаганите терапевтични курсове се определя въз основа на показателите кумулативна смъртност и средно време на преживяване (MST). При прилагане на MDL-860 в дози 75 и 100 мг/кг се наблюдава увеличено време на преживяемост в двете групи, сравнени с група плацебо (3.9 и 2.3 дни, респективно).

Таблица 14. Индивидуален ефект на MDL-860 при експериментална невроинфекция с коксакивирус В1 в новородени мишки.

Групи	Преживели /общо ^a	Смъртност, %	MST±SD, дни ^b	PC	PI%
MDL-860, 25 mg/kg	0/102	100.0	3.4±0.7	1	0
MDL-860, 50 mg/kg	0/66	100.0	4.1±0.8	1	0
MDL-860, 75 mg/kg	0/40	100.0	7.8±1.3 ^c	1	0
MDL-860, 100 mg/kg	0/24	100.0	6.2±0.7	1	0
Плацебо	0/65	100.0	3.9±0.7	1	0

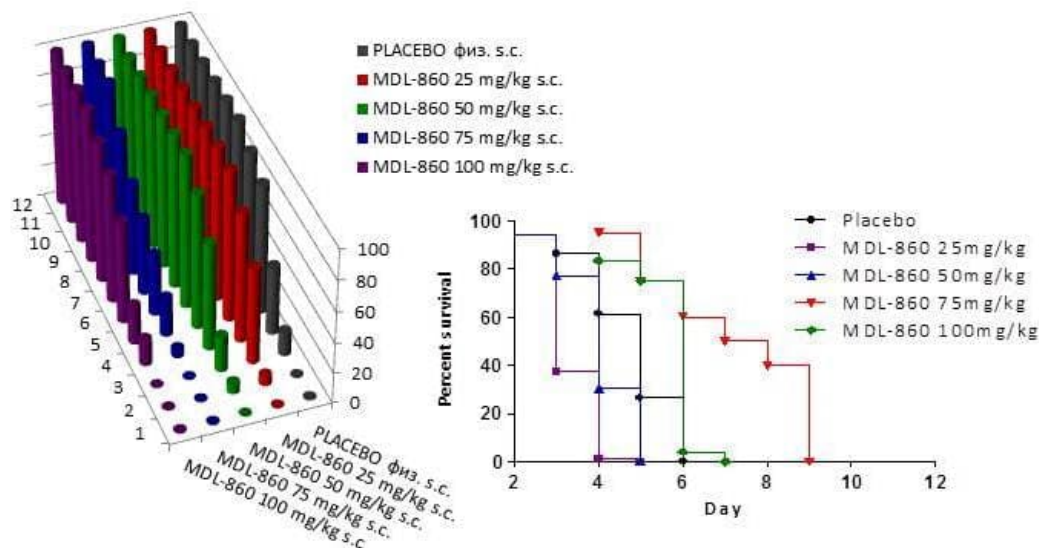
^aTwo tailed Fisher's exact test

^bOne-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparison post-test)

^cP<0.001 към плацебо и P<0.0001 към MDL-860 (50 мг/кг)

Данните в таблицата са усреднени от три независими експеримента.

Използвана терминология: MST (mean survival time) – средно време на преживяване; PC (protection coefficient) – коефициент на защита; PI (protection index) – индекс на защита; SD (standard deviation) – стандартно отклонение;



Фигура 19. Монотерапевтичен курс с MDL-860, прилаган подкожно в различни дневни дози при невротропна коксаки В1 вирусна инфекция в новородени мишки.

В следващите Таблицы 15 и 16 и Фигури 20 и 21, са представени данните за токсичността на MDL-860 в заразени и интактни животни. Поради липсата на самостоятелен ефект на MDL-860 в дози до 100 мг/кг, теглото на инфектираните с коксакивирус В1 и третирани със съединението животни е проследено до деня на тяхната смърт. При неинфектираните с вирус животни теглото на мишките е проследено до 10-тия ден от началото на терапевтичния курс.

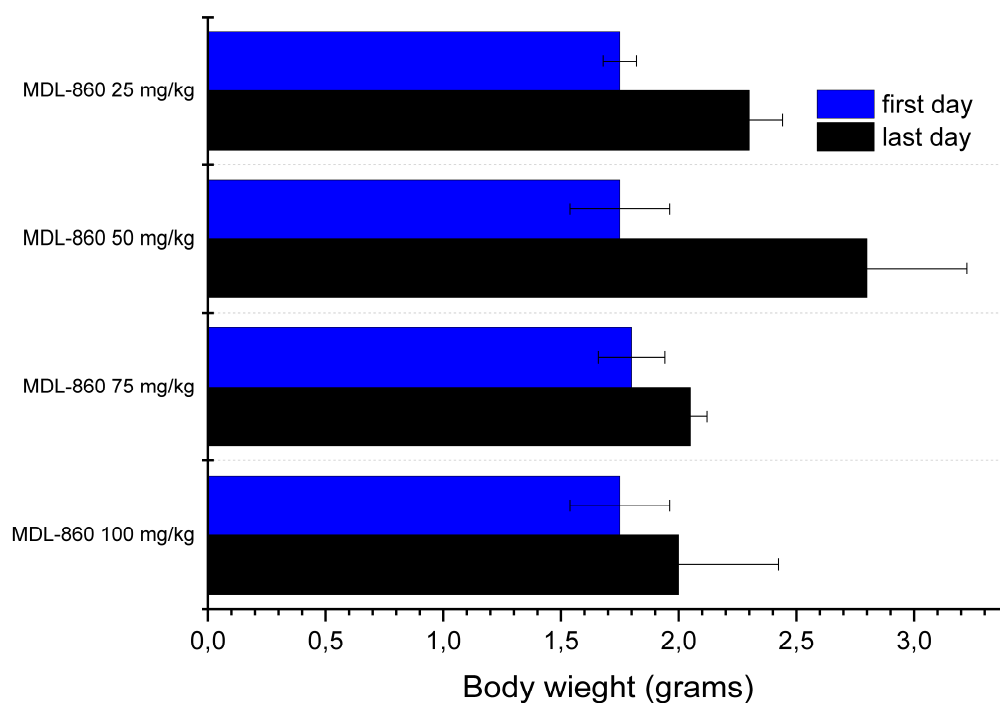
Таблица 15. Дневно тегло (в грама) на животните заразени с коксаксивирус В1 (s.c. 20 MLD₅₀ CVB1) и третируни с MDL-860 в различни дневни дози.

Доза MDL-860	1	2	3	4	5	6	7	8
25 mg/kg	1.8±0.2	1.8±0.3	1.8±0.3	2.0±0.3	-	-	-	-
50 mg/kg	1.8±0.1	1.9±0.1	2.0±0.1	2.7±0.5	-	-	-	-
75 mg/kg	1.6±0.3	1.7±0.2	2.0±0.1	2.2±0.4	2.5±0.6	-	-	-
100 mg/kg	1.8±0.2	1.9±0.2	1.9±0.1	2.1±0.3	2.2±0.1	2.4±0.2	2.5±0.2	2.0±0.4

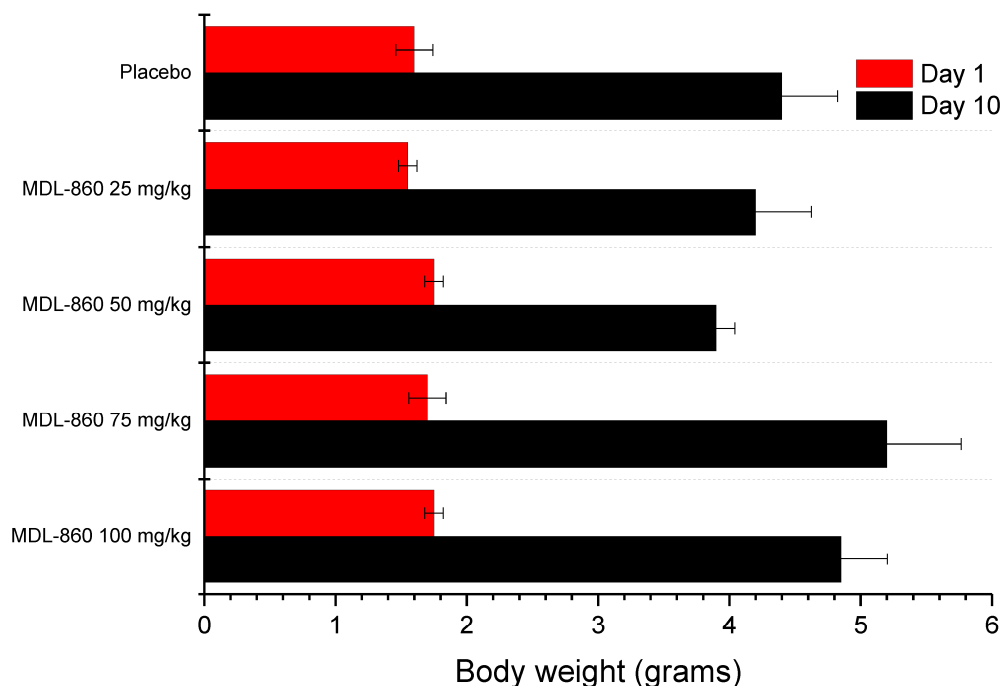
Таблица 16. Дневно тегло (в грама) на незаразени животни третируни с MDL-860 в различни дневни дози.

Доза MDL-860	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Плацебо	1.6±0.1	1.8±0.2	1.9±0.4	2.2±0.6	2.4±0.6	2.6±0.7	2.9±0.9	3.2±0.9	3.6±0.7	3.9±0.7
25 mg/kg	1.5±0.1	1.5±0.1	1.7±0.2	1.9±0.2	2.0±0.2	2.4±0.1	2.4±0.2	2.9±0.3	3.6±0.2	4.2±0.4
50 mg/kg	1.7±0.1	1.8±0.1	1.9±0.1	2.0±0.2	2.2±0.2	2.4±0.1	2.6±0.3	2.9±0.2	3.1±0.3	3.9±0.1
75 mg/kg	1.7±0.1	2.1±0.2	2.3±0.2	2.6±0.1	3.2±0.3	3.5±0.2	4.4±0.3	4.5±0.3	4.7±0.4	5.2±0.6
100 mg/kg	1.8±0.1	1.9±0.4	2.2±0.4	2.6±0.3	3.1±0.5	3.5±0.4	4.0±0.3	4.5±0.4	4.8±0.6	4.9±0.4

На Фигури 20 и 21 са представени графичните варианти на Таблицы 15 и 16, съответно. Сравнявайки тези фигури, особено отчетливо се вижда, че MDL-860 в изпитвания диапазон от дози не показва забележима *in vivo* токсичност.



Фигура 20. Графично представяне на дневното тегло (в грама) на животни, заразени с коксаксивирус В1 и третируни с MDL-860 в различни дневни дози.



Фигура 21. Графично представяне на дневното тегло (в грама) на незаразени животни, третиран с MDL-860 в различни дневни дози.

От *in vitro* скрининга бяха подбрани най-активните съединения 1a, 11a и 12a и бяха тествани при експериментална CVB1 невроинфекция в новородени мишки от произволно отгледана ICR линия, заразени с масивен вирусен инокулум (20 LD₅₀). Те се прилагат в 12-дневен курс на лечение, започващ в деня на инокулацията на вируса. Подкожната дневна доза на съединенията е следната: съединения 1a и 11a - 50 mg/kg, съединение 12a - 25 mg/kg и MDL-860 - 75 mg/kg. Получените резултати са представени в Таблица 17 и Фигура 22.

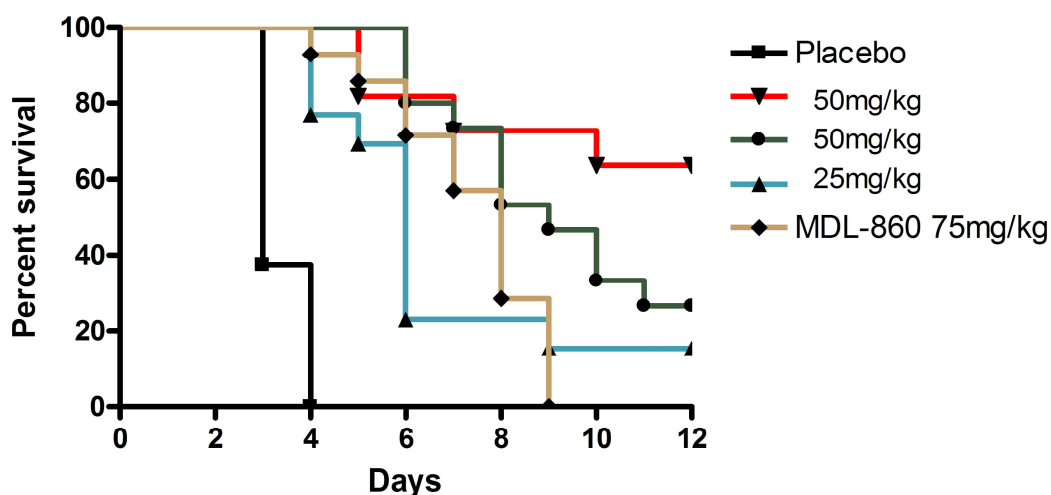
Таблица 17. *In vivo* изследване на активността на съединения 1a, 11a и 12a при експериментална коксаки B1 (CVB1) невроинфекция в новородени мишки.

Съединение	Оцелели/ Общо	MST±SD дни ^a	Δ дни	Смъртност, %	PI, %
1a	22/24	8.1±1.0***	+5.0	50.0	50.0
11a	9/27	8.5±1.0***	+5.4	66.7	33.3
12a	3/26	5.7±1.2*	+2.6	88.4	11.6
MDL-860	0/27	6.1±1.6**	+3.0	100	0
Placebo	0/17	3.1±0.3	-	100	0

Данните са от три независими експеримента (усреднени). ^a One-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparison post-test); MST - mean survival time; PI - protection index; SD - standard deviation; ****p* < 0,0001 vs. placebo group; ***p* < 0,01 vs. placebo group; **p* < 0,05 vs. placebo group.

От получените резултати се вижда, че съединение 1a демонстрира най-висока активност, постигайки защитен ефект от 50% и много ясно изразено удължаване на MST с 5 дни. Установена е подчертана активност при курса със съединение 11a (PI=33.3 % и MST удължен с 5.4 дни). Съединение 12a показва слаб защитен ефект (PI=11.6 % и Δ дни от 2.6). Обратно, активността на MDL-860 беше белязана само от удължаване на

MST с 3 дни. *Markley* и екип са тествали *in vivo* MDL-860 и пет други аналози (срещу Coxsackievirus A21 при мишки) (*Markley et al*, 1986), но не е коректно да се сравняват резултатите от двете проучвания, тъй като при нашите експерименти приложението е подкожно, а при експериментите на *Markley* и екип, приложението е перорално и срещу различни вируси. Очевидно съединения 1a и 11a могат да бъдат характеризирани като перспективни анти-CVB агенти, които се нуждаят от допълнително проучване. В предишна работа установихме много висока активност при експериментална невроинфекция с коксаки вирус B1 в мишки при курс на лечение с последователно редуващо се приложение (CAA) на тройна комбинация от ентеровирусни инхибитори с включен MDL-860 като партньор (*Stoyanova, A. et al.*, 2015). Би било от голям интерес тестване на ефекта от CAA курса чрез тройна комбинация, в която MDL-860 е заменен със съединение 1a.



Фигура 22. Индивидуални ефекти на съединения 1a (червено), 11a (тъмно зелено), 12a (синьо) и MDL-860 при експериментална невротропна инфекция с коксаки B1 в новородени мишки.

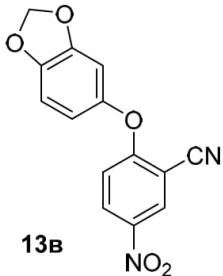
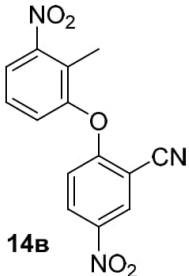
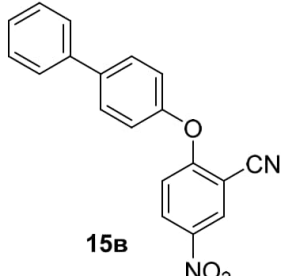
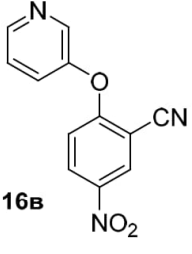
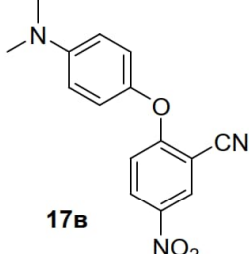
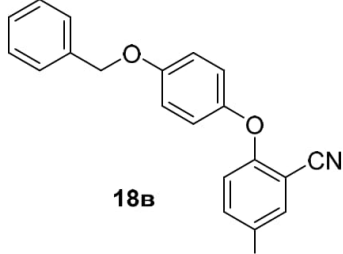
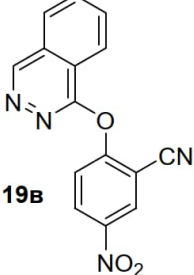
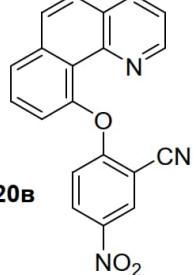
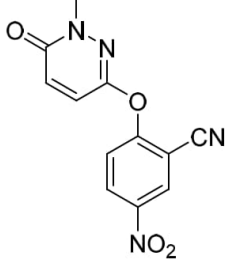
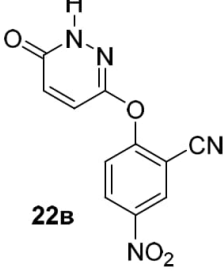
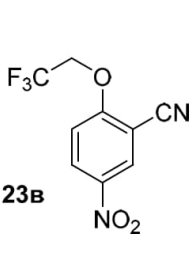
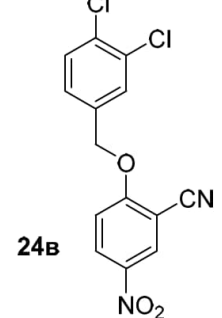
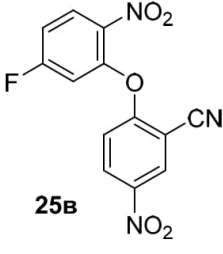
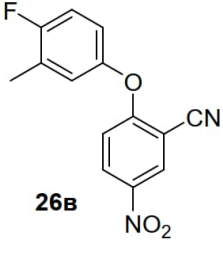
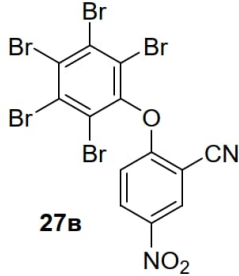
От настоящите изследвания става ясно, че най-обещаващо е разработването на нови аналози на MDL-860, носещи непроменен 2-циано-4-нитро пръстен. В предишната ни работа (*Dobrikov, G. et al*, 2017) първоначалният скрининг на дванадесет MDL-860 аналози (Таблица 13) доведе до три съединения (1a, 11a и 12a) с висока активност срещу PV1 и CVB1 и само две съединения (2a и 3a) с умерена активност спрямо CVB3. В допълнение, съединения 1a, 11a и 12a показват активност спрямо експериментална CVB1 невроинфекция при новородени мишки.

