

Аннотация

к диссертации на соискание ученой степени доктора философии (PhD)
по образовательной программе 8D05110 – Вирусология Хайдарова Сакена
на тему «Изучение противовирусной активности лекарственных препаратов
против вируса SARS-CoV-2 *in vitro*»

Общее описание исследования: Диссертация посвящена изучению биологических и молекулярно-генетических свойств современных штаммов SARS-CoV2, выделенных на территории Республики Казахстан с использованием методов ОТ-ПЦР, определения жизнеспособности клеток, получения вирусного титра и экспресс-теста на COVID-19, а также соответствующих праймеров для выявления NSP12 генного продукта. Исследование *in vitro* противовирусной активности препаратов против вируса SARS-COV-2 было проведено на культуре клеток Vero E6 - ткани почек зеленой обезьяны.

Актуальность исследования: Пандемия COVID-19 в 2020 году продемонстрировала крайнюю уязвимость систем здравоохранения во всем мире. Прежде всего, скорость и интенсивность распространения вирусной инфекции были серьезной проблемой из-за высокой вирусной нагрузки, которой не могло противостоять большинство населения. Во-вторых, проблемы с госпитализацией: ни коечного фонда, медикаментов было недостаточно для эффективного сдерживания пандемии. В-третьих, тяжелые случаи иммунного ответа, которые наносили значительный ущерб здоровью, преимущественно легким людям, и из-за этой особенности были названы тяжелым острым респираторным синдромом. И наконец, быстрая и надежная диагностика вирусных инфекций как в Казахстане, так и во всем мире была основной целью, которую необходимо было достичь.

Одной из самых серьезных проблем, связанных с инфекцией SARS-COV 2, является относительно высокая частота мутаций и адаптационные механизмы организма-хозяина из-за скачкообразных изменений в белках и наиболее эффективным способом поддержания интенсивности заражения населения стала массовая вакцинация и поиск эффективных методов лечения. И конечно, фундаментальное понимание природы этой вирусной инфекции поможет нам свести к минимуму негативные последствия в борьбе с новыми вирусами в будущем.

Цель исследования: Изучение противовирусной активности препаратов против вируса SARS-CoV-2 *in vitro*.

Основными задачами исследования для достижения поставленной цели являются:

1. Секвенирование генома казахстанского варианта вируса SARS-CoV-2 и характеристика значимых генов вируса. Сравнительный и филогенетический анализ нуклеотидной последовательности вирусных генов;

2. Выявление мутации двух штаммов SARS-CoV2, варианта Alpha, который должен был быть выделен в Казахстане, путем сравнения его с исходным штаммом Wuhan;

3. Определение цитотоксичности - безопасной концентрации четырех противовирусных препаратов;

4. Выявление наиболее эффективного и сильнодействующего противовирусного препарата среди трех кандидатов: Рибавирин, Фавипиравир (Fabiflu) и Тенофовир (Tenvir), а также кортикостероида с безопасной концентрацией, которая минимизирует клеточную токсичность при сохранении высокой жизнеспособности клеток.

5. Определить коэффициент ингибирования $IC_{10} \rightarrow IC_{50} \rightarrow IC_{100}$ - Диапазон противовирусного препарата - Тенофовир (TAF) с приемлемым SI (индексом селективности);

6. Провести и подтвердить доклиническое испытание на мышах дикого типа (WT) для определения противовирусной эффективности сильнодействующего препарата в безопасной концентрации.

Объекты и материалы исследования: Штамм SARS-CoV-2/human/KAZ/B1.1/2021: живой вирус из титера вируса, его геном ORF1ab, в частности продукт гена NSP12, и клеточная линия Vero E6.

Методы исследования: В исследовании были использованы биологическо-молекулярные, генетические, клеточно-биотехнологические, микробиологические и фармацевтические методы.

