

**Зыбкина Анастасия Владимировна**

**ПСЕВДОВИРУСЫ КАК ИНСТРУМЕНТЫ ИЗУЧЕНИЯ  
ПОВЕРХНОСТНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ ФИЛОВИРУСОВ И ПОИСКА  
ИНГИБИТОРОВ ПРОНИКНОВЕНИЯ**

1.5.3 - молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Научный руководитель** Щербаков Дмитрий Николаевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

**Официальные оппоненты:** Игнатъев Георгий Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»;  
Шаршов Кирилл Александрович, кандидат биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной эпидемиологии и биоразнообразия вирусов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

**Ведущая организация:** Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Защита состоится «30» сентября 2022 г. в 11-00 на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирской области, тел. 8(383) 363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Т.С. Непомнящих

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

Болезнь, вызванная вирусом Эбола (БВВЭ) – острое вирусное заболевание, смертность людей от которой может достигать 90% (Feldmann H., et al., 2003). Возбудитель БВВЭ – вирус с (-) РНК геномом – был открыт в 1976 году. В последнее десятилетие мир столкнулся с масштабными вспышками, обусловленными эболавирусом (ЕВОВ) Заир, в Западной Африке в 2013-2016 гг. и в Демократической Республике Конго в 2017-2021 гг. По данным Всемирной организации здравоохранения, количество погибших от вспышки ЕВОВ за время эпидемии 2013-2016 гг. превысило 11 тысяч человек. Складывающаяся ситуация требует принятия адекватных мер противодействия, среди которых приоритетными являются разработка вакцин и специфических противовирусных препаратов.

Работы по разработке вакцин и терапевтических препаратов сопряжены с использованием «живых» вирусов. Работа с высокопатогенными вирусами, к которым относится эболавирус, ограничена необходимостью соблюдать специальные условия биобезопасности (BSL-4). Для некоторых видов работ адекватной и безопасной заменой инфекционным вирусам могут служить псевдовirusы.

Инфекционность псевдовirusных частиц ограничена лишь одним циклом. Это обеспечивает биологическую безопасность данной системы, которая может быть использована для изучения стадий вирусной инфекции, опосредуемых поверхностными белками трудно культивируемых и высокопатогенных вирусов (Whitt M.A., 2010).

В настоящее время для получения псевдовirusов филовirusов используют две основные системы: лентивirusную и рабдовirusную. Лентивirusная система достаточно толерантна к встройке вирусных поверхностных белков (Kobinger G.P., et al., 2001). Вirusоподобные частицы получают котрансфекцией культивируемых клеток млекопитающих пакующей плазмидой и плазмидой, кодирующей поверхностный гликопротеин (GP) эболавируса. Полученные таким образом частицы представляют собой лентивirusный капсид, а их поверхность покрыта гликопротеином филовirusов. Для изучения эболавируса систему на основе лентивirusов начали использовать в конце 90-х годов (Wool-Lewis R.J., et al., 1998). Плотность экспонирования поверхностного белка на поверхности таких псевдовirusных частиц низка, а морфология значительно отличается от филовirusной (Bhattacharyya S., et al., 2010). Отличается и иммунологическое поведение таких частиц.

В основе второй системы получения псевдовirusов эболавируса лежит система почкования вируса везикулярного стоматита (ВВС). Если для почкования лентивirusов важен комплекс gag и gag-pol (капсидные белки), то в случае ВВС почкование определяется системой матриксный белок – нуклеопротеиновый комплекс, поэтому реализация этого подхода невозможна с использованием только плазмид. Для упрощения системы псевдотипирования ВВС, была разработана оригинальная система, позволяющая проводить быструю "смену" поверхностного гликопротеина (Whitt M.A., 2010). Для этого используют вирусные частицы, содержащие дефектный по гену поверхностного белка (G) геном, ими инфицируют

клетки, предварительно трансфицированные рекомбинантной плазмидой, содержащей последовательность вирусного поверхностного гликопротеина (Whitt M.A., 2010). Для удобства анализа инфекционности в дефектный геном ВВС встроена последовательность, кодирующая люциферазу. Сравнение результатов нейтрализации антителами, полученными с использованием этой системы, с результатами, полученными при использовании натурального вируса, показывает, что она достаточно близко имитирует иммунологические особенности эболавируса (Pinykh P.A., et al., 2016).