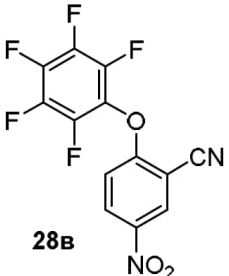
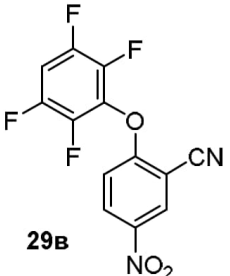
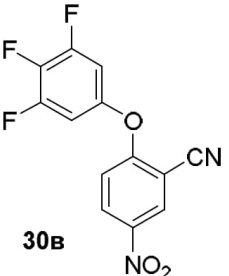
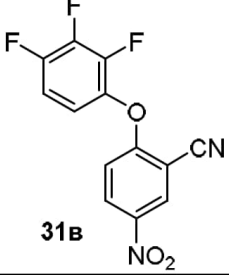
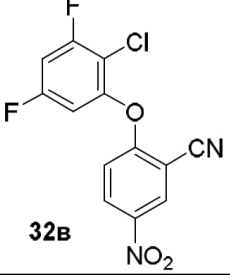
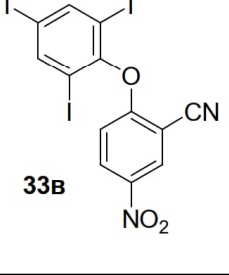
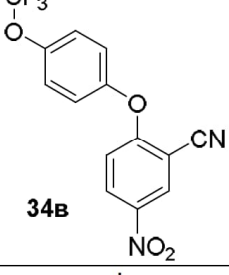
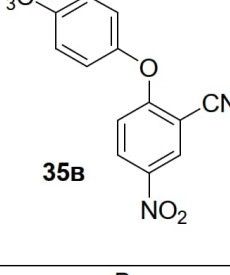
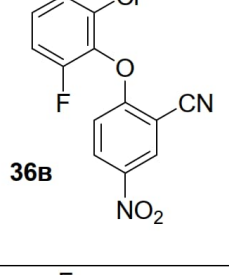
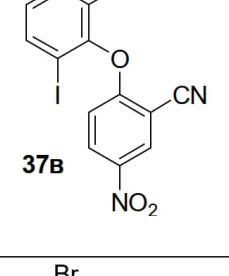
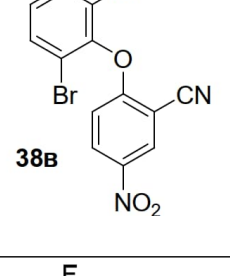
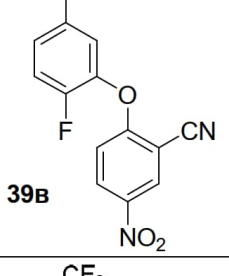
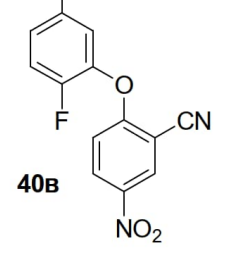
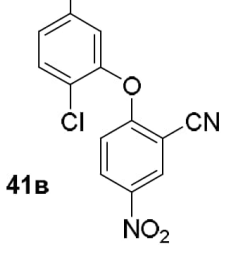
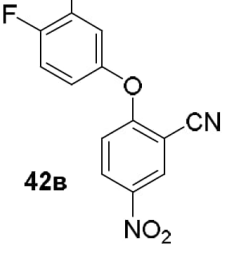
4.2. Анти-ентеровирусна активност на новосинтезирани съединения 13в-72в

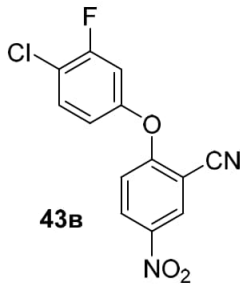
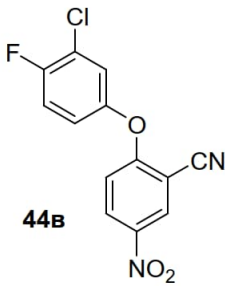
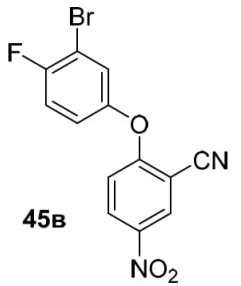
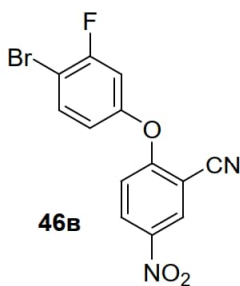
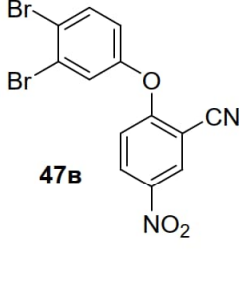
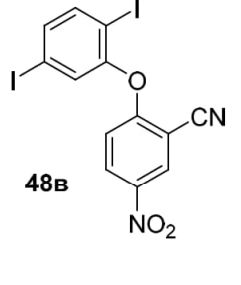
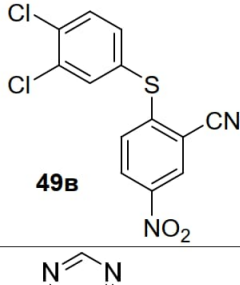
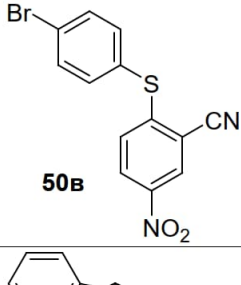
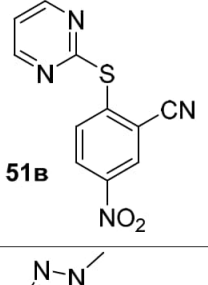
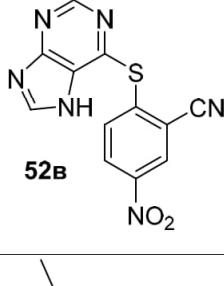
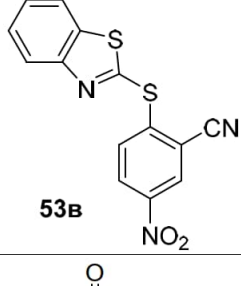
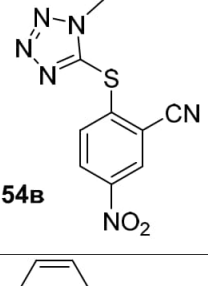
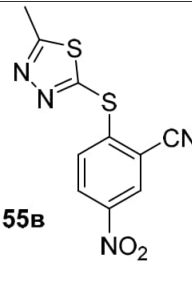
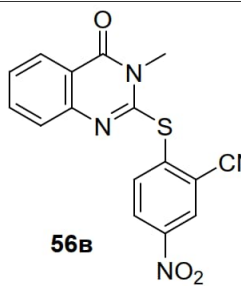
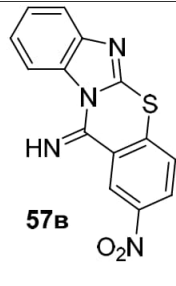
Целта на нашето по-нататъшно проучване (*Nikolova, I. et al*, 2019) е синтезът на нови аналози на MDL-860, притежаващи непроменен 2-циано-5-нитро заместен бензен пръстен като общ фрагмент (Фигура 23, разположена на следващите 4 страници), за да се докажат границите на възможните вариации в другия пръстен на MDL-860, водещи до подобрена антивирусна активност. Така бяха синтезирани

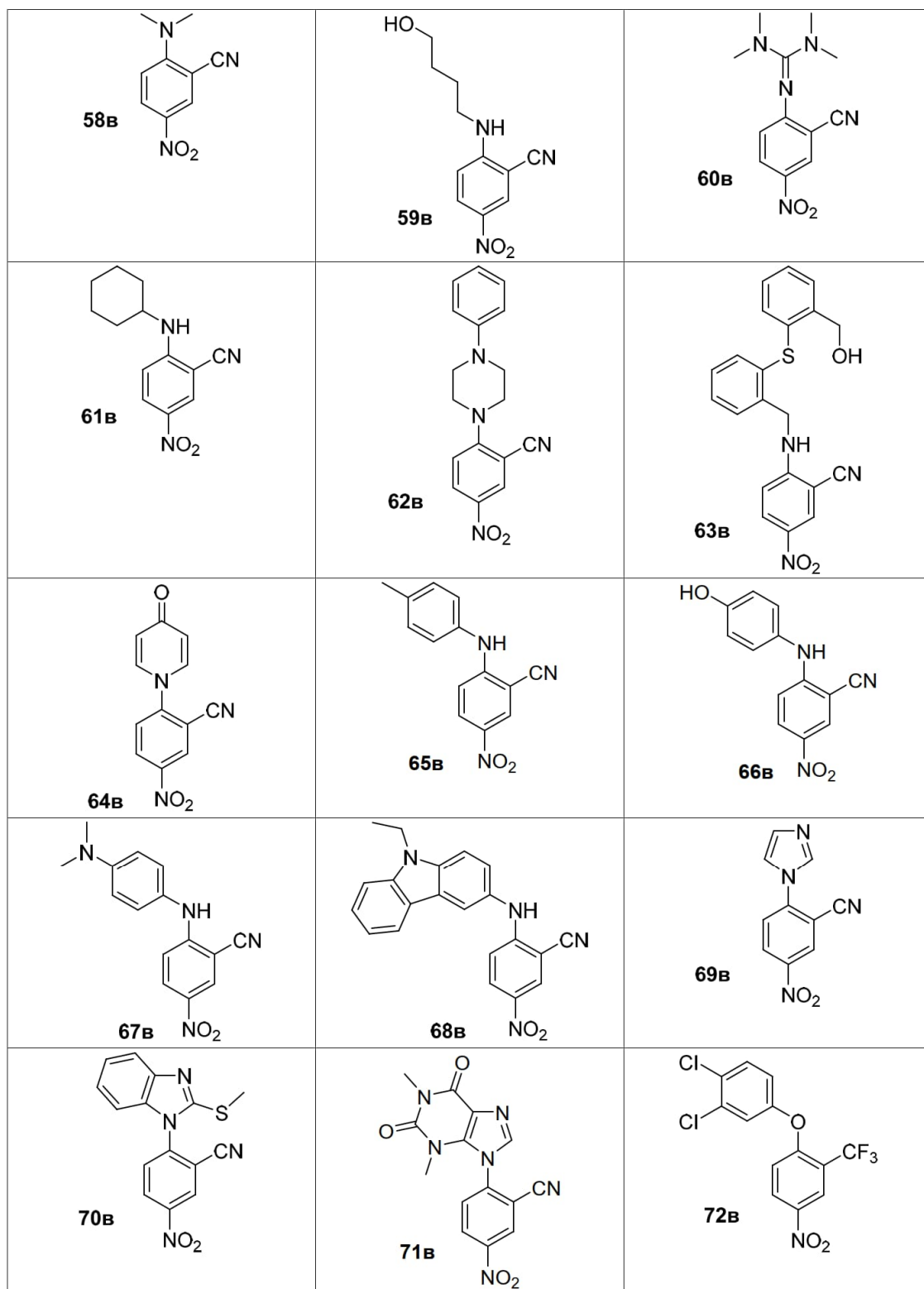
четири серии от аналози на MDL-860 и оценени за антивирусна активност. Всички целеви съединения са получени чрез едноетапни реакции на нуклеофилно ароматно заместване на серии от феноли, тиоли, амини и *N*-хетероцикли с 2-хлоро-5-нитробензонитрил в присъствието на основа. Всички съединения са пречистени чрез колонна хроматография и/или прекристализация.

Синтезираните производни на MDL-860 (13**в**-72**в**) бяха подложени на *in vitro* скринингово изследване за активност спрямо PV1, CVB1 и CVB3 (Таблица 18). Използван е тестът за инхибиране на СРЕ, следвайки процедурата на Borenfreund и Puerner (Borenfreund, E. et al., 1985). Публикуваните преди това данни за съединения 1**а**-12**а** (вижте Таблица 13) са коментирани за сравнение (Dobrikov, G. et al., 2017) Беше демонстрирано, че съединение 39**в** (по аналогия с MDL-860) притежава най-широк спектър на действие в това проучване (срещу PV1, CVB1 и CVB3). Съединение 47**в** е активно срещу CVB1 и CVB3. Значителна активност спрямо PV1 и CVB1, демонстрирана от 40**в**. Съединения 32**в** и 41**в** са ефективни само срещу CVB1, а 34**в**, 42**в** и 45**в** – само срещу PV1. Умерена активност срещу PV1 и CVB1 беше демонстрирана от съединение 16**в**; срещу PV1 – само с 29**в**, 30**в**, 36**в** и 44**в**; съединение 25**в** е активно срещу CVB1, а 26**в** – срещу CVB3. Трябва да се спомене, че антивирусната активност на 29**в**, 30**в**, 35**в** и 49**в** е изследвана в началото на 80-те години срещу риновируси и Coxsackie A21 вирус (Markley, L. et al., 1986). Техните активности като цяло са по-високи в сравнение с тези, наблюдавани срещу PV1, CVB1 и CVB3 в това проучване (Таблица 18). Само MDL-860 може да се счита, че притежава широк спектър на действие – той демонстрира висока *in vitro* активност срещу всички тествани риновируси и коксаки вируси.

 13B	 14B	 15B
 16B	 17B	 18B
 19B	 20B	 21B
 22B	 23B	 24B
 25B	 26B	 27B

 28B	 29B	 30B
 31B	 32B	 33B
 34B	 35B	 36B
 37B	 38B	 39B
 40B	 41B	 42B

 43B	 44B	 45B
 46B	 47B	 48B
 49B	 50B	 51B
 52B	 53B	 54B
 55B	 56B	 57B



Фигура 23. Структурни формули на синтезирани аналози на MDL-860 13B-72B.

Сред тиоетерите, **51в** и **56в** демонстрират слаба активност срещу CVB1. Основният недостатък на **56в** изглежда е неговата сравнително висока цитотоксичност ($CC_{50} = 18.7 \mu M$). Тъй като тиоетерите могат лесно да се окисляват в биологична среда, не е ясно дали **51в** и **56в** са активните съединения или са просто пролекарства. Следователно е необходимо допълнително изследване на сулфонови аналози на **51в** и **56в**.

Данните, представени в Таблица 18, недвусмислено показват, че дори малки промени в молекулата на MDL-860 драматично влияят върху *in vitro* активността. Интересното е, че нови активни съединения се забелязват изключително сред диариловите етери. Изследвайки по-подробно групата от 2-циано-5-нитро заместени етери (съединения **1а-5а**, **7а**, **8а**, **10а**, **11а** и **13в-48в**), става ясно, че присъствието на два и три халогенни заместителя на различни позиции във втория бензенев пръстен е оптимално за демонстриране на висока активност. От друга страна, полихалогенираните етери (**2а**, **15в-17в**) са неактивни. Повечето диарилови етери (с няколко изключения: **24в**, **27в**, **30в**, **36в**, **44в**) показват много ниска токсичност. След като наскоро бе разкрит механизмът на действие на MDL-860 (Arita, M. et al., 2017), може да се твърди, че всички активни диарил етери вероятно имат подобен механизъм на действие, а именно необратима ковалентна модификация на фосфатидилинозитол-4 киназа III бета (PI4KB).

PI4KB е един от най-важните ензими в клетките на бозайниците, отговорен за репликацията на ентеровирусите в клетката-гостоприемник (Hsu, N.-Y., et al., 2010). Може да се предположи, че промяната на халогенните заместители в диариловите етери е важна. Това може да причини малки промени във формата и геометрията на молекулите, но може да повлияе значително на модификацията на PI4KB и съответно на *in vitro* активността.

Друг тип заместители (напр. **4а**, **5а**, **13в-15в**, **17в**, **18в**, **25в**, **26в**) или присъствието на хетероциклични остатъци (**10а**, **11а**, **16в**, **19в-22в**) вместо бензенев пръстен, обикновено водят до липса на активност. Други серии от съединения (**49в-57в**, **58в-68в**, **69в-71в** и **72в**), съдържащи различни мостови хетероатоми (като S или N) са напълно неактивни (с изключение на **56в**). Трябва да се отбележи, че дори много близки изостерични аналози на MDL-860 (като тиоетер **49в** или етер **72в**) също са неактивни. Вероятно тези съединения не са в състояние да модифицират PI4KB или претърпяват биохимични трансформации преди да достигнат до ензима.

Таблица 18. Данни от *in vitro* скрининга за анти-ентеровирусна активност на съединения 13в-72в.

Съединение ^a	Цитотокс. CC ₅₀ (μM)	PV1		CVB1		CVB3	
		IC ₅₀ (μM)	SI	IC ₅₀ (μM)	SI	IC ₅₀ (μM)	SI
MDL-860	493.0	6.8	72.5	0.8	586.9	2.7	182.0
13в	123.0	NA	–	NA	–	NA	–
14в	175.0	NA	–	NA	–	NA	–
15в	123.0	NA	–	NA	–	NA	–
16в	332.0	30.6	11.5	22.8	14.5	NA	–
17в	346.6	NA	–	NA	–	NA	–
18в	280.0	NA	–	NA	–	NA	–
19в	450.0	NA	–	NA	–	NA	–
20в	576.0	NA	–	NA	–	NA	–
21в	423.0	NA	–	NA	–	NA	–
22в	367.0	NA	–	142.0	2.5	NA	–
23в	165.0	NA	–	NA	–	NA	–
24в	10.1	NA	–	NA	–	NA	–
25в	291.0	NA	–	12.7	22.9	NA	–
26в	680.0	NA	–	NA	–	54.0	12.5
27в	47.1	NA	–	NA	–	NA	–
28в	195.0	79.0	2.4	NA	–	NA	–
29в	287.0	22.8	12.6	NA	–	NA	–
30в	18.7	1.0	18.7	NA	–	NA	–
31в	95.0	11.0	8.6	NA	–	NA	–
32в	199.0	32	6.2	2.1	95	NA	–
33в	572.0	NA	–	NA	–	NA	–
34в	219.0	6.8	32.2	NA	–	NA	–
35в	272.0	NA	–	NA	–	NA	–
36в	30.7	1.8	17.0	NA	–	NA	–
37в	92.0	NA	–	NA	–	NA	–
38в	547.0	NA	–	NA	–	NA	–
39в	785.0	11.0	71.3	6.4	122.6	6.8	115.4
40в	234.0	2.7	86.6	6.1	38.3	NA	–
41в	342.0	NA	–	2.9	117.9	NA	–
42в	200.0	4.3	46.0	NA	–	NA	–
43в	155.0	10.0	15.5	NA	–	NA	–
44в	30.5	5.2	5.8	NA	–	NA	–
45в	107.0	1.0	107	NA	–	NA	–
46в	215.0	NA	–	NA	–	NA	–
47в	493.0	NA	–	3.7	133.2	1.0	493.0
48в	273.0	NA	–	NA	–	NA	–
49в	132.0	NA	–	NA	–	NA	–
50в	211.0	NA	–	NA	–	NA	–
51в	187.5	NA	–	24.9	7.5	NA	–

52в	161.3	NA	–	NA	–	NA	–
53в	13.6	NA	–	NA	–	NA	–
54в	14.6	NA	–	NA	–	NA	–
55в	16.5	NA	–	NA	–	NA	–
56в	18.7	NA	–	3.1	6.0	NA	–
57в	349.2	NA	–	NA	–	NA	–
58в	651.0	NA	–	NA	–	NA	–
59в	332.6	NA	–	NA	–	NA	–
60в	336.7	NA	–	NA	–	NA	–
61в	495.4	NA	–	NA	–	NA	–
62в	617.0	255.0	2.4	NA	–	NA	–
63в	12.6	NA	–	NA	–	NA	–
64в	346.6	NA	–	NA	–	NA	–
65в	199.0	NA	–	NA	–	NA	–
66в	55.4	NA	–	NA	–	NA	–
67в	336.4	NA	–	NA	–	NA	–
68в	454.0	NA	–	NA	–	NA	–
69в	332.8	NA	–	NA	–	NA	–
70в	94.2	NA	–	NA	–	NA	–
71в	339.9	NA	–	NA	–	NA	–
72в	22.8	NA	–	NA	–	NA	–

^a MDL-860 е използвано като референтно съединение.

NA – not active

Съединение 72в е единственият аналог на MDL-860 в това изследване, притежаващ различен заместител в първичния ароматен пръстен (-CF₃ вместо -CN). Ролята на заместителите в този пръстен все още е неясна и са необходими допълнителни изследвания на такива серии от съединения. Например, някои публикувани резултати (Markley, L. D. et al., 1986) показват, че заместването на циано групата с карбоксилна група в MDL-860 води до съединения с добра антивирусна активност. Освен това тази замяна автоматично позволява подобряване на разтворимостта във вода чрез възможно образуване на соли.

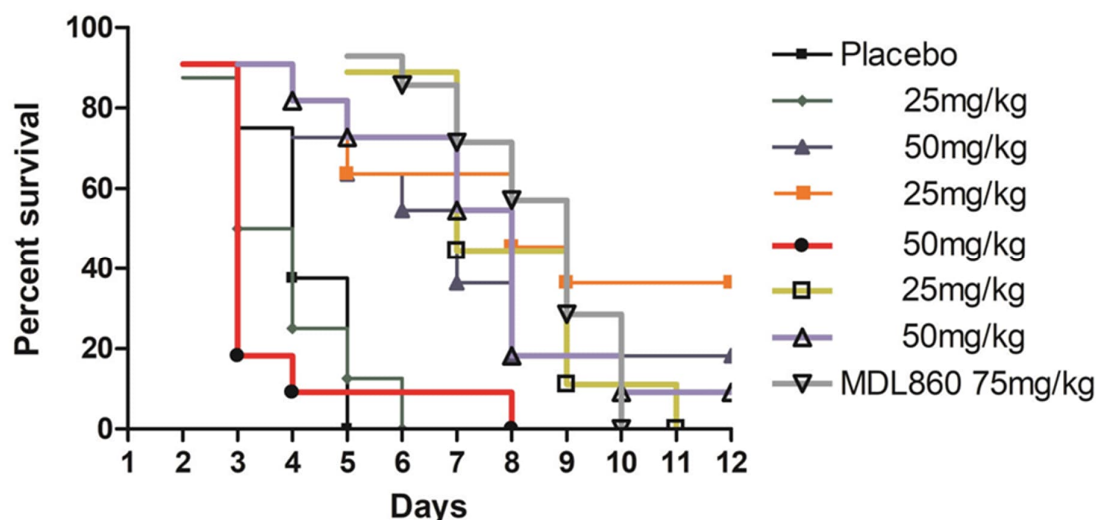
Новосинтезираните съединенията от тази серия, показали най-висока активност (39в, 41в и 47в) срещу CVB1 бяха тествани за *in vivo* активност при новородени мишки, експериментално заразени с 20 LD₅₀ CVB1. Съединения 39в, 41в и 47в бяха приложени подкожно в дневни дози от 25 и 50 mg/kg в 12-дневен курс от деня на вирусната инокулация. Получените резултати показват умерени защитни ефекти на 39в и 41в. Наблюдава се подчертано удължаване на средното време на преживяване за 41в (25 mg/kg) и 47в (25 mg/kg) (Таблица 19 и Фигура 24). Като се има предвид тази липса на активност, заедно с докладваните по-рано обещаващи резултати за съединения 1а (PI 50%), 11а (PI 33%) и 12а (PI 11%) (Таблица 17), може да се предположи, че няма корелация между *in vitro* и *in vivo* активност. Тъй като

фармакологичните свойства и особено механизмите на транспорт през клетъчните мембрани за тези диарил етери са неизвестни, е трудно да се обяснят тези резултати. Освен това, този тип съединения притежават изключително слаба разтворимост във вода. Природата на заместителите не позволява химическа модификация на активните съединения с цел подобряване на разтворимостта и/или мембрания транспорт (напр. превръщане в пролекарства – соли, естери и др.). По-нататъшното формулиране на *in vitro* активните съединения чрез получаване на наночастици или комплекси с водоразтворими полимери може значително да увеличи *in vivo* ефектите.

Таблица 19. *In vivo* изследване на активността на съединения 39в, 41в и 47в срещу коксаки В1 експериментална невроинфекция в новородени мишки (данните са усреднени от три независими експеримента).