Научная новизна исследования: Трехэтапное диссертационное исследование эффективности противовирусной активности таблетированного препарата против казахстанского SARS-CoV-2/human/KAZ/B1.1/2021, выделенного и охарактеризованного штамма варианта Альфа, и МТТ-тест на штамме Ухань с использованием оригинального материала Tenvir (TAF) из Китая. Анализы цитотоксичности противовирусных препаратов и жизнеспособности клеток — Определение оптимальной концентрации противовирусного препарата (CC50) с использованием двух колориметрических методов, ССК8 и МТТ, *in vitro* в Казахстане. Три таблетированные формы препаратов продемонстрировали дополнительную ингибирующую активность: Тенофовир (TDF и TAF) с $IC_{10} = 0,174$ мкМ, $IC_{50} = 1,74$ мкМ и $IC_{100} = 174$ мкМ при концентрации 50 мкг/мл. Рибавирин: $IC_{10} = 2$ мкМ, $IC_{50} = 7$ мкМ и $IC_{80-90} = 205$ мкМ 50 мкг/мл., Фавипиравир: с $IC_{10} = 1,65$ мкМ, $IC_{37} = 318$ мкМ, 50 мкг/мл. Дексаметазон не проявил ингибирующих свойств ни при какой концентрации или объеме. Сравнение эффективности и цитотоксичности (CC50/IC50) трех таблетированных противовирусных препаратов, выявление противовирусного препарата с положительным индексом селективности (значение SI) и анализ теста анализа ССК8. Противовирусная активность трех таблетированных пролекарств (активных агентов): Рибавирин, Тенофовир и Фавипиравир на линии клеток Vero E6, которая является как восприимчивой, так и перmissive для вируса SARS-CoV2 – ингибирование RdRP, вызывающее летальный мутагенез для репликации вируса со значительно более высокой

вирусной нагрузкой MOI:2 или TID50=10, тогда как MOI 0,01 достаточно, чтобы вызвать цитопатический эффект в течение 24 часов (потенциал снижения вирусной нагрузки увеличивается в 200 раз). Молекулярно-генетическая характеристика гена RdRP (РНК-зависимая РНК-полимераза) (NSP12-неструктурные белки) и его «генетический консерватизм» штамма SARS-CoV-2/human/KAZ/B1.1/2021, альфа-варианта по сравнению с исходным штаммом Ухань; Предположение о противовирусной активности было подтверждено с использованием Tenvir TAF (чистая концентрация Aldrich) с раствором 10 мкг/мл от исходной концентрации 25 мг/мл. Все три противовирусных препарата нацелены на активность RdRP, что затрудняет репликацию вируса.

Теоретическая и практическая значимость исследования:

Четкое представление об эффективности трех спорных противовирусных препаратов и одного гормонального (стероидного) препарата *in vitro*. Чтобы понять, какие из этих препаратов демонстрируют не только практический, т.е. клинический эффект, но, и чтобы установить безопасную дозировку в стратегиях лечения COVID-19. Во время пандемии Казахстан столкнулся с многочисленными различными случаями прогрессирования COVID-19 и стадиями осложнений у инфицированных пациентов с разрушительными посткоронарными последствиями и даже летальными исходами из-за плохого понимания биологической природы вируса SARS-COV 2. Цель этого исследования - дать лучшее представление не только о лечении COVID-19, но и о случаях аналогичной вирусной инфекции в будущем.

Противовирусные эффекты были продемонстрированы на модели клеток Vero E6, кроме того, были оценены и подтверждены цитотоксические характеристики всех четырех препаратов. В штамме SARS-CoV-2/human/KAZ/B1.1/2021 были выявлены и количественно определены участки неструктурного белка в вирусном геноме, и их биологическая "консервативная" природа была подтверждена.

Основные положения для защиты:

1) Штамм SARS-CoV-2/human/KAZ/B1.1/2021, вариант Alpha – объект противовирусного исследования, направленного на весь ORF1ab, где ORF1a NSP1-11 (участок протеазы) и ORF1b NSP12-16 (сайт репликации вирусной РНК) со штаммоспецифической мутацией, которая отвечает за репликацию вирусной геномной РНК, а также за субгеномную РНК, которая регулирует окончательную сборку вирионов.

2) Мощное ингибирование RdRP (РНК-зависимая РНК-полимераза обнаруживается при показателе MOI 2 или ниже (две вирусные частицы на каждую клетку-хозяина) в 12-луночном образце Тенофовиром (таблетированный TDF против SARS-CoV-2/human/KAZ/B1.1/2021, вариант Alpha) и TAF (лабораторный штамм) против оригинального штамма Wuhan). Безопасные для таблеток концентрации Тенофовира, Фавипиравира, Рибавирина и Дексаметазона должны поддерживать жизнеспособность клеток с нецитотоксическим значением вирусной нагрузки — MOI 2 (одна клетка-хозяин на две интактные вирусные частицы или бляшкообразующие единицы (PFU/мл)) с 200 мкл объема вируса) на 10 000 клеток.

3) Методы подсчета клеток ССК8 и МТТ демонстрируют истинную цитотоксичность и противовирусные анализы на надежных клетках Vero E6 с высоким профилем роста пролиферации для четырех выбранных препаратов: Тенофовир, Фавипиравир, Рибавирин и Дексаметазон.