### **Цель исследования**

Разработка псевдовирюсов и их использование для поиска соединений ингибиторов проникновения эболавирусов в клетку-мишень.

### **Задачи исследования**

1. Получить препараты лентивирусных и рабдовирусных частиц, псевдотипированных поверхностными белками филовирюсов.
2. Охарактеризовать трансдуцирующую активность, иммунохимические и морфологические свойства полученных псевдовирюсов.
3. Оценить возможность применения полученных псевдовирюсов для индукции антител, нейтрализующих эболавирус.
4. Изучить противовирусную активность полусинтетических производных природных терпеноидов на модели псевдовирюсов эболавируса Заир.

### **Научная новизна**

В работе впервые исследована способность поверхностного гликопротеина эболавируса Заир обуславливать проникновение в клетки летучей мыши (Tb1.lu), норки (Mv1.lu) и свиньи (СПЭВ).

Показано, что иммунизация кур смесью лентивирусных и рабдовирусных частиц в комплексе с неполным адьювантом Фрейнда индуцирует наработку антител класса Y, нейтрализующих псевдовирюсы эболавируса Заир.

Впервые на основе вируса везикулярного стоматита с дефектом генома по гену поверхностного гликопротеина получены вирусные частицы, псевдотипированные поверхностным гликопротеином эболавируса Заир, – варианты гена GP с заменами аминокислот в позициях Y517, D522 и M548 на остаток аланина.

С использованием псевдовирюсной системы проведен анализ активности 70 производных терпеноидов. Найдены соединения-лидеры, способные ингибировать псевдовирюсы с индексом селективности, превышающим 800. Показано, что мишенью связывания исследованных веществ является сайт связывания сертралина. Наиболее высокой ингибирующей активностью обладают производные (-)-борнеола, индекс селективности которых на псевдовирюсах превышал 800, а при использовании натурального вируса достиг 31.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные псевдовирюсы эболавируса Заир обладают большим потенциалом для применения. Во-первых, использование в качестве тест-системы для определения эффективности потенциальных лекарственных препаратов. Во-вторых, использование псевдовирюсных частиц для активации гуморального

иммунного ответа против филовирюсов. В-третьих, тестирование сывороток переболевших для определения их нейтрализующей активности, а также животных, иммунизированных экспериментальными вакцинами. Кроме того, большой значимостью обладают результаты анализа потенциальных низкомолекулярных блокаторов, эти вещества могут послужить основой для создания эффективных противовирусных препаратов.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Вирусоподобные частицы, псевдотипированные поверхностными белками филовирюсов, обладают способностью проникать в клетки млекопитающих и способны имитировать иммунохимические и антигенные свойства натурального вируса.

2. Внутримышечное введение смеси лентивирусных и рабдовирусных псевдовирусных частиц, несущих на своей поверхности GP эболавируса Заир, в дозе  $3 \times 10^9$  частиц на животное, в комплексе с неполным адьювантом Фрейнда обеспечивает индукцию нейтрализующих антител с максимальным титром 1:4096.

3. Среди производных терпенового спирта борнеола, изоборнеола, камфоры обнаружены соединения, блокирующие проникновение частиц, псевдотипированных поверхностным гликопротеином эболавируса, по эффективности сравнимые с известными ингибиторами филовирюсных инфекций. Наиболее активным является (1S,4S)-1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-ил-3-(4-метилпиперидин-1-ил)пропаноат, его полуингибирующая концентрация и индекс селективности для псевдовирусных составляет  $0,8 \pm 0,06$  мкМ и 112 соответственно, при этом индекс селективности для натурального вируса равен 31.