Съединение/ Доза	Оцелели/ Общо	MST±SD, дни ^a	Δ, дни	Смъртност, %	PI, %
39в/25 mg/kg	0/16	3.2±0.5 ^{ns}	0.2	100	0
39в/50 mg/kg	3/21	5.4±0.5 ^{ns}	+2.4	86	14.2
41в/25 mg/kg	6/23	7.0±1.0 ^{**}	+4.0	74	26
41в/50 mg/kg	0/26	3.1±0.4 ^{ns}	+0.1	100	0
47в/25 mg/kg	0/17	6.1±0.8 [*]	+3.1	100	0
47в/50 mg/kg	1/23	4.6±0.6 ^{ns}	+1.6	96	4.3
MDL-860	0/27	6.1±0.9 [*]	+3.1	100	0
Placebo	0/16	3.0 ±0.3	–	100	0

^a One-way ANOVA (Bonferroni's multiple comparison post-test); MST - mean survival time; PI – protection index; SD – standard deviation; ^{**}*p*<0.01vs. placebo group; ^{*}*p*<0.05 vs. placebo group; ns – not significant



Фигура 24. Индивидуални ефекти на съединения 39в (зелено и сиво), 41в (оранжево и червено) и 47в (жълто и сиво) в експериментална невротропна инфекция с коксаки В1 в новородени мишки. MDL-860 беше използвано като референтна субстанция.

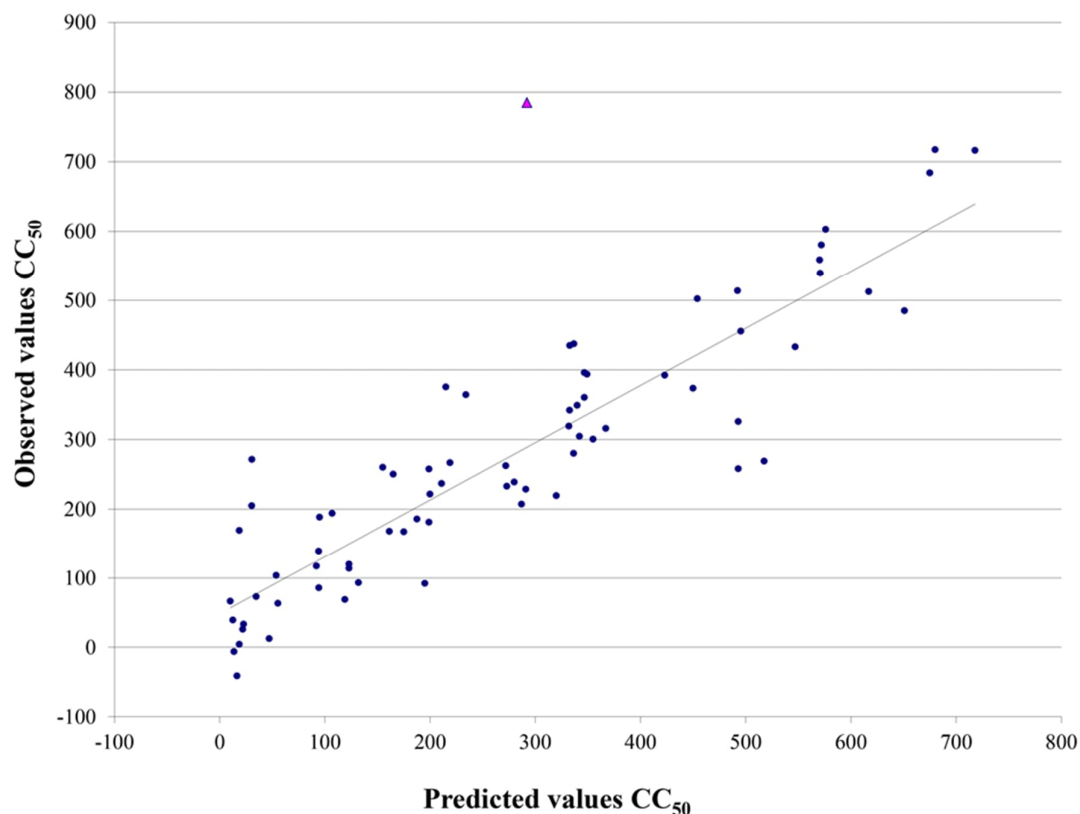
4.3. QSAR анализ за антивирусна активност на 1a-12a и 13b-72b

Проведеният QSAR анализ ни позволи да оценим ефектите на заместителите върху *in vitro* цитотоксичността (CC₅₀) и антивирусната активност (срещу PV1, CVB1, CVB3) на 5-нитробензонитрилните производни. В това изследване е използван набор от данни, състоящ се от 72 производни на 5-нитробензонитрил и едно производно на 3-трифлуорометилнитробензен. Структурните дескриптори за всички изследвани съединения бяха изчислени с помощта на подхода за симплексно представяне на молекулярната структура (SiRMS) (Kuz'min, V. E et al., 2008, 2010). Изчисляването на дескрипторите е извършено на 2D ниво на представяне на молекулната структура с помощта на програмата Dragon. В този случай се взема предвид само молекулярната топология, т.е. цялата информация се извлича от структурната формула. Трябва да се отбележи, че 2D-QSAR моделите са най-популярните в изследванията на свойствата на структурата. Ефективността на такива модели се дължи на факта, че топологичният модел на молекулярната структура имплицитно съдържа информация за възможните конформации на молекулата.

Симплексният подход се основава на изолиране и преброяване на броя на молекулните фрагменти (двойки, тройки, четворки атоми), в които се наблюдава определена последователност от промени в дадено свойство. Тоест, в рамките на SiRMS, всяка молекула може да бъде представена като система от различни специфични фрагменти (симплекси) с фиксиран състав и топология.

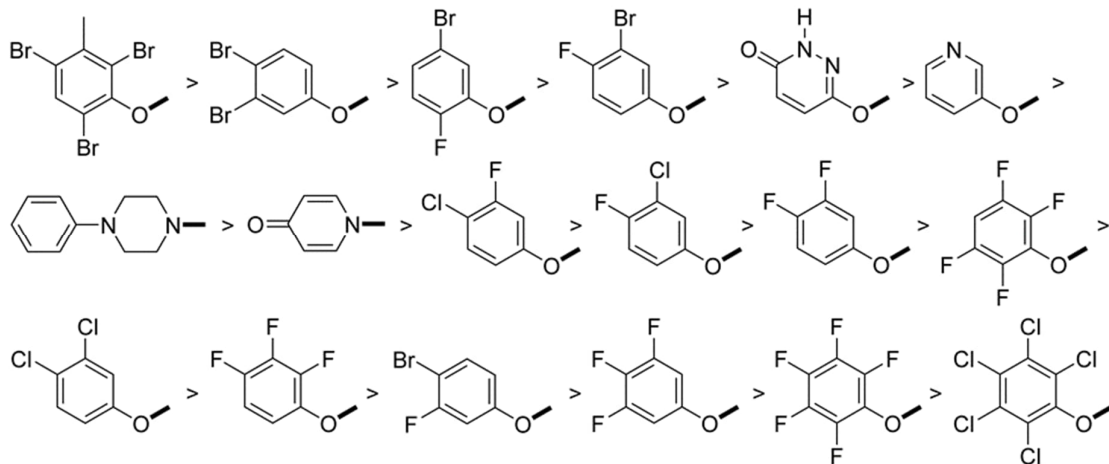
Освен това са използвани и определени параметри, получени от програмата Dragon (Dragon Professional version 5.5 -2007). Изчислени са общо около 8000 структурни дескриптора за оценените молекули. Процедурата на Trend Vector (Carhart, R. E. et al., 1985) е използвана за формиране на първоначални набори от молекулни дескриптори. За разработване на PLS-модели е приложена процедурата на генетичния алгоритъм (Hasegawa, K. et al., 1997).

Разработен беше QSAR модел, отразяващ структурното влияние на изследваните съединения върху тяхната цитотоксичност. При анализа на резултатите, получени от предварителния модел беше установено, че единствено съединение 39b е отклонение (Фигура 25, розов триъгълник), така че тази молекула беше изключена от набора от данни. По този начин 72 молекули бяха включени в набора за обучение за разработване на модел на молекулни структури. QSAR моделът послужи за допълнителна качествена оценка на ефекта на заместителите само върху цитотоксичността (виж Фигура 26).



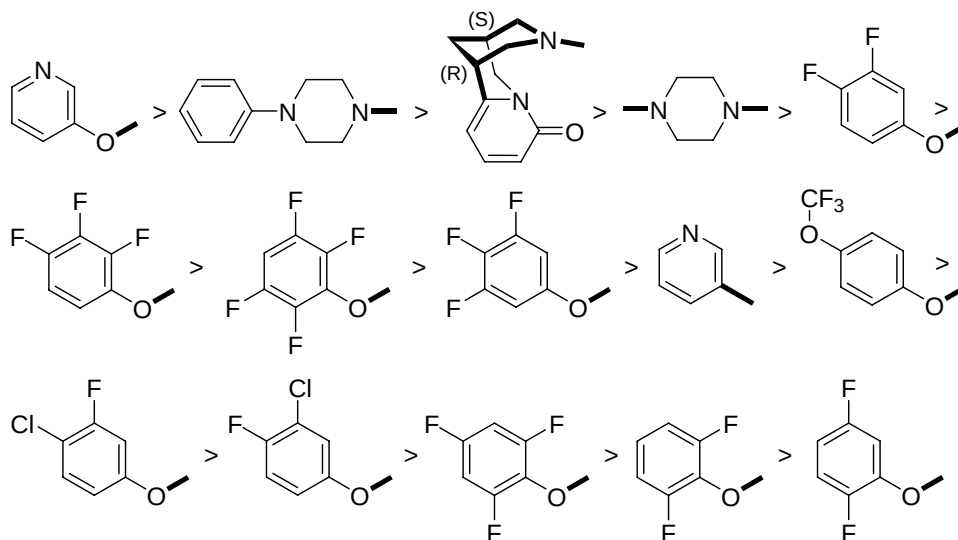
Фигура 25. Диаграма на наблюдаваните спрямо предсказаните стойности на цитотоксичност (CC_{50}) за 73 молекули; съединение 39b е отклонение (outlier).

Ясната механизична интерпретация е едно от предимствата на SiRMS подхода (Kuz'min, V. E. et al., 2010) Въз основа на разработени QSAR модели може да се изчисли влиянието на всеки атом върху конкретно свойство. Относителното влияние на различните заместители в позиция 2 на 5-нитробензонитрилната част върху цитотоксичността (CC_{50}) е показано на Фигура 26. Може да се каже, че въвеждането на флуорни и хлорни атоми в ароматния пръстен води до по-голяма цитотоксичност.



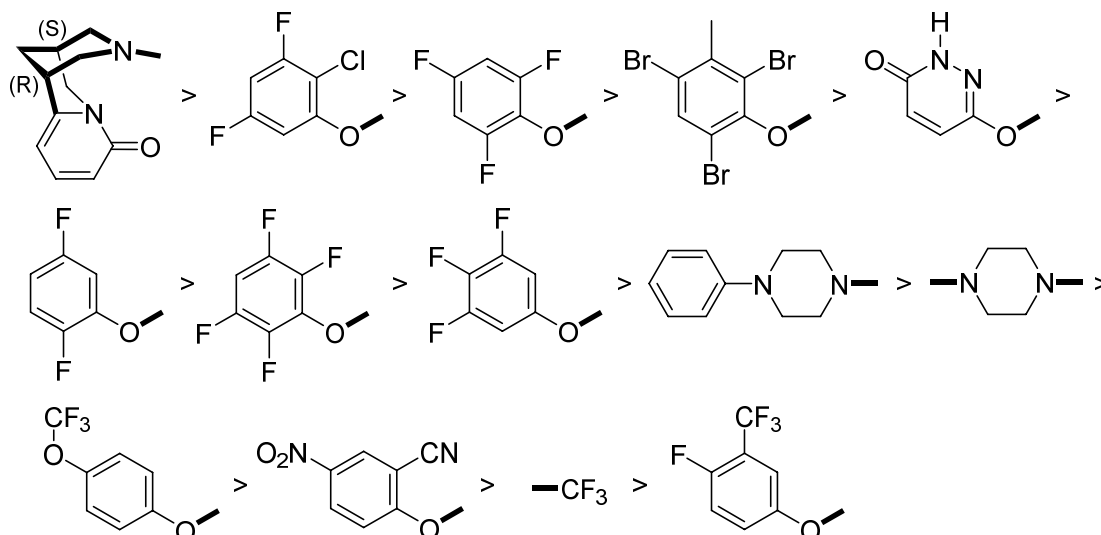
Фигура 26. Относително влияние на различните заместители в 2-позиция на 5-нитробензонитрила върху цитотоксичността (CC_{50}).

Анализът на интерпретацията на QSAR моделите позволява оценка на относителното влияние на заместителите в 5-нитробензонитрилната част върху активността (Фигура 27). Вижда се, че азотосъдържащите заместители подпомагат дадената активност в по-голяма степен.



Фигура 27. Относително влияние на различни заместители в 2-позиция на 5-нитробензонитрила върху активността срещу PV1.

Освен това бяха разработени класификационни QSAR модели по отношение на *in vitro* активността (IC_{50}) срещу коксаки вирус B1 (CVB1). Разработките на модела бяха извършени по подобен начин, с изключение на това, че в този случай имаше 19 активни и 54 неактивни молекули. Относителното влияние на заместителите върху антивирусната активност е дадено на Фигура 28.



Фигура 28. Относително влияние на различни заместители в 2-позиция на 5-нитробензонитрила върху активността срещу CVB1.

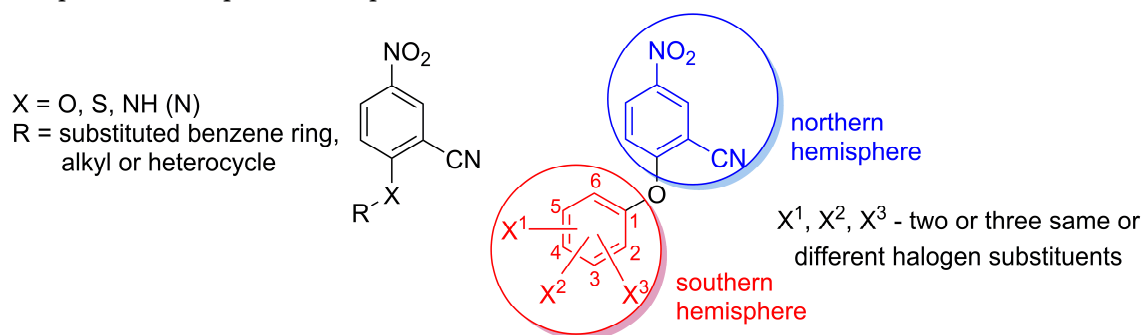
Както се вижда от тази последователност, характерът на влиянието на заместителите върху антивирусната активност срещу CVB1 се различава значително

от аналогичното влияние върху активността срещу PV1. Забелязва се, че присъствието на цитизинова група стимулира и двата типа активност.

За съжаление, не бяха получени адекватни QSAR модели за антивирусната активност на изследваните съединения срещу CVB3. Очевидно, това се дължи на високия дисбаланс в обучаващия набор, който съдържа само 8 активни съединения от общо 73.

Така бяха получени класификационни QSAR модели с адекватни статистически характеристики за оценка на антивирусната активност на изследваните съединения срещу полиовирус и коксакивируси. Тези модели ще бъдат използвани в бъдещи изследвания за виртуален скрининг и молекулен дизайн на нови антивирусни агенти, отговарящи на „областта на приложимост“ (DA) на разработените QSAR модели.

Въз основа на експерименталните данни, получени от нашите проучвания (Dobrikov, G. et al, 2017; Nikolova, I. et al., 2019), обобщение на структурата на най-активните съединения срещу PV1, CVB1 и CVB3 вируси е показано на Фигура 29. (дясна формула). Извършен е QSAR анализ на ефектите на заместителите върху *in vitro* цитотоксичността (CC₅₀) и антивирусната активност (срещу PV1, CVB1, CVB3) на нитробензонитрилните производни.



Фигура 29. Обща формула на всички получени съединения (лява формула) и активни 2-фенокси-5-нитробензонитрили (дясна формула)

Получените резултати позволиха да се извърши качествена оценка на ефекта на заместителите върху цитотоксичността на съединенията и да се конструират адекватни QSAR модели за антивирусна активност срещу PV1 и CVB1. Тези модели биха могли да бъдат полезни за по-нататъшен виртуален скрининг и молекулярен дизайн на нови антивирусни агенти в съответствие с „приложимостта на домейна“ (DA) на разработените QSAR модели.

Нашето проучване разкри, че представените нитробензонитрилни производни са обещаващ клас антивирусни агенти, притежаващи висока *in vitro* активност и селективност към PV1, CVB1 и CVB3 вируси, придружени с много ниска цитотоксичност. Слабата разтворимост във вода на тези съединения е възможно обяснение за липсата на корелация между тяхната *in vitro* и *in vivo* активност. Независимо от това, допълнителни *in vivo* експерименти могат да бъдат предприети

след подходяща формулировка на активните *in vitro* съединения. Може да се заключи, че в рамките на настоящото изследване сме изчерпали повечето възможности за успешни вариации на заместителите в южното полукълбо на молекулата на MDL-860. Изглежда, че промените в северното полукълбо могат да бъдат много по-перспективни за по-нататъшни изследвания за подбор на по-ефективни съединения в борбата с ентеровирусните инфекции.

4.4. QSAR анализ на новосинтезирани диарил етери и техните аналози като широкоспектрни антивирусни средства

Антивирусните лекарства с широк спектър на действие са клинично необходими за ефективно овладяване на новопоявяващи се и повтарящи се вирусни инфекции. Въз основа на натрупаните данни от съвместната работа на екипа, антивирусният скрининг продължи с нова серия съединения, чиито дизайн е съобразен с изводите направени следствие на QSAR анализ на предходните резултати. Освен това, в разгара на епидемията от коронавирус, започнахме скрининг на новосинтезираните съединенията, включени в настоящата дисертация и за анти-коронавирусна активност срещу отдавна известния човешки коронавирус OC43 (HCoV-OC43), който генетично е много близък до SARS-CoV-2 и двата от род *Betacoronavirus*, който ни послужи като моделен вирус. И коронавирусите, подобно на ентеровирусите притежават положителен едноверижен РНК геном и за тях е характерно, че попадайки в клетката „принуждават“ клетъчната PI4KB да генерира органели, обогатени на фосфатидилинозитол-4-фосфат - нар. репликативни органели или репликативни мембрани, които служат като платформа за вирусната репликация (Hsu et al., 2010). Инхибирането на този ензим води до невъзможност да протече нормално вирусната репликация и по този начин вирусът не може да се намножи. Затова в търсенето на нови методи за борба с ентеровирусните и коронавирусните инфекции (както потенциално и с инфекции, причинени от други +РНК-вируси), етапът в инфекциозния процес, а именно взаимодействието на вируса с клетката-гостоприемник посредством ензима фосфатидилинозитол 4-киназа бета (PI4KB) изглежда особено обещаващ. Определен брой инхибитори на PI4KB са открити и тествани в последните няколко години (Arita, M., 2016; Mejdrová, D et al., 2017). Въпреки разнообразната си химична структура, всички тези съединения се разглеждат като аналози на препарата Enviroxime (Heinz, B.A. et al., 2017). След неочакваното възникване на епидемията от COVID-19, единственият подход бе прилагане на т.нар. слаяп скрининг сред вече съществуващи лекарствени средства. Търсенето на качествено нови подходи в борбата с коронавирусните инфекции стана изключително актуален с оглед на тежката епидемиологична обстановка по време на пандемията, а също така и с оглед на огромната вероятност от повторение на подобни бедствия в бъдеще. Практически пълната липса на ефективни средства за борба с

посочените вирусни заболявания, както и тежестта на негативните им влияния върху човечеството, налага фокусирането на научен потенциал върху решаването на тези проблеми. Предвид мащабите и пораженията на глобалната криза, причинена от COVID-19, може уверено да се твърди, че намирането на ефективни антивирусни препарати ще бъде цел номер едно за световната наука в следващите години.

Възможностите за химиотерапевтично лечение на коронавирусните инфекции все още са изключително ограничени. Само антивирусните агенти ремдесивир, паксловид (нирматрелвир) и молнупиравир имат официално разрешение от Американската агенция по храните и лекарствата (FDA) за употреба срещу COVID-19

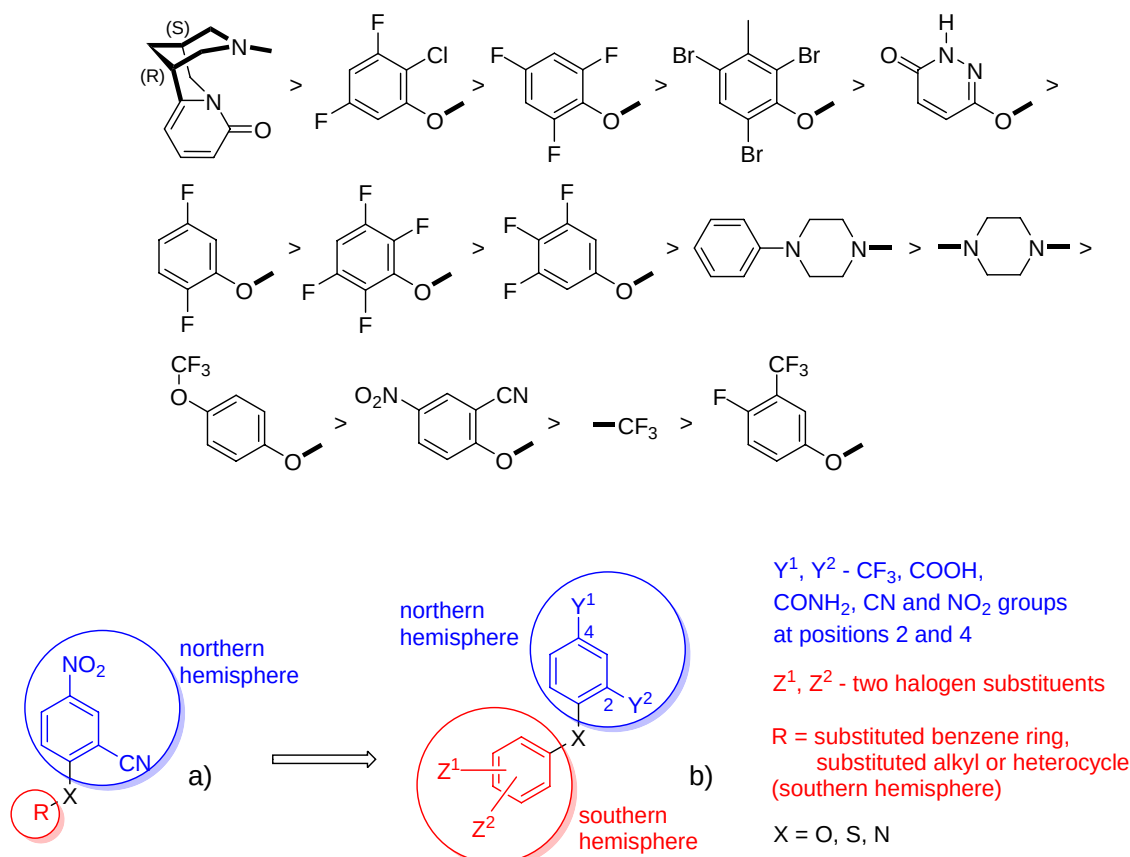
(<https://files.covid19treatmentguidelines.nih.gov/guidelines/covid19treatmentguidelines.pdf>). Тези лекарства обаче също са доста спорни поради ограничената си ефективност и много странични ефекти. Големи усилия се полагат в областта на имунологията, откъдето идват някои забележителни резултати – масова ваксинация на населението, която допринася отчасти за ограничаване на пандемията.