4) Тенвир (Тенофовир-TDF и TAF) является эффективным противовирусным препаратом среди четырех выбранных для ингибирования накопления вируса в инфицированных клетках Vero, достигая максимального значения \log_2 100% с высокими показателями жизнеспособности клеток при относительно высокой вирусной нагрузке MOI 2 или ниже. *In vivo* доклинические исследования в Китае показали снижение вирусной нагрузки MOI4 → MOI2.

Основные результаты исследования и заключение:

1) Весь геном штамма SARS-CoV-2/human/KAZ/B1.1/2021, вариант Alpha, был секвенирован. Штамм SARS-CoV-2/human/KAZ/B1.1/2021, также известный как штамм варианта Alpha, возник в Европе в 2021 году и служит отправной точкой филогенетического дерева. Эта ветвь имеет тесные связи с европейскими штаммами (Приложение А-С).

2) Мутации штаммов SARS-CoV-2/human/KAZ/Britain/2021 и SARS-CoV-2/human/KAZ/B1.1/2021 по сравнению с референсной последовательностью Wuhan-Hu-1 SARS-CoV-2. В моей диссертации был важен только сегмент ORF1b. Он не выявил существенных мутаций, которые могли бы вызвать противовирусную резистентность у SARS-CoV-2/human/KAZ/B1.1/2021, штамма варианта Alpha.

3) Было обнаружено, что безопасная для цитотоксичности концентрация тенофовира составляет - 50 мкг/мл или 174 мкМ как для TDF, так и для TAF (10 нМ намного безопаснее, чем TDF) - для IC100. Кроме того, оценка тенофовира, фавипиравира, рибавирина и дексаметазона с использованием анализов жизнеспособности клеток МТТ и ССК8 в контексте инфекции SARS-CoV-2 дает критически важную информацию об их потенциальной противовирусной эффективности и цитотоксичности. Эти анализы, которые измеряют митохондриальную активность (МТТ) и клеточные дегидрогеназы (ССК8), обеспечивают надежную основу для количественной оценки эффектов препаратов на жизнеспособность клеток и противовирусную активность *in vitro*, особенно в таких моделях, как Vero E6 или других восприимчивых клеточных линиях.

4) Тенвир (Тенофовир) является наиболее эффективным и мощным противовирусным препаратом среди трех выбранных; однако он не самый безопасный. Точное и правильное использование может легко сгладить прогрессирование COVID-19 до легкой и средней стадии заболевания.

Тенвир (Тенофовир) является мощным противовирусным препаратом среди четырех выбранных против SARS-CoV-2/human/KAZ/B1.1/2021, штамма варианта Alpha, и его цитопатическая оптимальная вирусная нагрузка была обнаружена при MOI 2. EC50 при воздействии Тенвира (TDF) не была обнаружена из-за высокой цитотоксичности в почечных клетках Vero E6; мы

получили только EC₅₀/IC₅₀ при 50 мкг/мл. Приблизительная оценка составляет 0,5 мкг/мл или 1,74 мкМ EC₅₀ таблетированного Tenvir (TDF).

5) Коэффициент ингибирования IC₁₀ → IC₅₀ → IC₁₀₀ -диапазон был определен только в Китае, где исходный и чистый TAF имели приемлемый SI (индекс селективности).

6) Доклинические испытания на мышах дикого типа подтвердили противовирусную эффективность TAF в концентрации 50 мкг/мл.

Вклад автора в результаты, описанные в диссертации: анализ литературных данных по исследуемой проблеме, постановка целей и задач исследования, проведение экспериментальных исследований, анализ полученных результатов и статистическая обработка, а также написание диссертации были выполнены автором самостоятельно.

Апробация исследования: результаты исследования и основные принципы диссертации были представлены и обсуждены на следующих международных научных конференциях и симпозиумах:

- «Современные научные технологии» (9-10 февраля 2023 г.). Стокгольм, Швеция, 2023 г.

- 3-я международная конференция по вирусологии, инфекционному заболеванию COVID-19, 24-25 октября 2022 г., Дубай, ОАЭ

- Материалы 1-й Международной научной конференции, 26-27 января 2023 г., Варшава, Польша

- II Международный форум "Asfen Forum, новое поколение-2024", 6-7 июня 2024 г., Алматы, Казахстан

Публикации: Основным результатом диссертации являются 9 опубликованных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых международных научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science или Scopus, 2 статьи в списке Комитета по контролю в сфере образования и науки Республики Казахстан и 5 тезисов, опубликованных на международных конференциях.

Структура диссертации: Диссертация содержит 138 страниц компьютерного текста, символов и сокращений, а также введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, заключение и список использованной литературы, всего 115 записей. Работа содержит семь таблиц, шесть математических формул, 50 рисунков, пять приложений и одну монографию.