Отдавна е известно, че диариловите етери проявяват антивирусни свойства. Въпреки обещаващите резултати, този клас съединения никога не е бил тестван срещу по-широк спектър от вируси, извън групата на пикорнавирусите/ентеровирусите. Нашата цел беше да проведем скрининг за *in vitro* активността на новосинтезираните диарил етери (аналози на MDL-860) срещу панел от различни вируси. Освен това QSAR моделите са получени за панел от новосинтезирани съединения, както и съединения, докладвани в нашите предишни проучвания. Моделите предоставят ценна представа за структурните/физикохимичните характеристики на съединенията, които са от съществено значение за набора от изследвани антивирусни дейности. Молекулярният дизайн на съединенията в това изследване се основава на предишния ни опит в получаването на нови диарил етери като антивирусни средства (Dobrikov, G. et al., 2017; Nikolova, I. et al., 2019). Постигнахме няколко малки серии от съединения (Фигура 30), съдържащи два ароматни фрагмента, свързани с хетероатом X.

Първата серия се основава на продължаването на синтеза на нови диарилови етери, притежаващи класическата позиция на нитро- и циано- групите в едно ароматно ядро, както в MDL-860 (X=O, Фигура 30a). Другата серия се основава на дихало заместено южно полукълбо и северно полукълбо с две групи за изтегляне на електрони в позиции 2 и 4 (Фигура 30b).

В резултат на данните от QSAR, бяха синтезирани допълнителни съединения (Фигура 31, разположена на 3 страници): диарил тиоетер (92c), амини (93c и 94c), диарил етери (95c и 78c; 105c – 111c), диол (96c), диарил етер-киселини (97c – 101c), диарил тиоетер (112c). Pürstinger и екип (2008) са публикували данни за синтеза на 77c и неговата активност срещу коксакивирус В3.

Дизайнът на съединения 113с и 114с е резултат не само от заключенията на QSAR анализа, но също така те са избрани да бъдат аналози на фенофибрат – лекарство, използвано за лечение на абнормни нива на липидите в кръвта. Интересното е, че последните проучвания разкриха, че това съединение може значително да намали инфекцията със SARS-CoV-2 *in vitro* (Davies, S.P. et al., 2021).



Фигура 30. Молекулен дизайн на аналозите на MDL-860.

4.5. *In vitro* антивирусна активност на съединения 73с-114с

В тази група са получени няколко малки серии от съединения (Фигура 31), съдържащи два ароматни фрагмента, свързани с хетероатом X. Първата серия се основава на продължаването на синтеза на нови диарилови етери, притежаващи класическата позиция на нитро- и циано- групите в едно ароматно ядро, както в MDL-860 (X=O, Фигура 30a). Другата серия се основава на дихало- заместено южно полукълбо, и северно полукълбо с две електрон-акцепторни групи в позиции 2 и 4 (Фигура 30b). Всичките 42 синтезирани съединения (Фигура 31) (Nikolova, I. et al., 2022) бяха тествани *in vitro* срещу пет вируса (Таблица 20), а именно PV1, CVB1, CVB3, човешки аденовирус С серотип 5 (HAdV-5) и човешки коронавирус OC43 (HCoV-OC43). Съединението MDL-860 беше синтезирано съгласно описаната процедура (Pürstinger, G. et al., 2008) и използвано като референтно в това изследване.

Във връзка с COVID-19 епидемията, чийто причинител е коронавирус SARS-CoV-2, започнала в края на 2019 г. в град Ухан, Китай и за кратко време превзела

цялата планета, решихме да включим в антивирусния скрининг като моделен вирус човешки коронавирус ОС43. Сравнително високият процент на смъртност в сравнение с други вирусни инфекции, огромните икономически щети, нарушено функциониране на всички дейности по целия свят, превърна пандемията в най-голямото предизвикателство на човечеството днес. Възможностите за химиотерапевтично лечение на коронавирус инфекциите са изключително ограничени. Само антивирусното средство Remdesivir има официално разрешение от FDA за употреба срещу COVID-19 (Beigel, J.H. et al., 2020), но това лекарство също е доста противоречиво поради ограничената си ефективност и много странични ефекти. Липсата на ефективни и универсално признати лекарства срещу COVID-19, си остава сериозен проблем. Полагат се големи усилия областта на имунологията, където бяха разработени няколко вида ваксини. Коронавирусите подобно на ентеровирусите притежават еднOVERИЖЕН положителен РНК геном и имат общ механизъм на репликация като те също набират мембранни липиди върху т.нар. репликационни органели в клетката, които участват в обработката на вирусните полипротеини и регулират ензимната активност.

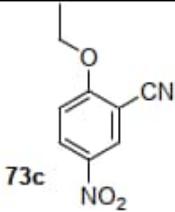
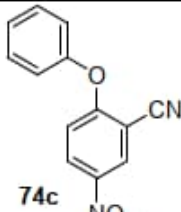
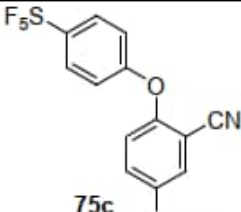
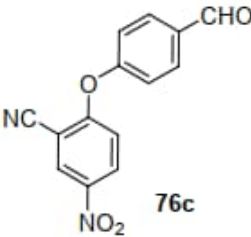
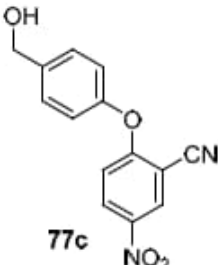
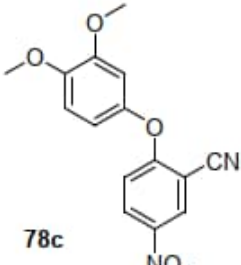
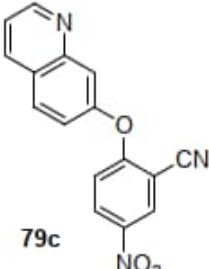
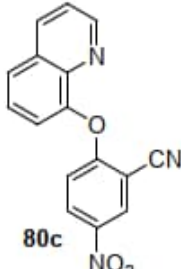
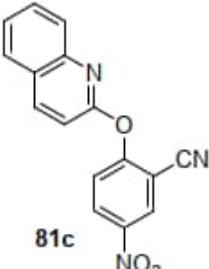
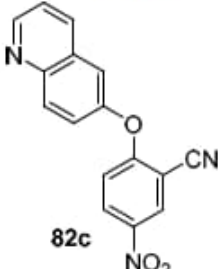
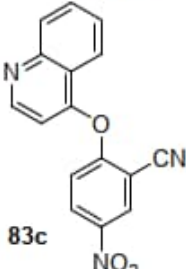
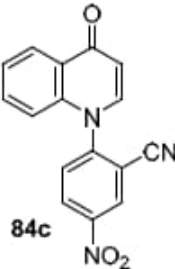
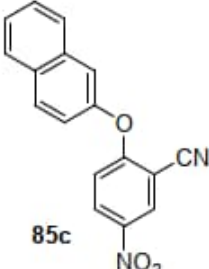
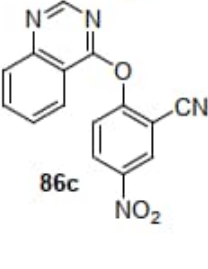
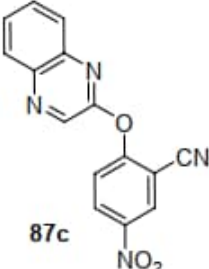
В антивирусния скрининг включихме и човешки аденовирус тип 5 (HAdV-5), чийто геном е двувЕРИЖНА ДНК, поместена в капсид, без външна обвивка. Аденовирусите обикновено причиняват инфекции на дихателните пътища, вариращи от обикновена настинка до бронхит и пневмония. В зависимост от вида, HAdV може причинят гастроентерит, конюнктивит, цистит и други (Lynch, P.J. et al., 2016). Репликацията на HAdV се извършва в ядрото на клетката-гостоприемник, което е сложна среда, в която протичат много клетъчни процеси. Съответно, HAdV трябва да кооптира или антагонизира много клетъчни пътища, като същевременно реорганизира съществуващата ядрена среда, за да избегнат клетъчно присъщите антивирусни защити и хомеостатични регулаторни пътища, които реагират на присъствието на чужда ДНК и действат за потискане на експресията на вирусни гени и репликацията на ДНК (Weitzman, M.D. et al., 2005; Everett, R.D., 2006; Luftig, M.A. et al., 2014; Diner, B.A. et al., 2015; Komatsu, T. et al., 2016; Ma, Z. et al., 2018; Weitzman, M.D. et al., 2018). Стратегия, която изглежда е обща за всички вируси, включва образуването на специализирана клетъчна микросреда, където се набират клетъчни и вирусни макромолекули. Те са наречени вирусни фабрики, вироплазми или репликационни центрове или компартменти (RC). Това са местата, където се случва репликация и експресия на вирусния геном и в някои случаи тези индуцирани от вируса структури са свързани с местата на сглобяване на вирионите (Netherton, C. et al., 2007; Netherton, C. et al., 2011; Schmid, M. et al., 2014). В момента срещу аденовирусните няма прието химиотерапевтично лечение. Лечението е симптоматично, а антибиотиците се приемат за борба с вторичните бактериални инфекции. В тежки случаи, антивирусното лекарство cidofovir (Safrin, S. et al., 1999) може да се приложи, но неговата ефективност е съмнителна. Ваксина срещу някои видове HAdV е налична за

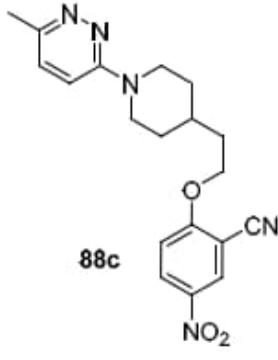
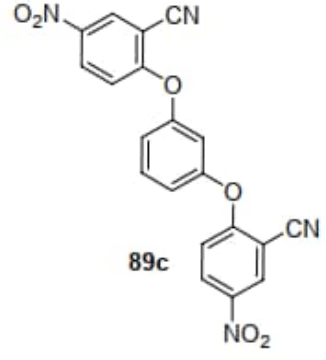
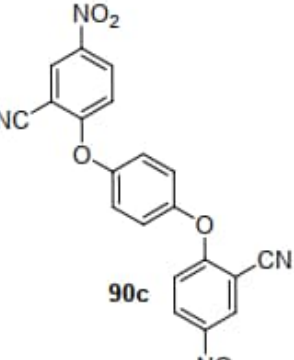
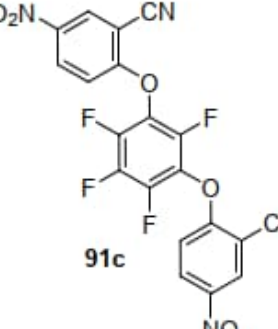
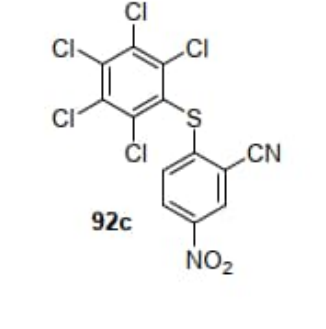
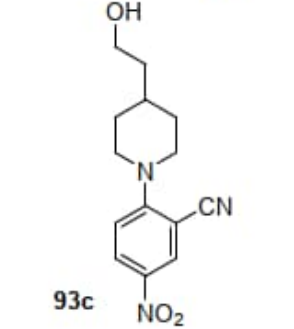
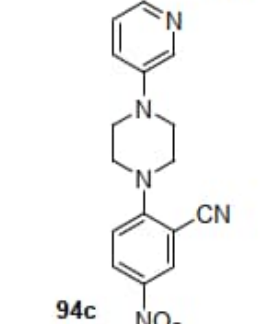
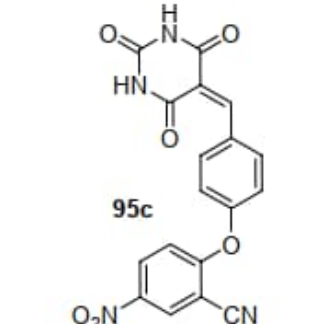
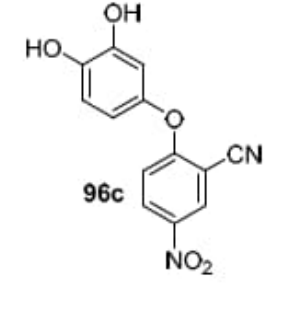
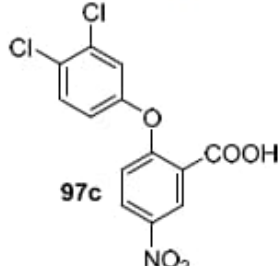
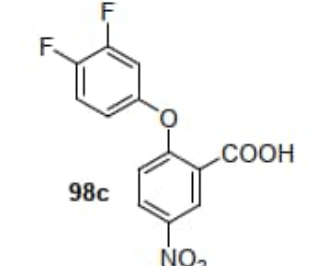
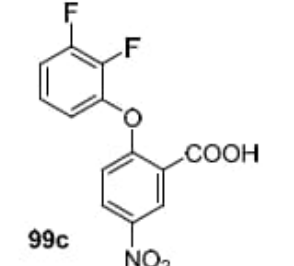
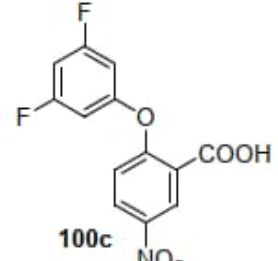
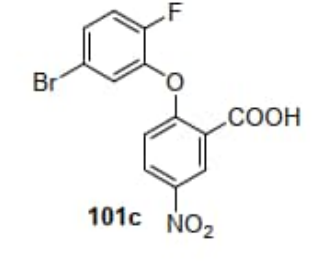
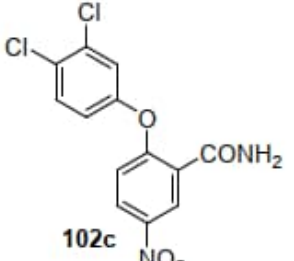
армията на Съединените щати, но не и за останалото население. Целта на настоящото изследване е скрининг за антивирусната активност на новосинтезираните аналози на MDL-860 срещу панел от различни вируси. Освен това QSAR моделите са получени за библиотека новосинтезираните съединения, както и съединения, докладвани в нашите предишни проучвания (*Dobrikov, G. et al.*, 2017; *Nikolova, I. et al.*, 2019). Моделите дават ценна представа за структурните/физикохимичните характеристики на съединенията, които са от съществено значение за набора от антивирусни мишени.

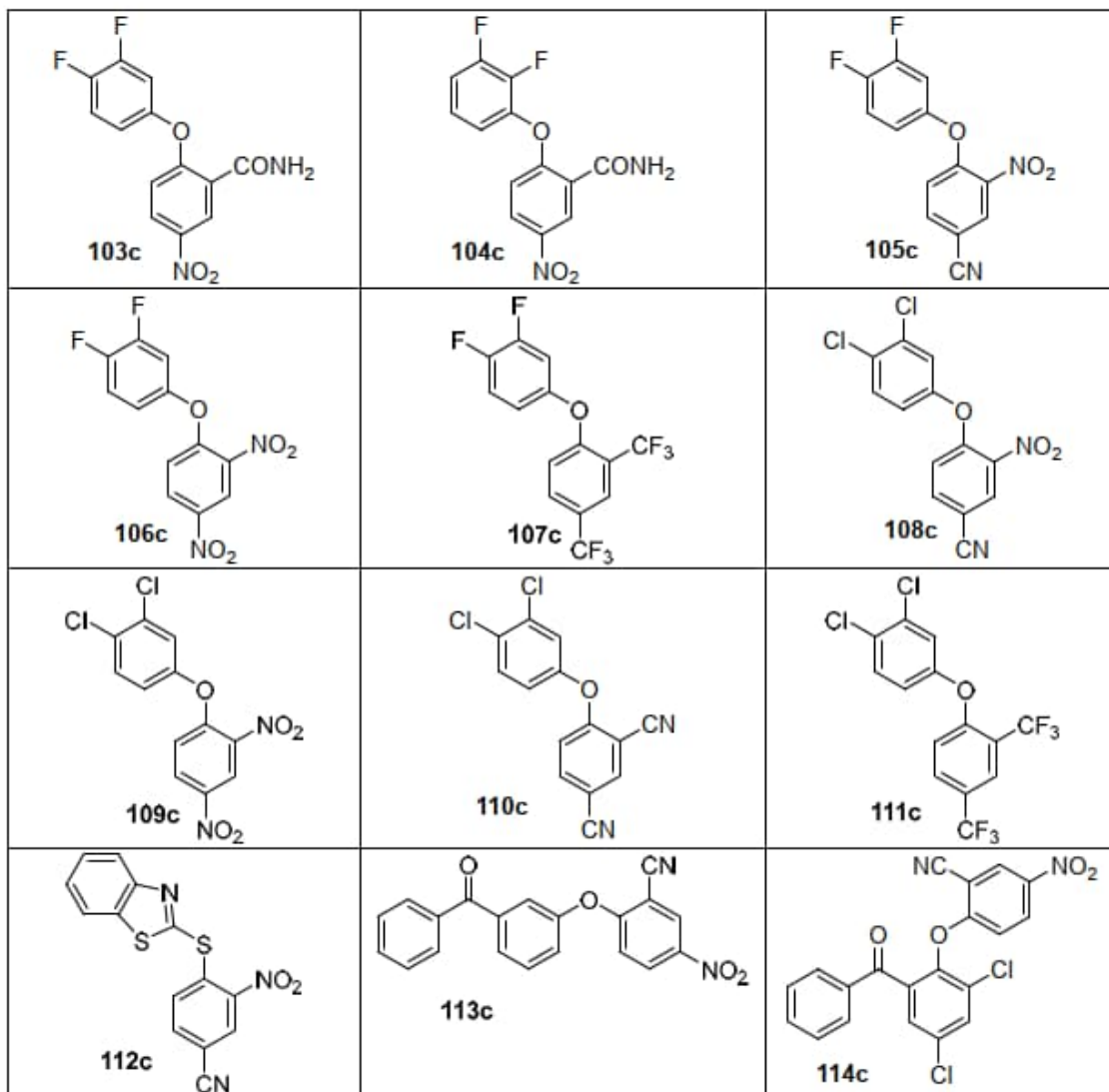
Две съединения в тази серия могат да бъдат очертани като забележително активни (Таблица 20) – 74с срещу HCoV-OC43 и 75с срещу HAdV-5 (SI 97.4 и 99.7, съответно). Амид 102с и бензофенона 113с са умерено активни спрямо HCoV-OC43 (SI 57 и 48.7, съответно). Както в предишните ни проучвания (*Dobrikov, G. et al.*, 2017), съединенията демонстрират силна селективност към различни вируси и не се наблюдава широкоспектърна активност. Интересно е да се отбележи, че MDL-860 е неактивен спрямо HAdV-5, и HCoV-OC43 и обратно – всички синтезирани съединения в това проучване (*Nikolova, I. et al.*, 2022) не са активни срещу PV1, CVB1 и CVB3. Не може със сигурност да се твърди, че механизма на действие срещу коронавируса е аналогичен на вече познатия механизъм на ковалентна модификация на ензима Phosphatidylinositol 4-Kinase III Beta, тъй като това предстои да бъде изяснено в бъдещи изследвания. Специално при аденовирусите (които са ДНК вируси) е още по-вероятно съединенията да действат по друг механизъм.

Решихме да изследваме ефекта на двойни комбинации от диарил етери и/или техни комплекси с циклодекстрини, с инхибитори на ентеровирусната репликация с различен механизъм на действие. Комбинираният антивирусен ефект е определен съгласно изискванията на триизмерния модел на *Prichard и Shipman* при постоянна вирусна доза от 100 CCID₅₀ (виж Методи) и има предимството не само да характеризира типа на взаимодействието (синергично, адитивно или антагонистично), но и да определя конкретните съотношения от концентрации, при които се наблюдават съответните ефекти. В двойни комбинации с познати инхибитори на ентеровирусната репликация, като плеконарил, оксоглауцин и гуанидин хидрохлорид са подбрани най-активните срещу коксакивирус В1 диарил етери – 39в, 41в, 1а, 12а и 11а. Концентрациите на веществата в изпитваните комбинации са определени на базата на индивидуалните ефекти на всяко от съединенията-партньори в комбинацията - 2IC₅₀, IC₅₀, IC₅₀/2, IC₅₀/4 и IC₅₀/8.

Характерът на комбинирания антивирусен ефект на 12а с плеконарил, с оксоглауцин и с гуанидин хидрохлорид определен *in vitro* в HEp-2 клетъчни култури е представен съответно в Таблица 21 и Фигури 32, 33 и 34.

 73c	 74c	 75c
 76c	 77c	 78c
 79c	 80c	 81c
 82c	 83c	 84c
 85c	 86c	 87c

 88c	 89c	 90c
 91c	 92c	 93c
 94c	 95c	 96c
 97c	 98c	 99c
 100c	 101c	 102c



Фигура 31. Структурни формули на новосинтезирани аналози 73c-114c

Комбинацията на плеконарил с **12a** е синергична по отношение на репликацията на коксакивирус В1 (Фиг. 32). Общият обем на наблюдавания синергизъм е $91.67 \mu\text{M}^{20\%}$, което го определя като умерен. Повърхността доза-отговор е адитивна в по-голямата част от изпитаните комбинации от дози. Синергизъм се наблюдава в по-високите концентрации на съединенията. Комбинацията **12a** и оксоглауцин е със силно синергичен характер (Фиг. 33) с обем на наблюдавания синергизъм $142.05 \mu\text{M}^{20\%}$, което се наблюдава и при по-ниските концентрации на веществата. Повърхността доза-отговор е синергична в целия диапазон от изпитани дози. Комбинирането на **12a** с гуанидин хидрохлорид показва адитивен характер (Фиг. 34).

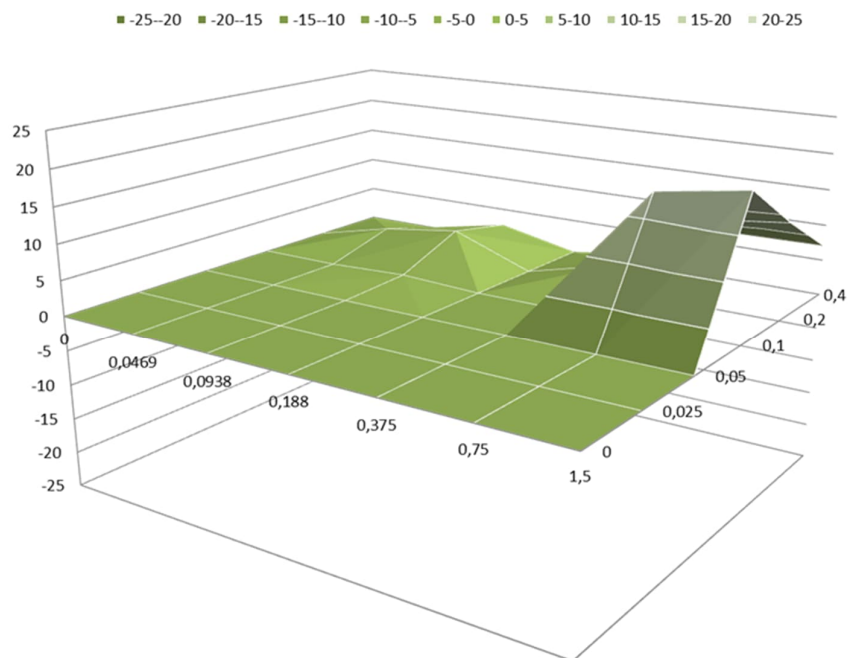
Таблица 20. *In vitro* скрининг за антивирусна активност на синтезирани аналози 73c-114c.

Comp.	HEp-2	PV1		CVB1		CVB3		HAdV-5		HCT-8	HCoV-OC43	
	CC ₅₀ ^[b]	IC ₅₀ ^[b]	SI	IC ₅₀ ^[b]	SI	IC ₅₀ ^[b]	SI	IC ₅₀ ^[b]	SI	CC ₅₀	IC ₅₀ ^[b]	SI
M ^[c]	493±27	6.8±2.0	72.5	0.8±0.02	616.3	2.7±0.1	182.6	NA	-	174±11	69±3.3	2.5
73c	658±30	NA	-	NA	-	NA	-	123±4.3	5.3	416±34	NA	-
74c	402±31	NA	-	NA	-	60±2.0	6.7	17.9±1.0	22.5	341±25	3.5±0.01	97.4
75c	698±25	NA	-	NA	-	129±4.0	5.4	7.0±0.2	99.7	253±23	NA	-
76c	187±5.9	NA	-	NA	-	NA	-	70±2.1	2.7	579±50	300±22	1.9
77c	196±10	NA	-	NA	-	NA	-	22±1.3	8.9	570±55	NA	-
78c	750±32	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	320±26	NA	-
79c	443±29	NA	-	78±3.0	5.7	NA	-	33.9±2.1	13.1	262±22	90±4.7	2.9
80c	667±34	NA	-	NA	-	431±21	1.5	77±3.1	8.7	333±24	39±2.7	8.5
81c	420±12	NA	-	107±8.0	3.9	NA	-	87±2.3	4.8	381±30	NA	-
82c	460±26	NA	-	NA	-	NA	-	20.7±1.2	22.2	363±30	NA	-
83c	160±8.2	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	3.1±0.1	NA	-
84c	170±10	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	80±4.6	NA	-
85c	231±11	NA	-	33.2±2.0	7.0	NA	-	NA	-	438±34	NA	-
86c	200±15	NA	-	NA	-	NA	-	73.5±3.4	2.7	135±11	42±33	3.2
87c	214±15	NA	-	NA	-	25±1.3	8.6	100±8.2	2.1	82±5.4	NA	-
88c	405±21	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	160±10	11±0.9	14.5
89c	581±32	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	570±45	100±8.9	5.7
90c	624±34	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	654±56	NA	-
91c	724±41	NA	-	NA	-	267±18	2.7	67±3.1	10.8	495±40	NA	-
92c	210±11	NA	-	NA	-	100±6	2.1	NA	-	196±10	7.5±0.6	26.1
93c	17.0±0.5	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	196±12	NA	-
94c	520±29	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	561±45	60±4.2	9.4
95c	302±16	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	447±40	122±10	3.7
96c	183±9.4	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	356±30	NA	-
97c	287±13	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	192±12	NA	-
98c	581±23	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	698±57	NA	-
99c	597±31	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	597±46	NA	-
100c	589±27	NA	-	NA	-	NA	-	102±7.2	5.8	256±20	NA	-
101c	404±30	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	597±50	86±7.9	6.9
102c	581±34	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	627±58	11±1.0	57.0
103c	505±35	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	623±58	NA	-
104c	637±38	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	723±66	NA	-
105c	476±28	NA	-	NA	-	63±2.0	7.6	180±5.9	2.6	161±14	NA	-
106c	9.1±0.8	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	205±18	51±2.9	4.0
107c	205±11	NA	-	NA	-	205±12	-	NA	-	170±11	170±9	-
108c	200±14	NA	-	NA	-	25±1.0	8.0	18.0±0.9	11.1	152 12	NA	-
109c	58±2.0	NA	-	NA	-	34±1.2	1.7	32±2.1	1.8	654±60	170±10	3.8
110c	245±10	NA	-	NA	-	NA	-	81±4.5	3.0	192±11	77±6.0	2.5
111c	74±3.0	NA	-	NA	-	NA	-	61±3.2	1.2	209±18	73±4.6	2.9
112c	27±1.0	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	47±2.7	NA	-
113c	530±14	NA	-	NA	-	100±4	5.3	NA	-	151±9	3.1±0.2	48.7
114c	105±3.1	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	64±2	NA	-

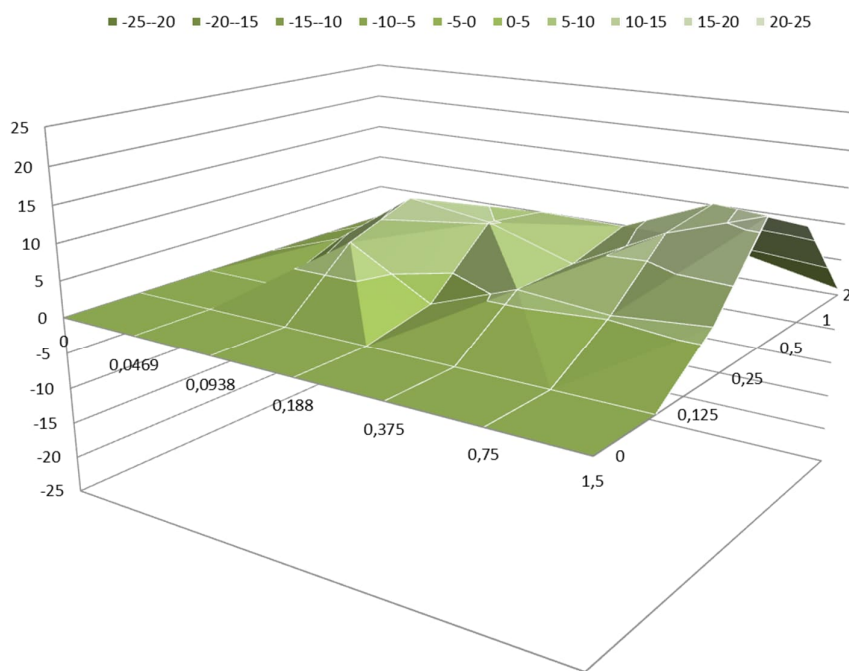
^[a] NA – not active; CC₅₀ – *in vitro* cytotoxicity (in μ M); IC₅₀ – *in vitro* antiviral activity in cell culture experiments (in μ M); SI – selectivity index, calculated as a ratio between CC₅₀ and IC₅₀; ^[b] CC₅₀ and IC₅₀ values represent the mean $\pm$ SD of three independent experiments; ^c M – MDL-860

Таблица 21. Комбиниран ефект на 12a с познати ентеровирусни инхибитори върху репликацията на коксаки В1 вирус.

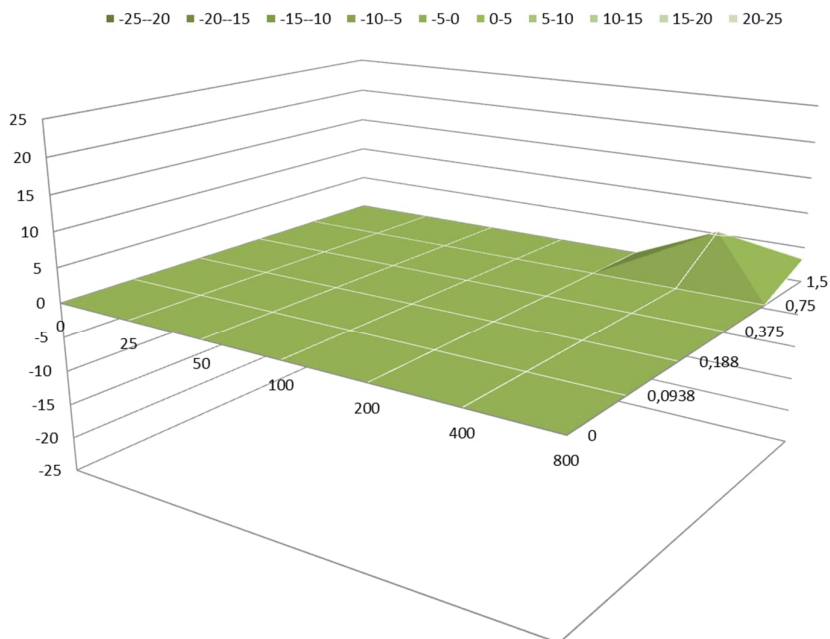
Партньор 1	Партньор 2	SYNERGY PLOT (95%) Bonferroni Adj.	
		Synergy	Antagonism
12a	Pleconaril	91.67 $\mu\text{M}^2\%$	0.0 $\mu\text{M}^2\%$
	Oxoglaucine	142.05 $\mu\text{M}^2\%$	0.0 $\mu\text{M}^2\%$
	Guanidine.HCl	8.59 $\mu\text{M}^2\%$	0.0 $\mu\text{M}^2\%$



Фигура 32. Съединение 12a и плеконарил.



Фигура 33. Съединение 12a и оксоглауцин.

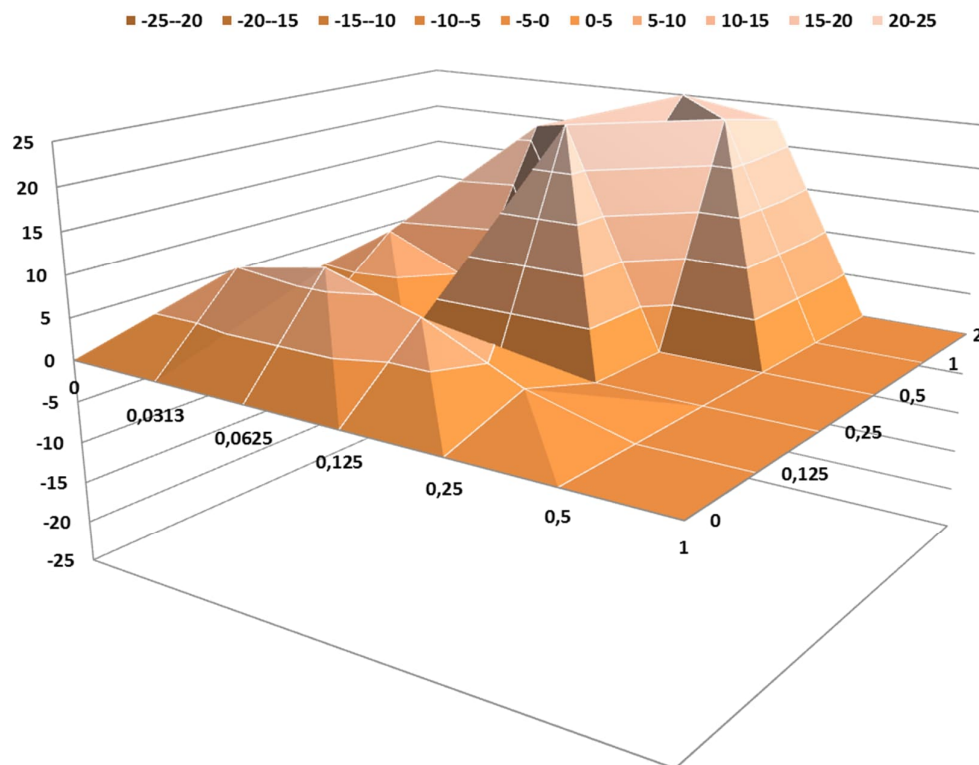


Фигура 34. Съединение 12a и гуанидин хидрохлорид

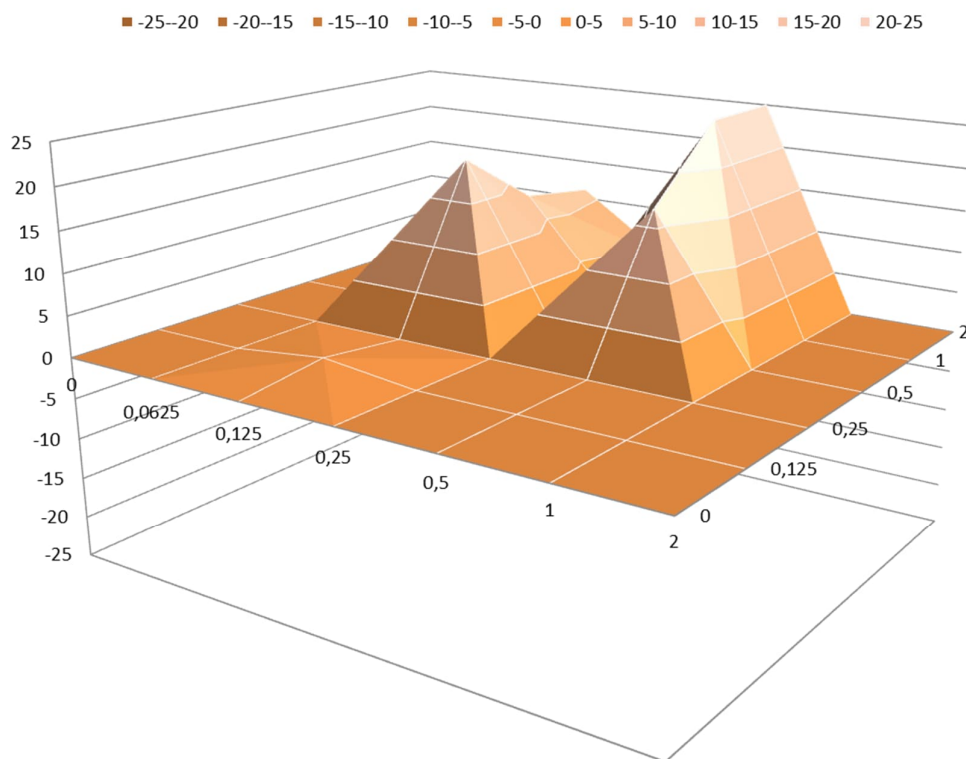
Характерът на комбинациите в които, като партньор участва диарил етера **1a** са представени в Таблица 22 и Фигури 35, 36 и 37. Общият обем на наблюдавания синергизъм на комбинацията на **1a** с плеконарил достига стойност 257.5 $\mu\text{M}^{2\%}$ (Фиг. 35), което е белег за силно изразено синергично действие на тези два инхибитора върху репликацията на коксакивирус В1. Повърхността доза-отговор обхващаща по-голямата част от изпитваните дози е синергична. Това е и комбинацията показала най-висок синергизъм от всички изпитани срещу CVB1. Добре изразен синергичен ефект се наблюдава и при комбинирането на **1a** с оксоглауцин (Фиг. 36). Обема на синергизъм достигна 127 $\mu\text{M}^{2\%}$, като по-голямата част от синергизма е съсредоточен в по-високите концентрации на веществата. Комбинацията на **1a** с гуанидин хидрохлорид има макар и слаб, статистически достоверен синергичен характер (33 $\mu\text{M}^{2\%}$) (Фиг. 37).

Таблица 22. Комбиниран ефект на **1a** с познати ентеровирусни инхибитори върху репликацията на коксаки В1 вирус.

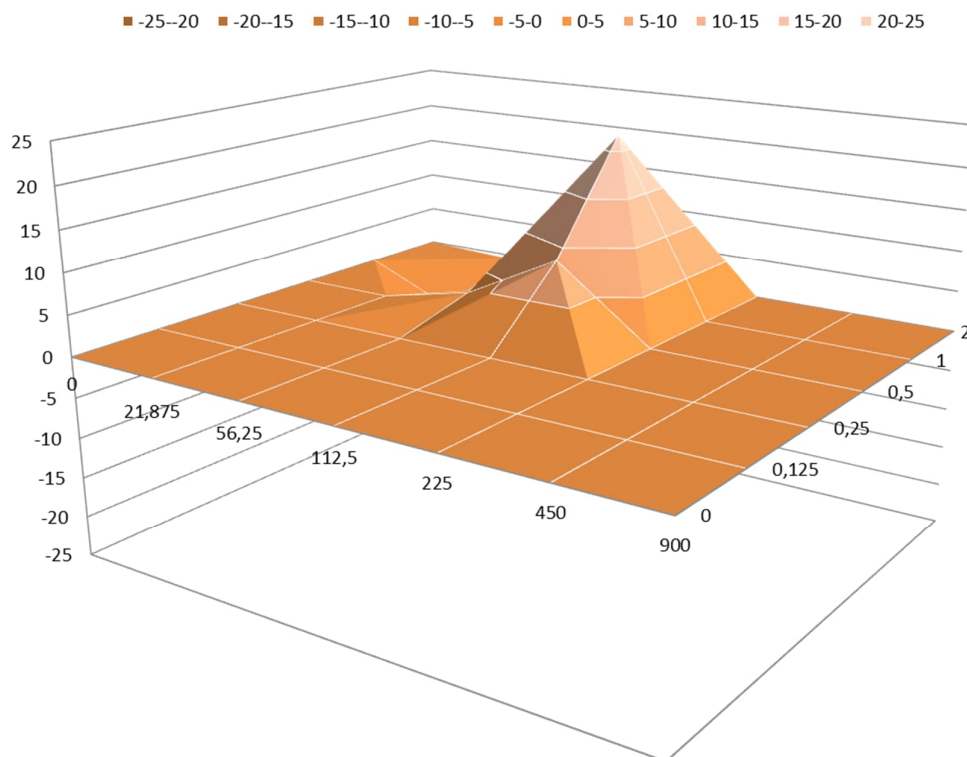
Партньор 1	Партньор 2	SYNERGY PLOT (95%) Bonferroni Adj.	
		Synergy	Antagonism
1a	Pleconaril	257.47 $\mu\text{M}^{2\%}$	0.0 $\mu\text{M}^{2\%}$
	Oxoglaucine	126.98 $\mu\text{M}^{2\%}$	0.0 $\mu\text{M}^{2\%}$
	Guanidine.HCl	33.05 $\mu\text{M}^{2\%}$	-5.4 $\mu\text{M}^{2\%}$



Фигура 35. Съединение 1a и плеконарил.



Фигура 36. Съединение 1a и оксоглауцин.

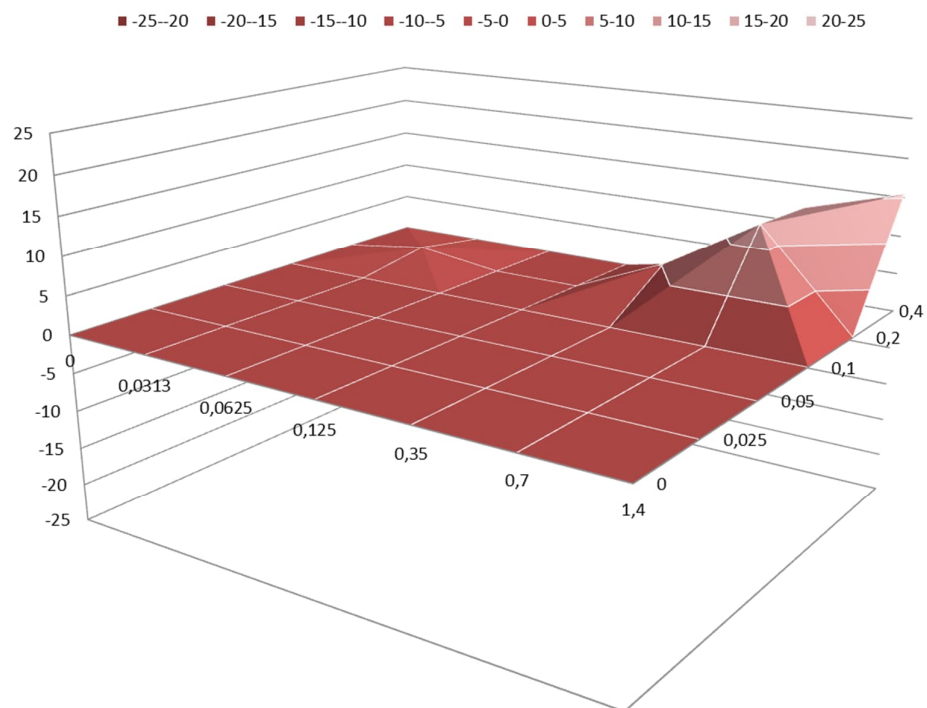


Фигура 37. Съединение 1a и гуанидин хидрохлорид

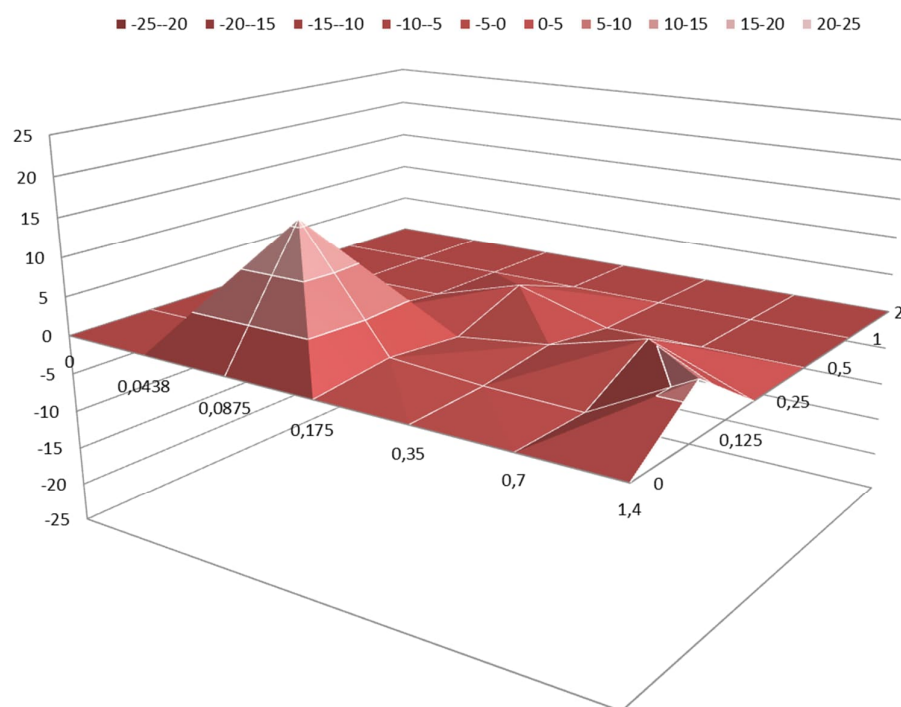
На Таблица 23 и Фигури 38, 39 и 40 са представени комбинациите на 11a с плеконарил, оксоглауцин и гуанидин хидрохлорид. Съчетаването на 11a с плеконарил и оксоглауцин показва слаб, статистически значим синергизъм срещу коксаксивирус В1 (Фиг. 38 и 39). Повърхността доза-отговор е адитивна в по-голямата част от изпитаните комбинации от дози. Комбинирането на 11a с гуанидин хидрохлорид има адитивен характер (Фиг. 40).

Таблица 23. Комбиниран ефект на 11a с познати ентеровирусни инхибитори върху репликацията на коксаки В1 вирус.

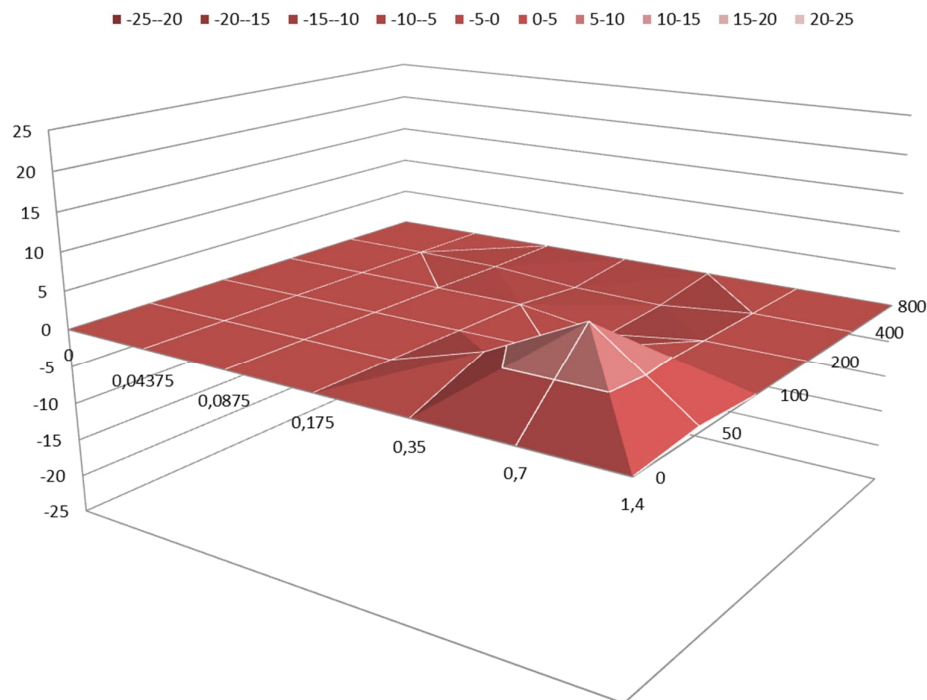
Партньор 1	Партньор 2	SYNERGY PLOT (95%) Bonferroni Adj.	
		Synergy	Antagonism
11a	Pleconaril	46.50 $\mu\text{M}^{2\%}$	0.0 $\mu\text{M}^{2\%}$
	Oxoglaucine	38.01 $\mu\text{M}^{2\%}$	0.0 $\mu\text{M}^{2\%}$
	Guanidine.HCl	14.04 $\mu\text{M}^{2\%}$	-3.9 $\mu\text{M}^{2\%}$



Фигура 38. Съединение 11a и плеконарил.



Фигура 39. Съединение 11a и оксоглауцин.

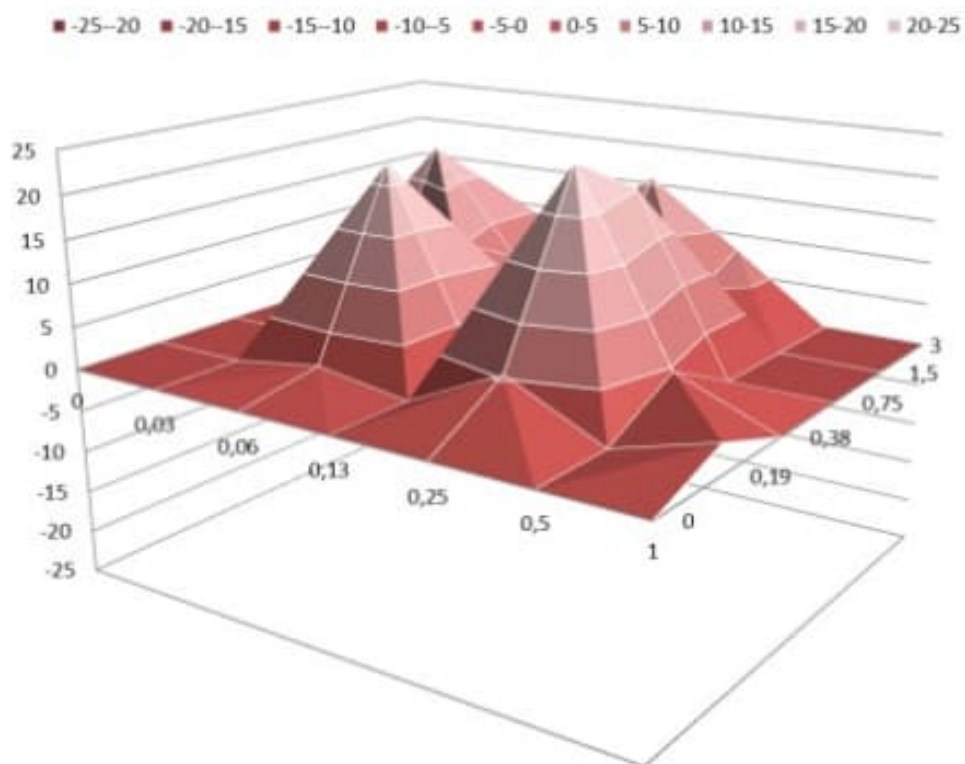


Фигура 40. Съединение 11a и гуанидин хидрохлорид

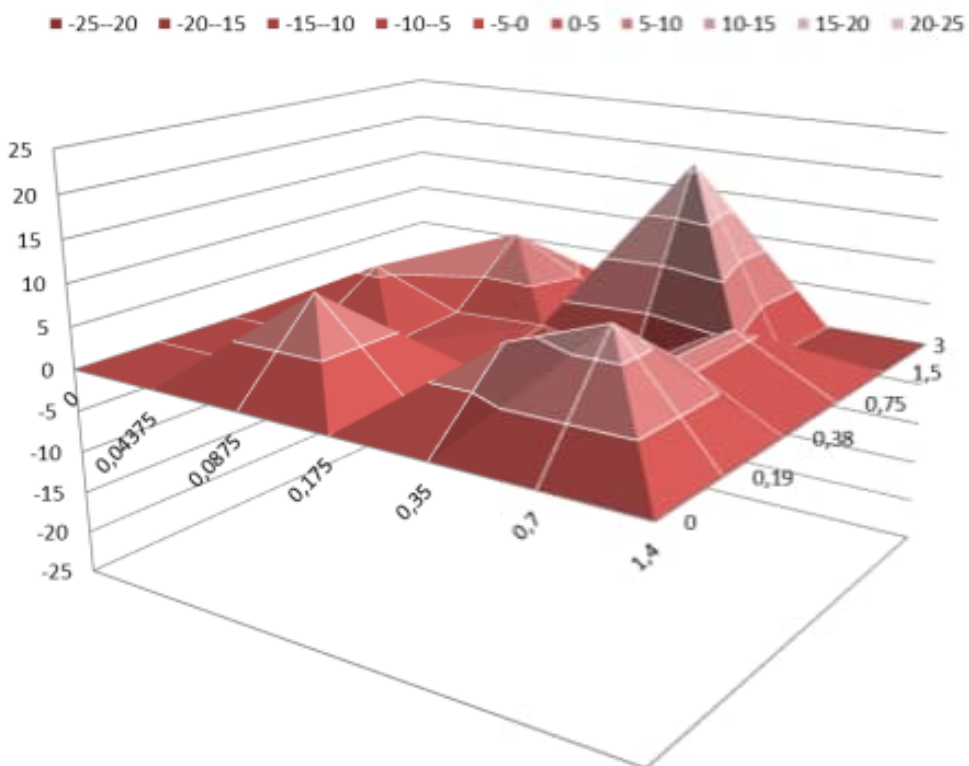
От получените за 39в резултати (Таблица 24) се вижда, че комбинацията с плеконарил показва силно изразен синергичен характер срещу репликацията на коксаки В1 вирус с общ обем на синергизъм 161.5 $\mu\text{M}^{2\%}$ (Фиг. 41). Синергизъм демонстрират всички изпитвани дози с изключение на най-ниските. Комбинацията 39в и оксоглауцин демонстрира умерен синергичен ефект (Фиг. 42), докато 39в и гуанидин хидрохлорид има адитивен характер (Фиг. 43).

Таблица 24. Комбиниран ефект на 39в с познати ентеровирусни инхибитори върху репликацията на коксаки В1 вирус.

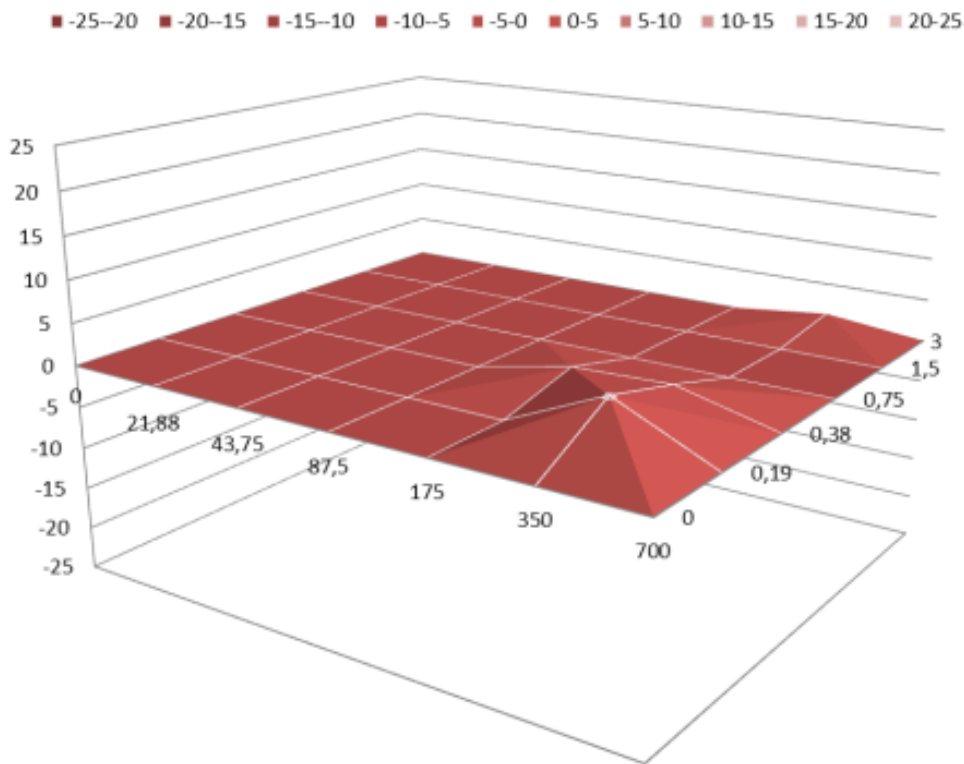
Партньор 1	Партньор 2	SYNERGY PLOT (95%) Bonferroni Adj.	
		Synergy	Antagonism
39в	Pleconaril	161.5 $\mu\text{M}^{2\%}$	0.0 $\mu\text{M}^{2\%}$
	Oxoglaucine	89.9 $\mu\text{M}^{2\%}$	0.0 $\mu\text{M}^{2\%}$
	Guanidine.HCl	11.5 $\mu\text{M}^{2\%}$	0.0 $\mu\text{M}^{2\%}$



Фигура 41. Съединение 39в и плеконарил.



Фигура 42. Съединение 39в и оксоглауцин.

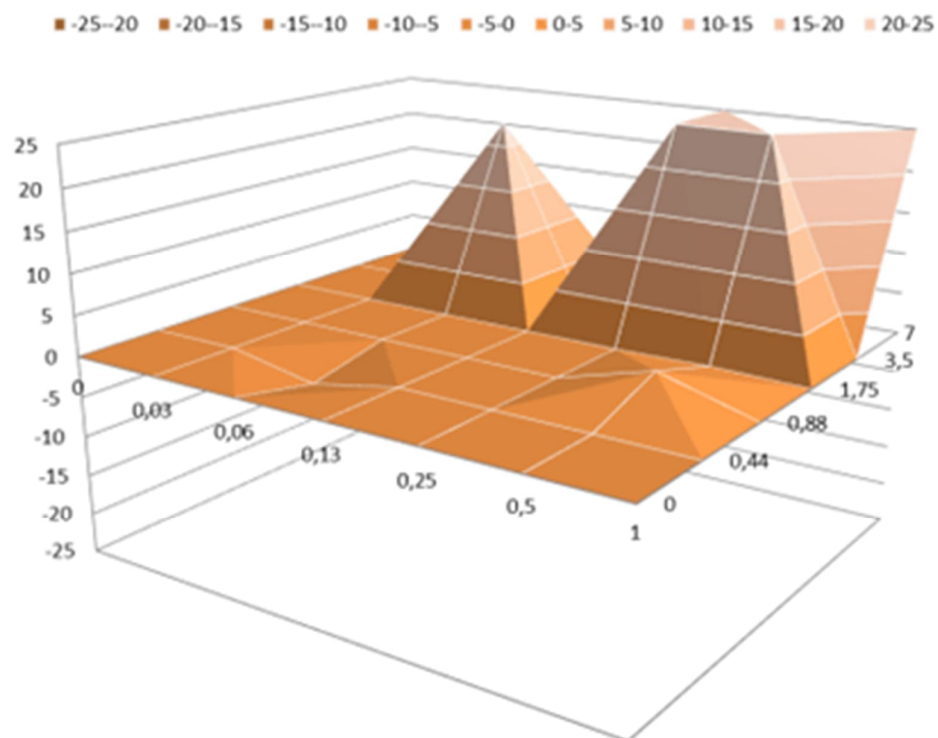


Фигура 43. Съединение 39в и гуанидин хидрохлорид

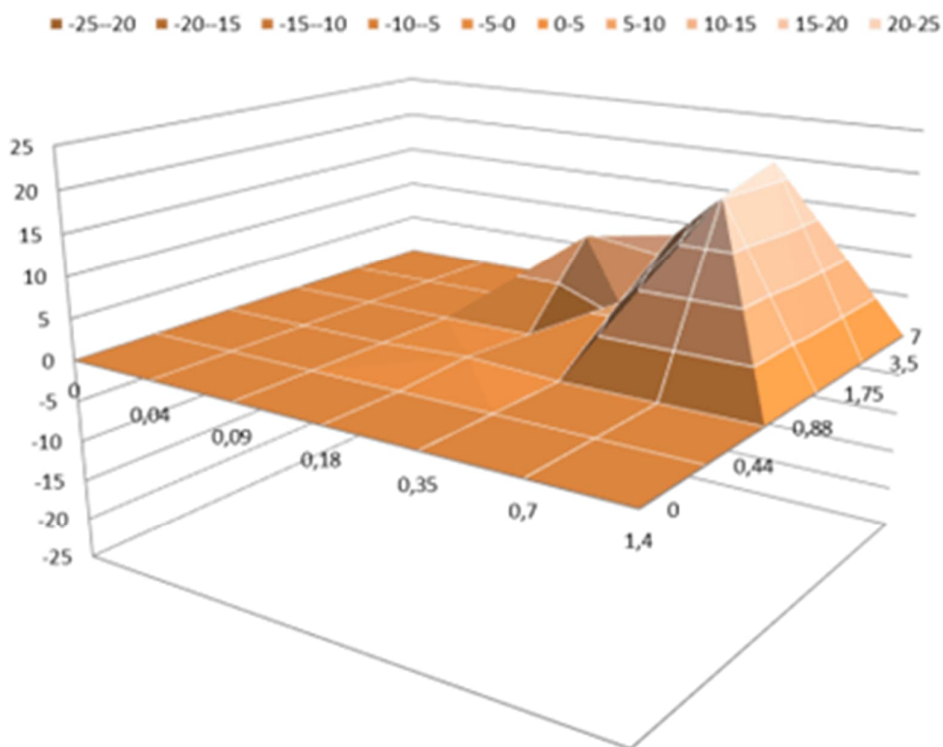
Антивирусният ефект на изследваните двойни комбинации на 41в с плеконарил, оксоглауцин и гуанидин са представени в Таблица 25. Тук 41в комбиниран с плеконарил демонстрира силен синергичен ефект достигащ до 175 $\mu\text{M}^{20\%}$ (Фиг. 44). Най-силно синергично действие имат високите концентрации на 41в (2IC_{50} , IC_{50}), докато при плеконарил е в почти целия интервал от дози. Комбинацията на 41в с оксоглауцин показва умерен синергичен характер при прилагане на съединенията-партньори в по-високите им концентрации (Фиг. 45). Комбинацията включваща гуанидин хидрохлорид е с адитивен характер, като се отчитат статистически недостоверни отклонения към синергизъм ($16.6 \mu\text{M}^{20\%}$) и антагонизъм ($-2.2 \mu\text{M}^{20\%}$) (Фиг. 46).

Таблица 25. Комбиниран ефект на 41в с познати ентеровирусни инхибитори върху репликацията на коксаки В1 вирус.

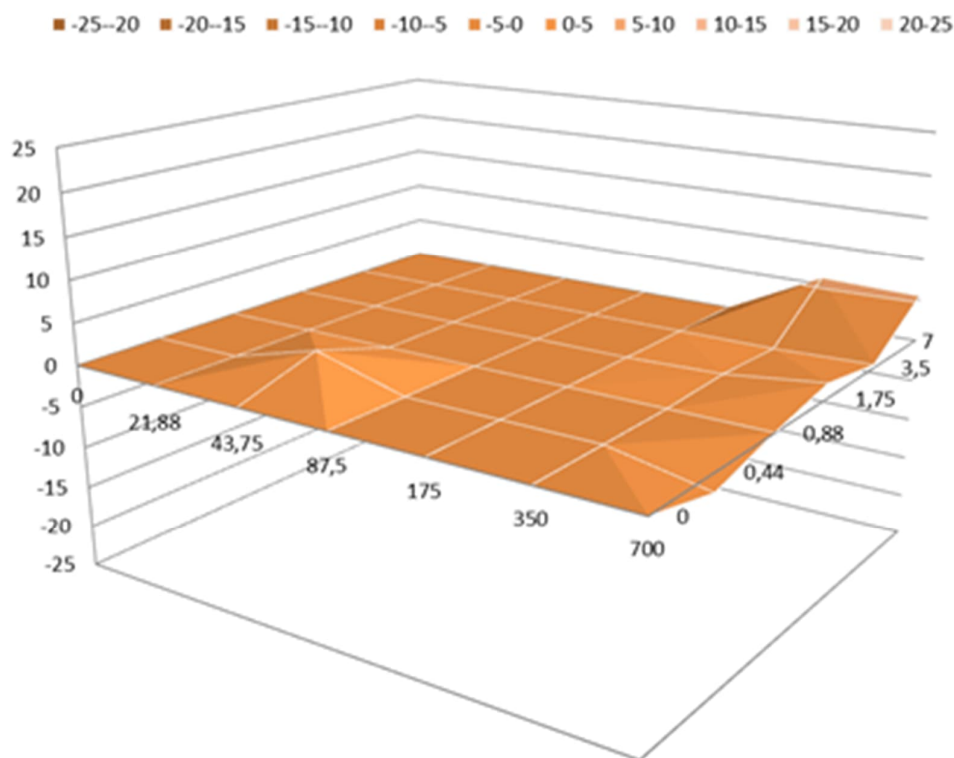
Партньор 1	Партньор 2	SYNERGY PLOT (95%) Bonferroni Adj.	
		Synergy	Antagonism
41в	Pleconaril	175.4 $\mu\text{M}^{20\%}$	-2.1 $\mu\text{M}^{20\%}$
	Oxoglaucine	70.5 $\mu\text{M}^{20\%}$	0.0 $\mu\text{M}^{20\%}$
	Guanidine.HCl	16.6 $\mu\text{M}^{20\%}$	-2.2 $\mu\text{M}^{20\%}$



Фигура 44. Съединение 41в и плеконарил.



Фигура 45. Съединение 41в и оксоглауцин.



Фигура 46. Съединение 41b и гуанидин хидрохлорид

Липсата на повишена цитотоксичност на дадена комбинация е задължително условие на комбинираната химиотерапия. С цел по-прецизното определяне на характера на комбинирания ефект са проведени опити за установяване наличие или липса на повишена цитотоксичност на избраните комбинации от дози на инхибиторите. Експерименталните данни за цитотоксичността също са обработени съгласно изискванията на триизмерния модел на *Prichard и Shipman*. Изпитаните двойни комбинации, включващи от една страна диарил етерите 39b, 41b, 1a, 12a, 11a и от друга страна партниращите им в комбинациите плеконарил, оксоглауцин и гуанидин хидрохлорид не показаха повишена цитотоксичност в незаразени HEP-2 монослойни клетъчни култури.

Във връзка с предизвикателствата, които ни постави COVID-19 пандемията, нашата лаборатория се включи в тестването за анти-коронавирусна активност и на друг клас съединения - новосинтезирани хетероциклични производни срещу два човешки коронавируса (OC43 и 229E). Появата на пандемията от COVID-19 подчерта необходимостта от бързо разработване на ефективни антивирусни агенти. Липсата на утвърдени специфични терапии срещу коронавируси наложи търсенето на нови молекули с антивирусна активност, които да бъдат алтернатива или допълнение към съществуващите лекарства. В този контекст нашата изследователска група се включи в изследването на нови хетероциклични съединения, които бяха синтезирани от химици от Факултета по химия и фармация към СУ „Св. Климент Охридски“ (доц. д-р Къндинска и екип), използвайки натрупания опит в областта на медицинската

химия и хетероцикличния синтез. Целта беше да се открият нови потенциални антикоронавирусни агенти с добра ефективност и ниска токсичност, които биха могли да допринесат за овладяване на вирусните инфекции както по време на настоящата пандемия, така и при евентуални бъдещи коронавирусни епидемии.

Хинолиновият скелет е сред най-широко използваните фармакофори в съвременния лекарствен дизайн, благодарение на изключителното структурно разнообразие и множеството биологични активности, демонстрирани от различни хинолин-базирани терапевтични средства и лекарствени кандидати. В рамките на настоящото изследване беше разработена екологично щадяща и лесно приложима двуетапна синтетична процедура за получаване на нови аналози на хлорохин и хидроксихлорохин (Vasilev, A. *et al.*, 2022). Структурите на синтезираните съединения бяха охарактеризирани чрез спектрални методи като ^1H ЯМР, ^{13}C ЯМР, LC-MS и FTIR спектроскопия. Предложеният синтетичен подход позволява получаването на междинни продукти и крайни съединения с високи добиви и удовлетворителна аналитична чистота, без необходимост от допълнително пречистване.

Антивирусната активност на получените хинолинови деривати беше изследвана в условията на COVID-19 пандемията в рамките на нашата лаборатория „Експериментална химиотерапия на ентеровирусните инфекции“. Проведените предварителни тестове показаха, че съединение 6,7-dimethoxy-4-(4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1-ium-1-yl)-1-methylquinolin-1-ium iodide (Vasilev, A. *et al.*, 2022) проявява ниска цитотоксичност спрямо НСТ-8 клетки и ефективно инхибира репликацията на човешкия коронавирус ОС-43. Тези резултати подчертават потенциала на разработената методология като достъпна и обещаваща стратегия за трансформация на 4-хлорохинолинови производни в нови съединения с изразена антивирусна активност.

Паралелно с хинолиновите производни, в хода на изследването бе тествана за антивурсна активност серия от новосинтезирани 1-оксо-2,3,4-трисубституирани тетрахидроизохинолинови (ТНIQ) производни, съдържащи различни хетероциклични фрагменти в структурата си (Kandinska, M. *et al.*, 2023). Тези съединения бяха получени чрез реакция между хомофталиков анхидрид и съответни имини. Биологичната им активност беше изследвана в нашата лаборатория, като част от усилията по време на пандемията за идентифициране на нови потенциални антикоронавирусни агенти. Първоначалните тестове разкриха, че някои от тези ТНIQ-производни демонстрират значима инхибиторна активност срещу два щам на човешкия коронавирус – 229Е и ОС-43. За по-изчерпателен анализ активността на тези съединения беше сравнена с близки аналози, включително пиперидинови и тиоморфолинови производни, синтезирани по-рано от екипа химици.

Освен това, в рамките на настоящото изследване бяха синтезирани нови 1-оксо-1,2,3,4-тетрахидроизохинолинови производни, съдържащи амидна или амидометилова функция в 4-та позиция на изохинолиновото ядро, чрез два различни

синтетични подхода (Kandinska, M. et al., 2023). Избрани представители от тази серия, заедно с предварително синтезираните аналози, бяха включени в сравнителен анализ на тяхната антивирусна ефективност срещу щамове 229Е и ОС-43. Получените резултати показваха, че някои от хетероцикличните съединения проявяват значителна антивирусна активност, като въздействат върху специфични етапи от вътреклетъчния репликативен цикъл на коронавируса, включително когато се прилагат след проникването на вируса в клетката гостоприемник. Проведеният QSAR анализ разкри ключовата роля на електростатичните взаимодействия между молекулите и таргетните биомолекули за техния механизъм на действие. Някои от изследваните съединения показваха антивирусна активност, съпоставима или превъзхождаща тази на хлорохин. Особено внимание заслужава водещата структура на базата на THIQ – *trans*-4-((1*H*-imidazol-1-yl)methyl-3-(1*H*-indol-3-yl)methyl)-2-propyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1 (Avir-7) (Kandinska, M. et al., 2023), която представлява добра отправна точка за бъдещи структурни модификации с цел повишаване на антикоронавирусния потенциал.

Проведените синтетични и биологични изследвания в условията на пандемията допринасят съществено към разработването на нови хетероциклични съединения с потенциална антивирусна активност. Разработените синтетични подходи за получаване на хинолинови и тетрахидроизохинолинови производни демонстрират висока ефективност, екологична устойчивост и предоставят продукти с отлични добиви и чистота. Биологичните тестове, извършени в нашата Вирусологична лаборатория, очертават значим потенциал на някои от новите съединения за инхибиране на репликацията на човешки коронавируси при ниска цитотоксичност. В съчетание с QSAR анализа, тези резултати предоставят надеждна основа за рационален дизайн на нови молекули с оптимизирана антивирусна активност и очертават пътя за бъдещи разработки на по-ефективни терапевтични агенти за коронавирални инфекции.

4.6. QSAR моделиране, регресионен анализ, дискриминантен анализ и оптимизационна стратегия

Анализът QSAR се основава на библиотека от 113 химични структури на съединенията, представени в статия, както и на нашите предишни докладвани съединения. Структурите са представени като структурни идентификатори на SMILES. Освен това библиотеката включва биологични данни (където има такива), а именно: (i) CC_{50} – *in vitro* цитотоксичност в HEp2 и HCT-8 клетъчна култура; (ii) IC_{50} – антивирусна активност в експерименти с клетъчни култури срещу петте вируса, а именно PV1, CVB1, CVB3, HadV-5, и HCoV-OC43; (iii) SI – индекс на селективност, изчислен като съотношение между CC_{50} и IC_{50} . Моделите QSAR са разработени чрез прилагане на регресионен и дискриминантен анализ.

Въз основа на наличните структурни и експериментални данни бяха изградени редица локални QSAR модели за всяка от изследваните антивирусни активности. Общото добро съответствие между регресионните и класификационните QSAR модели позволи формулирането на консенсусни заключения, които могат да послужат като добра основа за разработване на стратегия за оптимизация с цел рационален дизайн на водещи съединения в рамките на изследваните структурни класове.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ентеровирусните инфекции могат да причинят различни заболявания, вариращи от леки или асимптоматични инфекции до по-тежки състояния като менингит, енцефалит, полиомиелит, миокардит, остра парализа, неонатален сепсис, панкреатит и др. Ентеровирусните инфекции са особено опасни за пациенти с компрометирана имунна система и новородени. По-сериозните прояви на ентеровирусно заболяване при новородени са миокардит и/или хепатит, които често са придружени от енцефалит. В момента няма одобрено лекарство за лечение на ентеровирусните инфекции, въпреки все по-задълбочените знания относно строежа на пикорнавирусите и етапите в техния репликативен цикъл, което би трябвало да улесни разработването на широкоспектърни ентеровирусни инхибитори, насочени към ключови вирусни компоненти или стъпки в техния размножителен цикъл. За ентеровирусните инфекции е характерно, че често има припокриване на клиничната симптоматика (особено през последните 40 години), което затруднява определянето на серотипа. Причината е явлението рекомбинация, което се среща често между отделните ентеровирусни серотипове. В резултат масово се демонстрира липса на ефикасност в експериментални модели *in vivo* на по-голямата част от активните *in vitro* вещества. По-малко от 20 от стотици инхибитори на ентеровирусната репликация проявяват известна *in vivo* активност. Неуспехът при по-нататъшни клинични изпитвания на избрани най-добри *in vivo* инхибитори на ентеровирусната репликация, се дължи предимно на липсата на селективност, потвърдена от добре изразени неприемливи странични ефекти в човешкото тяло.

Съвкупността от експериментални данни в областта на антивирусните лекарства и натрупаните знания за молекулярната биология на пикорнавирусите/ентеровирусите изрично показват, че друга основна причина за липсата на клинично приложими антивирусни средства е развитието на феномена лекарствена резистентност. Това явление при пикорнавирусите достига необичайно високи нива – при тях произволни генетични мутации могат да възникнат с много висока честота (10^{-3} – 10^{-4}). Генетичната изменчивост и еволюция на ентеровирусите е съществена пречка в анти-ентеровирусната химиотерапия и превенцията на тези инфекции.

По време на дългогодишната работа на нашата лаборатория в областта на ентеровирусната химиотерапия, освен описаните в литературата данни, бе доказано, че монотерапиите с ентеровирусните инхибитори водят до развитието на резистентни мутанти.

Тъй като много често ентеровирусните инфекции протичат безсимптомно или леко, пренебрегването на тяхното лечение може да увеличи риска от развитие на сериозни симптоми по-късно. Това е още един аргумент за нуждата от намирането на ефективна анти-ентеровирусна химиотерапия. Вниманието все по-често се насочва

към фактори на гостоприемника, които играят важна роля и са критични за размножаването на вирусите, тъй като антивириали, таргетиращи клетъчни фактори, биха повлияли на множество серотипове при минимизиране потенциала за вирусна резистентност. Този подход става все по-привлекателна перспектива, който е довел до откриването на няколко обещаващи съединения за лечение на ХИВ и хепатит С. Във връзка с тези резултати, разработването на коктейл от инхибитори, насочени както към вируса, така и към клетъчни фактори, може да се окаже най-успешният начин за борба с ентеровирусните инфекции. Следователно изучаване на механизмите на ентеровирусната репликация са от решаващо значение за откриването на нови терапевтици, насочени към фактори на клетката-гостоприемник. Специфични клетъчни фактори, които се използват от някои пикорнавируси и флавируси са идентифицирани и се изучава тяхната роля и потенциал като терапевтични цели. Такива са репликационните платформи в клетката, които са важни, за да протече успешно вирусната репликация и именно тази специфична микросреда, богата на фосфатидилинозитол-4-фосфат (PI4P), се поддържа от фосфатидилинозитол-4-киназа III α и/или фосфатидилинозитол-4-киназа III β (PI4KIII β). В нашата експериментална работа, в търсене на анти-ентеровирусни съединения, се спряхме на съединението MDL-860 (DNB), което е важна отправна точка за разработването на ефективна анти-ентеровирусна химиотерапия, поради своя специфичен механизъм на анти-ентеровирусно действие. Едно от най-перспективните постижения на нашия екип, бе въвеждането на нова схема за комбинирано последователно прилагане (CAA) на анти-ентеровирусни вещества при коксакивирус В1 невроинфекция в новородени мишки. При този подход ентеровирусните инхибитори (с различен механизъм на действие) се прилагат последователно, а не едновременно (CAA курс) В тройната комбинация плеконарил/гуанидин-HCl/оксоглауцин (PGO), гуанидин-HCl, който не показва *in vivo* ефект при монотерапевтичен курс, бе заменен със съединението MDL-860. Това съединение, синтезирано първоначално от L. Markley, се отличава с широкия си анти-EV обхват и с неговите *in vivo* ефекти върху кардиотропната CVB3 инфекция при възрастни мишки. Мишена на действие на съединението е клетъчният фактор фосфатидилинозитол-4-киназа III β . За да бъде определена работната доза на MDL-860, бяха проведени монотерапевтичните курсове с веществото в дневни дози 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg и 100 mg/kg. Установено бе, че нито една от изпитаните дози на веществото няма самостоятелен антивирусен ефект, но бе отчетено 2-дневно увеличение на MST, при дневна доза от 75 mg/kg при невротропна инфекция с коксакивирус В1 в новородени мишки. С увеличаване на дозата се наблюдаваше слабо увеличение в MST на животните, като повишената концентрацията на веществото влошаваше неговата разтворимост и токсичността му нарастваше. Комбинацията РМО, прилагана по CAA схема също бе тествана с няколко различни концентрации на MDL-860, като най-ефективна се оказа 75 mg/kg. От проведените *in vivo*

експерименти в мишки, заразени с коксакивирус В1 бе установено, че тази комбинация демонстрира забележително висок анти-ентеровирусен ефект, който се изразява в защита на 50% от инфектираните животни с инокулационна доза (20 LD₅₀), като клиничната картина при тази инфекция в новородени мишки се изразява в бързоразвиващ се енцефалит и парализа и изходът е летален. Освен това прилагането на тройната комбинация (по САА) предотвратява развитието на лекарствена резистентност, дори се наблюдава увеличаване на чувствителността на вирусните изолати от мозъка на третираните мишки към съединенията в комбинацията. След 7-ия ден след инокулацията мозъчните проби на групата, третирана с РМО чрез САА са имали титър на вируса 4-5 logs по-нисък от този на групата с монотерапия с плеконарил 25 mg/kg. Едновременното, ежедневно прилагане на трите вещества-партньори в комбинацията РМО, води до понижена чувствителност и развитие на лекарствена резистентност към плеконарил. Вирусните изолати от мозъците на мишки, третирани с комбинацията РМ₇₅О по САА схема, проявяват липса на лекарствена резистентност към плеконарил в рамките на дни 4 до 10, последвано от известно повишаване на чувствителността към плеконарил, проявяващо се на 11-ия до 13-ия ден.

Подобно на плеконарила, бе отчетено повишаване на чувствителността към MDL-860 (IC₅₀) по време на САА курс с РМО около 8.2 пъти спрямо плацебо на ден 7 и 28.9 пъти спрямо монотерапия с MDL-860. Чувствителността към оксоглауцин при курс на РМО (по САА) се повишава шест пъти на ден 13 в сравнение с ден 4 (6.8 пъти спрямо монотерапия с оксоглауцин и 4.8 пъти спрямо плацебо групата). Възпрепятстването на развитие на резистентни мутанти при етеровирусите е необичаен феномен и е водеща характеристика на тази схема на третиране на животните.

Проведохме молекулярно-генетични изследвания на вирусните изолати от различните групи животни, заразени с CVB1 и бяха определени генотипните характеристики на вирусното потомство чрез секвенционен анализ на вирусните РНК. При вируса, изолиран от монотерапевтичния курс с плеконарил (от 13-и ден след вирусната инокулация) бе намерено нуклеотидно заместване в първата бримка (108 позиция) на IRES в 5'-UTR и аминокиселинни замени в региони 2A (His→Arg) и 2C (Leu→Pro). Втората аминокиселинна замяна бе открита в протеин, който индуцира и е свързан с реаранжиране на вътреклетъчните мембрани. Секвенционният анализ на вируса, изолиран от РМО групата, прилагана по САА схема (13-ти ден след вирусната инокулация), показва промени, които може би са свързани с повишената чувствителност към съответните вирусни инхибитори, а именно: нуклеотидно заместване в 6-та бримка (615 позиция) на IRES в 5'-UTR; аминокиселинна замяна на пролин в серин в 2A региона (Pro→Ser) и липса на мутации (с AA замени) във VP3, 2A и 2C, намерени в пробите от монотерапевтичните курсове.

Би могло да се предположи, че тези мутации имат отношение към появата на лекарствена резистентност при монотерапиите с плеконарид, MDL-860 и оксоглауцин и са отговорни за по-високата чувствителност на вируса към тези съединения при третиране по САА схема. Тъй като ентеровирусната популация е доста хетерогенна, е възможно псевдовидове или единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs), които не се откриват в данните от геномното секвениране да играят роля в наблюдаваните феномени. Мутации в тези нуклеотидни последователности биха могли да променят нивата на резистентност и чувствителност в зависимост от използваните съединения и начина им на прилагане.

Следващ етап от нашата работа бе съвместно с химици от Института по органична химия-БАН (доц. Добриков, дхн и екип) да проведем *in vitro* антивирусен скрининг на серии новосинтезирани диарил етери и техни аналози, разнообразни по своята структура, които имат като постоянен елемент ароматно ядро, съдържащо CN и NO₂ групи с цел да разберем доколко тези промени влияят на антивирусната активност. Синтезирани са няколко серии от нови аналози на съединението MDL-860 (114 съединения). Всички те са тествани спрямо три ентеровируса: полиовирус 1, коксакивирус В1 и коксакивирус В3. Някои съединения са оценени спрямо човешки корона вирус OC43, и човешки аденовирус С серотип 5. В първата серия бяха тествани за *in vitro* антивирусна новосинтезирани аналози на MDL-860, които притежават 2-циано-4-нитрофенилов остатък, свързан с различни ароматни или алифатни групи чрез O, N и S атоми. Във втората серия бяха синтезирани нови аналози на MDL-860, притежаващи непроменен 2-циано-5-нитро заместен бензенов пръстен като общ фрагмент, с различни възможни промени във втория пръстен на MDL-860, водещи до подобрена антивирусна активност. Така бяха синтезирани четири серии аналози на MDL-860 - феноли, тиоли, амини и N-хетероцикли и оценени за антивирусна активност. В последната група са получени няколко малки серии от съединения, съдържащи два ароматни фрагмента, свързани с хетероатом. Първата серия се основава на продължаването на синтеза на нови диарилови етери, притежаващи класическата позиция на нитро- и циано- групите в едно ароматно ядро, както в MDL-860. Другата серия се основава на дихало- заместители в другото ароматно ядро, и и наличие на две електрон-акцепторни групи в позиции 2 и 4 в първото ядро. Всичките 42 синтезирани съединения бяха тествани *in vitro* срещу пет вируса, а именно PV1, CVB1, CVB3, човешки аденовирус С серотип 5 (HAdV-5) и човешки коронавируς OC43 (HCoV-OC43). От *in vitro* скрининга на всичките 114 новосинтезирани съединения повече от 10 съединения могат да бъдат очертани като много активни (индекси на селективност над 97). Над 80% от съединенията са с много ниска цитотоксичност, което е изключително благоприятно при евентуално бъдещо приложение на представители от този клас съединения като антивирусни агенти. Повечето активни съединения са избрани за *in vivo* експерименти, като резултатите са обнадеждаващи и показват висок процент на преживели животни (мишки). Извършеният задълбочен

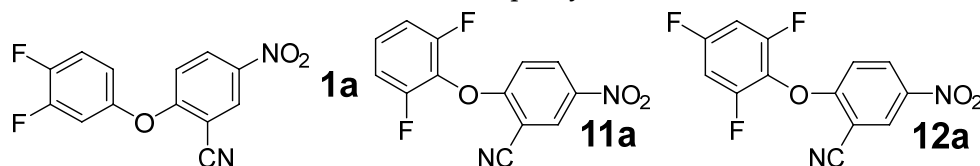
QSAR анализ показва зависимостта структура-активност на синтезираните съединения и на тази основа - насочен синтез на съединения с по-силен ефект, за да се установят допълнителни възможни вариации в техните молекули към по-активни аналози.

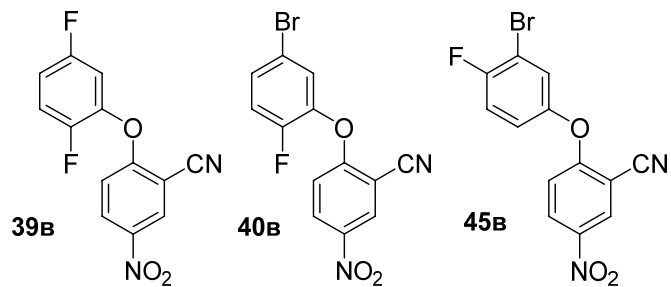
Тези по-значителни промени в новосинтезираните аналози включваха синтез на диарил амини и диарил сулфиди, явяващи се изостери на диарил етерите. Бе потвърдено, че най-активни сред тях са именно диарил етерите, но не и техните серни или азотни аналози (диарил амини и диарил сулфиди). Установи се също така, че някои диарил етери имат *in vitro* активност и срещу други вируси (например аденовирус тип 5 и коронавирус OC43). Най-вероятно тези съединения имат и друг механизъм на действие, който в бъдеще трябва да се изследва. Изглежда диарил етерите имат потенциал да бъдат широкоспектърни антивирусни агенти, като такива антивирили са ценни за лечението на вирусни инфекции, особено в условия на пандемии и новопоявяващи се вируси. Тези агенти не само че разширяват терапевтичния обхват, но и намаляват риска от вирусна резистентност, което ги прави ключови в глобалните усилия за контрол на вирусни заболявания.

Бе изследван комбинираният ефект на новосинтезирани диарил етери, показали висока активност в *in vitro* експериментите (**1a**, **11a**, **12a**, **39в** и **41в**) срещу коксакivirus B1 с ентеровирусни инхибитори (плеконарил, оксоглауцин и гуанидин HCl), участвали в тройните комбинации. Резултатите показаха, че всички комбинации на новосинтезираните диарил етери с плеконарил и оксоглауцин са синергични като силно изразен синергичен ефект срещу репликацията на коксакivirus B1 показват двойките: **1a+плеконарил**, **1a+оксоглауцин**; **12a+оксоглауцин**; **39в+плеконарил** и **41в+плеконарил**. Комбинациите **1a+гуанидин HCl**; **12a+плеконарил**. В допълнение, двойките **11a+плеконарил**; **11a+оксоглауцин**; **39в+оксоглауцин** и **41в+оксоглауцин** демонстрират умерен синергичен ефект. Антивирусният ефект на комбинациите **11a+ гуанидин HCl**; **12a+гуанидин HCl**; **39в+гуанидин HCl** и **41в+гуанидин HCl** е с адитивен характер по отношение на репликацията на коксакivirus B1.

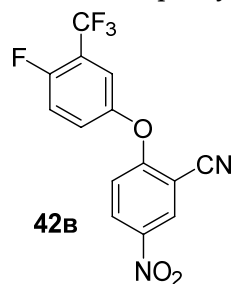
Тези резултати предполагат потенциал за по-нататъшни изследвания *in vivo* и са добра основа за комбиниране на анти-ентевирусни инхибитори в клинични изпитвания за терапия на ентеровирусните инфекции.

Съединения, показали **висока активност** срещу PV1:

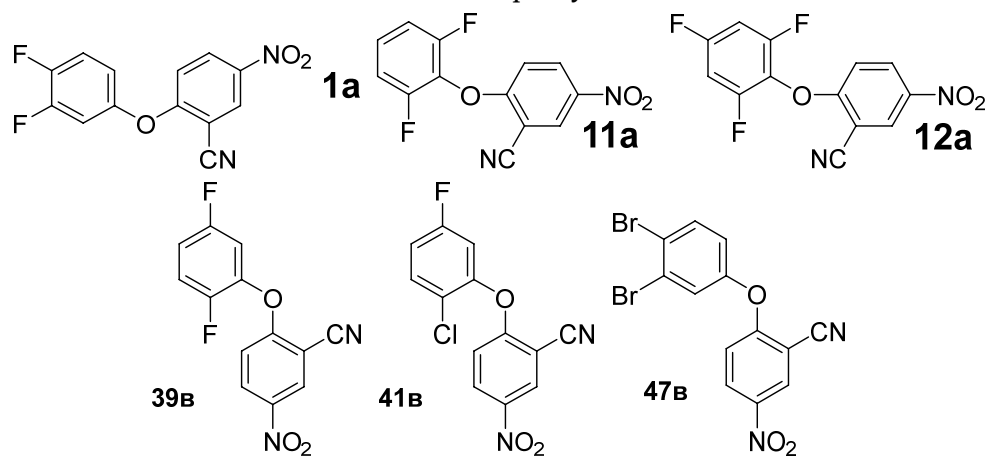




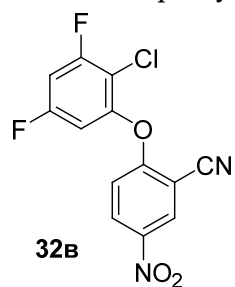
Съединение, показало **умерена активност** срещу PV1:



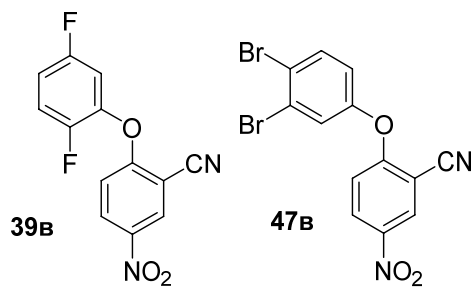
Съединения, показали **висока активност** срещу CVB1:



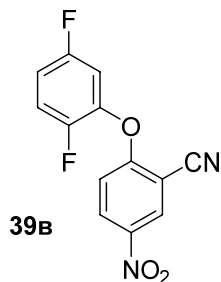
Съединение, показало **умерена активност** срещу CVB1:



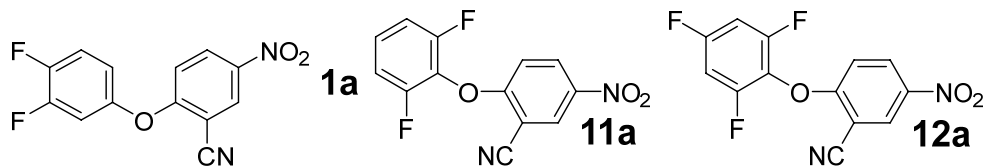
Съединения, показали **висока активност** срещу CVB3:



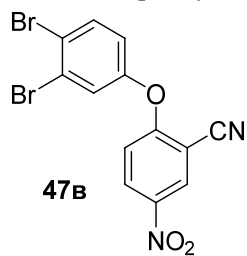
Съединение, показало **висока активност** срещу PV1, CVB1 и CVB3:



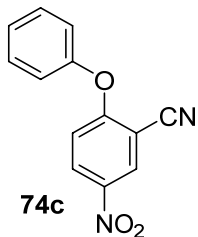
Съединения, показали **висока активност** срещу PV1 и CVB1:



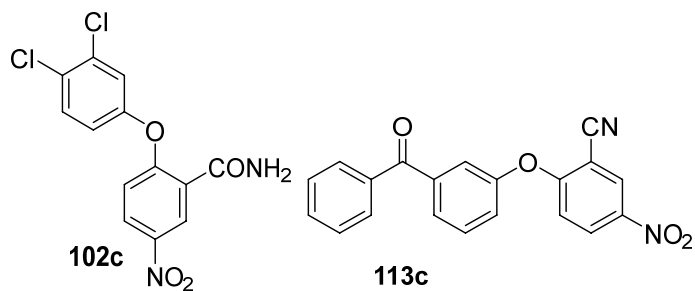
Съединение, показало **висока активност** срещу CVB1 и CVB3:



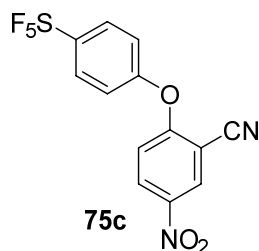
Съединение, показало **висока активност** срещу HCoV OC43:



Съединения, показали **умерена активност** срещу HCoV OC43:



Съединение, показало **висока активност** срещу HAdV-5:



Нашето проучване разкри, че нитробензонитрилните производни са обещаващ клас антивирусни агенти, притежаващи висока *in vitro* активност и селективност към PV1, CVB1 и CVB3 вируси, придружени с ниска цитотоксичност като ефективността им зависи от специфичната химична структура и функционалните групи. В рамките на настоящото изследване почти са изчерпани повечето възможности за успешни вариации на заместителите във другото ароматно ядро на MDL-860. Изглежда, че промените в ядрото, свързано с циано и нитрогрупите, могат да бъдат много по-перспективни за по-нататъшни изследвания. В *in vivo* експериментите беше установено, че най-обещаващите съединения проявяват добър терапевтичен ефект, като същевременно запазват ниска токсичност, което подкрепя потенциала на тези съединения като кандидати за по-нататъшни предклинични и клинични проучвания. Тези съединения показаха потенциал и спрямо коронавирус OC 43 и аденовирус тип 5. В заключение получените резултати за антивирусната ефективност на новосинтезираните диарил етери могат да послужат като основа за бъдещо оптимизиране на структурата на тези съединения с цел разработване на високоефективни и безопасни антивирусни препарати.

ПРИНОСИ

- ✓ Въведена бе нова терапевтична схема за комбинирано последователно прилагане на антиентеровирусни съединения при коксаки В1 вирусна невроинфекция в новородени мишки. Тази схема ефективно възпрепятства развитието на резистентни ентеровирусни мутанти, което представлява ключова характеристика на предложената терапевтична стратегия.
- ✓ Проведен е широкомащабен *in vitro* скрининг на библиотека от 114 нови малки молекули, аналози на референтния диарил етер MDL-860. В резултат на това селектирахме 10 съединения, които демонстрират активност сравнима и дори превишаваща съществено активността на референтното съединение срещу 3 ентеровируса (полиовирус тип1, коксакивирус В1, коксакивирус В3).
- ✓ Антивирусната активност на избраните 10 съединения позволява те да бъдат разгледани като изпълняващи изискванията за „hit compounds“. Те могат да бъдат избрани като участници в следващите предклинични фази, необходими при по-нататъшното разработване на антивирусни лекарства.
- ✓ Шестте най-активни *in vitro* съединения срещу коксакивирус В1, подложени на допълнителни *in vivo* изпитвания в миши модел при експериментална коксаки В1 невроинфекция показаха, че някои от тях превъзхождат референтното съединение, което ги прави перспективни за по-нататъшни изследвания, особено при включването им в наночастици или комплекси с водоразтворими полимери, което би могло да увеличи тяхната ефективност и стабилност.
- ✓ В настоящото изследване са установени диарил етери с висока *in vitro* антивирусна активност спрямо човешкия коронавирус ОС43 и човешки аденовирус тип 5. Това откритие разширява познанията за потенциала на диарил етерите като антивирусни агенти и демонстрира възможност за разработване на широкоспектърни съединения срещу други вируси (освен ентеровирусите), включително и ДНК-ови.

Списък на научни публикации, свързани с темата на дисертацията

1. Stoyanova A, Nikolova I, Galabov AS. Effect of consecutive alternating administration (CAA) of a triple anti-enteroviral combination on coxsackievirus B1 neuroinfection in mice. *Antiviral Res.*, 2015, 121: 138–144 Q1
2. Stoyanova, A., Nikolova, I., Pürstinger, G., Dobrikov, G., Dimitrov, V., Philipov, S., Galabov, A.S. Anti-enteroviral triple combination of viral replication inhibitors: activity against coxsackievirus B1 neuroinfection in mice. *Antivir. Chem. Chemother.* 2015, 24(5-6): 136-147 Q2
3. Galabov, A. S., Nikolova, I., Vassileva, R., Stoyanova, A. Antiviral combination approach: a perspective to combat enterovirus infections, *Prilozi/Contributions* 2015, 25, 2015, pp. 91-99. ISSN 0351-3254 Q4
4. Dobrikov, G. M.; Slavchev, I.; Nikolova, I.; Stoyanova, A.; Nikolova, N.; Mukova, L.; Nikolova, R.; Shivachev, B.; Galabov, A. S. Synthesis and anti-enterovirus activity of new analogues of MDL-860. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2017, 27 (19): 4540 Q1
5. Nikolova, I.; Slavchev, I.; Ravutsov, M.; Dangalov, M.; Nikolova, Y.; Zagranjarska, I.; Stoyanova, A.; Nikolova, N.; Mukova, L.; Grozdanov, P.; Nikolova, R.; Shivachev, B.; Kuz'min, V. E.; Ognichenko, L. N.; Galabov, A. S.; Dobrikov, G. M. Anti-enteroviral activity of new MDL-860 analogues: Synthesis, in vitro/in vivo studies and QSAR analysis. *Bioorganic Chemistry*, 2019, 85: 487 Q1
6. Grozdanov, P., Joffret, M-L., Styanova, A., Polston, P., Achouri, E., Nikolova, I., Delpeyroux, F., Galabov A. Genome Analysis of Coxsackievirus B1 Isolates during the Consecutive Alternating Administration Course of Triple Antiviral Combination in Newborn Mice, *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 2020, 28, pp. 1-6, DOI: 10.1177/2040206620906061, Q1
7. Bosch, P., Staneva, D., Vasileva-Tonkova, E., Grozdanov, P., Nikolova, I., Kukeva, R., Stoyanova, R., Grabchev, I.. Hyperbranched polymers modified with Dansyl units and their Cu(II) complexes. bioactivity studies. *Materials*, 13, 20, MDPI AG, 2020, ISSN:19961944, 4574. SJR (Scopus):0.647, JCR-IF (Web of Science):3.057 Q2
8. Staneva, D., Vasileva-Tonkova, E., Grozdanov, P., Vilhelmova-Ilieva, N., Nikolova, I., Grabchev, I.. Synthesis and photophysical characterisation of 3-bromo-4-dimethylamino-1,8-naphthalimides and their evaluation as agents for antibacterial photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 401, Elsevier, 2020, ISSN:18732666, 112730. SJR (Scopus):0.71, JCR-IF (Web of Science):3.306 Q1
9. Staneva, D., Angelova, S., Vasileva-Tonkova, E., Grozdanov, P., Nikolova, I., Grabchev, I.. Synthesis, photophysical characterisation and antimicrobial activity of a new anionic PAMAM dendrimer. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 403, 1, Elsevier, 2020, ISSN:10106030, SJR (Scopus):0.624, JCR-IF (Web of Science):3.306 Q1
10. Todorov, P, Georgieva, S, Staneva, D, Peneva, P, Grozdanov, P, Nikolova, I, Grabchev, I. Synthesis of new modified with rhodamine b peptides for antiviral protection of textile materials. *Molecules*, 26, 21, 2021, ISSN:14203049, DOI:10.3390/molecules26216608, JCR-IF (Web of Science):4.411 Q1
11. Manov, H, Staneva, D, Vasileva-Tonkova, E, Grozdanov, P, Nikolova, I, Stoyanov, S, Grabchev, I. Photosensitive dendrimers as a good alternative to antimicrobial photodynamic therapy of Gram-negative bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 419, 113480, 2021, ISSN:10106030, DOI:10.1016/j.jphotochem.2021.113480, JCR-IF (Web of Science):3.306 Q2
12. Vasilev, A., Grozdanov, P., Nikolova, I., Lozanov, V., Kandinska, M.. Ultrasonic Synthesis and Preliminary Evaluation of Anticoronaviral Activity of 6,7-Dimethoxy-4-(4-(4-methoxyphenyl) piperazin-

1-yl)-1-methylquinolin-1-ium Iodide. *MolBank*, 2022, 3, 2022, ISSN:14228599, DOI:10.3390/M1400, JCR-IF (Web of Science):0.52 Q4

13. Todorov, P., Georgieva, S., Staneva, D., Peneva, P., Grozdanov, P., Nikolova, I., Vasileva-Tonkova, E., Grabchev, I.. Study of Novel Peptides for Antimicrobial Protection in Solution and on Cotton Fabric. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27, 15, 2022, ISSN:14203049, DOI:10.3390/molecules27154770, JCR-IF (Web of Science):4.411 Q1
14. Saralieva, E., Dincheva, I., Tumbarski, Y., Petkova, N., Vilhelmova-Ilieva, N., Nikolova, I., Simeonova, L., Ivanov, I.. Chemical Composition, Antibacterial, Antiviral, Antioxidant, and Acetylcholinesterase Inhibitory Properties of Essential Oils from *Carlina acanthifolia* All. roots. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, Taylor & Francis, 2022, ISSN:0972-060X, DOI:10.1080/0972060X.2022.2133973, SJR (Scopus):0.404, JCR-IF (Web of Science):1.971 Q2
15. Petrov, N., Stoyanova, M., Stoyanova, A., Nikolova, I., Grozdanov, P., Galabov, A.S.. Gene silencing of VP1 gene of coxsackievirus B3 neurotropic strain Nancy by dsRNAs and siRNAs. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 36, 1, Taylor and Francis Online, 2022, ISSN:13102818, DOI:doi.org/10.1080/13102818.2022.2082320, 353-361. JCR-IF (Web of Science):1.632 Q3
16. Arabadzhieva, R., Ivanov, I., Petkova, N., Todorova, M., Tumbarski, Y., Vlaeva, I., Vilhelmova-Ilieva, N., Nikolova, I., Simeonova, L.. Microwave-Assisted Synthesis of Lactose Acetates with Antimicrobial, Cytotoxic and Antiviral Properties. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12, 6, *Biointerface Research Applied Chemistry*, 2022, ISSN:2069-5837, DOI:10.33263/BRIAC126.84538470, 8453-8470. SJR (Scopus):0.247, JCR-IF (Web of Science):2.74 Q3
17. Zaharieva MM, Dimitrova LL, Philipov S, Nikolova I, Vilhelmova N, Grozdanov P, Nikolova N, Popova M, Bankova V, Konstantinov SM, Zheleva-Dimitrova D, Najdenski H. In Vitro Antineoplastic and Antiviral Activity and In Vivo Toxicity of *Geum urbanum* L. Extracts. *Molecules*, 27, 1, MDPI, 2022, ISSN:1420-3049, DOI:10.3390/molecules27010245, 245. SJR (Scopus):0.705, JCR-IF (Web of Science):4.927 Q1
18. Vilhelmova-Ilieva, N., Nikolova, I., Georgiev, D. Kaloyan, Slavov, Iliya, J.. In vitro antiviral activities of fruit extract from *Lycium barbarum* and methylxanthines extracted from Pu-erh and Banacha tea leaves. *Folia Medica*, 64, 5, Medical University of Plovdiv, 2022, ISSN:1314-2143, DOI:10.3897/folmed.64.e68987, 817-823. SJR (Scopus):0.203 Q4
19. Nikolova, I., Slavchev, I., Zaganyarska, I., Nikolova, N., Vilhelmova, N., Stoyanova, A., Grozdanov, P., Mukova, L., Galabov, A., Lessigiarska, I., Tsakovska, I., Dobrikov, G.. Synthesis and QSAR Analysis of Diaryl Ethers and Their Analogues as Potential Antiviral Agents. *ChemistrySelect*, 7, 34, ChemPubSoc Europe, 2022, ISSN:2365-6549, DOI:10.1002/slct.202203088, e202203088. SJR (Scopus):0.407, JCR-IF (Web of Science):2.307 Q2
20. Nikolova, I., Paunova-Krasteva, Ts., Petrova, Z., Grozdanov, P., Nikolova, N., Tsonev, G., Triantafyllidis, A., Andreev, S., Trepechova, M., Milkova, V., Vilhelmova-Ilieva, N.. Bulgarian Medicinal Extracts as Natural Inhibitors with Antiviral and Antibacterial Activity. *Plants*, 11, 13, MDPI, 2022, ISSN:2223-7747, DOI:10.3390/plants11131666, 1666. SJR (Scopus):0.765, JCR-IF (Web of Science):4.658 Q1
21. Staneva, D., Atanasova, D., Angelova, D., Grozdanov, P., Nikolova, I., Grabchev, I.. Antimicrobial Properties of Chitosan-Modified Cotton Fabric Treated with Aldehydes and Zinc Oxide Particles. *Materials*, 16, 14, 2023, ISSN:19961944, DOI:10.3390/ma16145090, JCR-IF (Web of Science):3.748 Q2
22. Kandinska, M., Burdzhiev, N., Cheshmedzhieva, D., Ilieva, S., Grozdanov, P., Vilhelmova-Ilieva, N., Nikolova, N., Lozanova, V., Nikolova, I.. Synthesis of Novel 1-Oxo-2,3,4-trisubstituted Tetrahydroisoquinoline Derivatives, Bearing Other Heterocyclic Moieties and Comparative Preliminary

Study of Anti-Coronavirus Activity of Selected Compounds. *Molecules*, 28, 3, 2023, ISSN:14203049, DOI:10.3390/molecules28031495, JCR-IF (Web of Science):4.927 Q1

23. Georgieva, S., Todorov, P., Staneva, D., Grozdanov, P., Nikolova, I., Grabchev, I.. Metal–Peptide Complexes with Antimicrobial Potential for Cotton Fiber Protection. *Journal of Functional Biomaterials*, 14, 2, 2023, ISSN:20794983, DOI:10.3390/jfb14020106, JCR-IF (Web of Science):4.901 Q2
24. Antov G., Vilhelmova-Ilieva N., Nikolova M., Nikolova I., Simeonova L., Grozdanov P., Krasteva M., Vladimirova A., Gospodinova Z.. In vitro evaluation of anticancer, antiviral, and antioxidant properties of an aqueous methanolic extract of *Rhus typhina* L. leaves. *International Food Research Journal*, 30, 3, Universiti Putra Malaysia, 2023, ISSN:19854668, DOI:10.47836/ifrj.30.3.19, 774-782. SJR (Scopus):0.256, JCR-IF (Web of Science):2.1 Q3
25. Vilhelmova-Ilieva, N., Nikolova, I., Nikolova, N., Petrova, Z., Trepechova, M., Holechek, D., Todorova, M., Topuzova, M., Ivanov, I., Tumbarski, Y.. Antiviral Potential of Specially Selected Bulgarian Propolis Extracts: In Vitro Activity against Structurally Different Viruses. *Life*, 13, 7, 2023, ISSN:20751729, DOI:10.3390/life13071611, JCR-IF (Web of Science):3.2 Q1
26. Said, Awad I., Staneva, D., Vasileva-Tonkova, E., Grozdanov, P., Nikolova, I., Stoyanova, R., Jordanova, A., Grabchev, I.. Synthesis, Spectral Characteristics, Sensing Properties and Microbiological Activity of New Water-Soluble 4-Sulfo-1,8-naphthalimides. *Chemosensors*, 12, 5, 2024, ISSN:22279040, DOI:10.3390/chemosensors12050079, JCR-IF (Web of Science):3.7 Q2