4. Производные терпеноидов, исследованные в работе, блокируют проникновение псевдовирусных за счет взаимодействия с сайтом связывания сертралина, включающим такие ключевые аминокислотные остатки как тирозин в позиции 517, аспарагиновая кислота в позиции 522 и метионин в позиции 548.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Результаты работы отражены в 13 публикациях в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 5 – статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций, 8 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

Результаты работы представлены на международной конференции OpenBio (Кольцово, 2019, 2020), на XXI Зимней молодежной школе по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 2020). Получено 3 патента РФ.

### **Личный вклад автора**

Основная часть экспериментальной работы и анализ результатов выполнены лично автором. Выбор генов поверхностных белков филовирюсов и конструирование плазмид было выполнено совместно с канд. биол. наук Щербаковым Д.Н., очистку рекомбинантных антител при помощи аффинной хроматографии выполнил м.н.с. отдела биоинженерии Шаньшин Д.В., электронные микрофотографии псевдовирусных частиц выполнены Зайцевым Б.Н., Тарановым О.С., отдел микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»

Роспотребнадзора. Секвенирование ДНК выполнено Бондарем А.А., ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН. Синтез библиотеки соединений осуществлен сотрудниками лаборатории физиологически активных веществ НИОХ им. Н.Н. Ворожцова СО РАН. Скрининг соединений с использованием эболавируса Заир выполнен канд. биол. наук Зайковской А.В., отдел коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Теоретический докинг соединений осуществил канд. биол. наук Баев Д.С., лаборатория фармакологических соединений НИОХ им. Н.Н. Ворожцова СО РАН.

Работа выполнена в 2015–2021 гг.

### Структура и объем диссертации

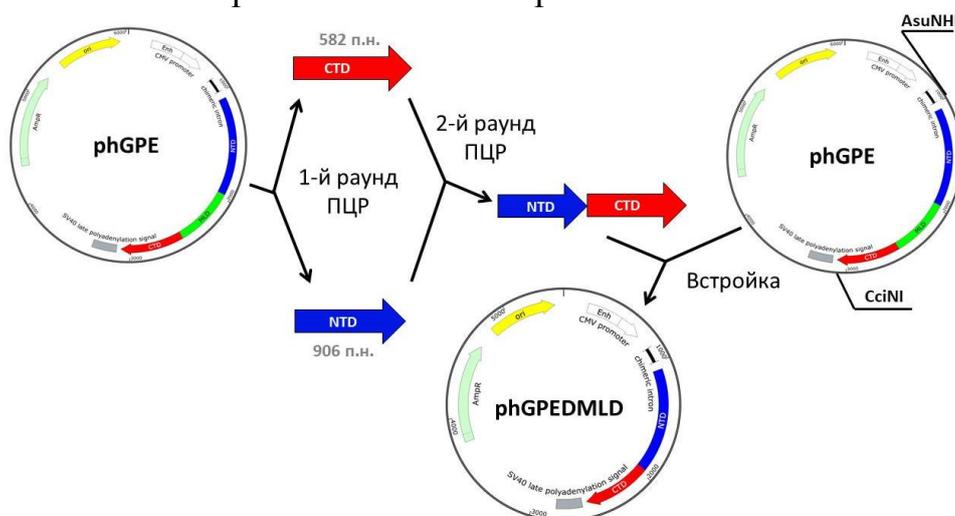
Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 128 страницах, содержит 10 таблиц и 17 рисунков. Библиографический список включает 258 источников.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Создание псевдовирuses EBOV и их характеристика

На основе информации об известных аминокислотных последовательностях GP эболавирусов, представленных в GenBank, был проведен дизайн экспрессионных векторов. Нуклеотидные последовательности синтезированы фирмой ДНК-синтез (г. Москва, Россия) и клонированы в составе промежуточного вектора рGH. Далее проводили клонирование последовательности GP в составе вектора рh. В работе была получена рекомбинантная плазмида, содержащая полноразмерный ген поверхностного белка EBOV (таблица 1).

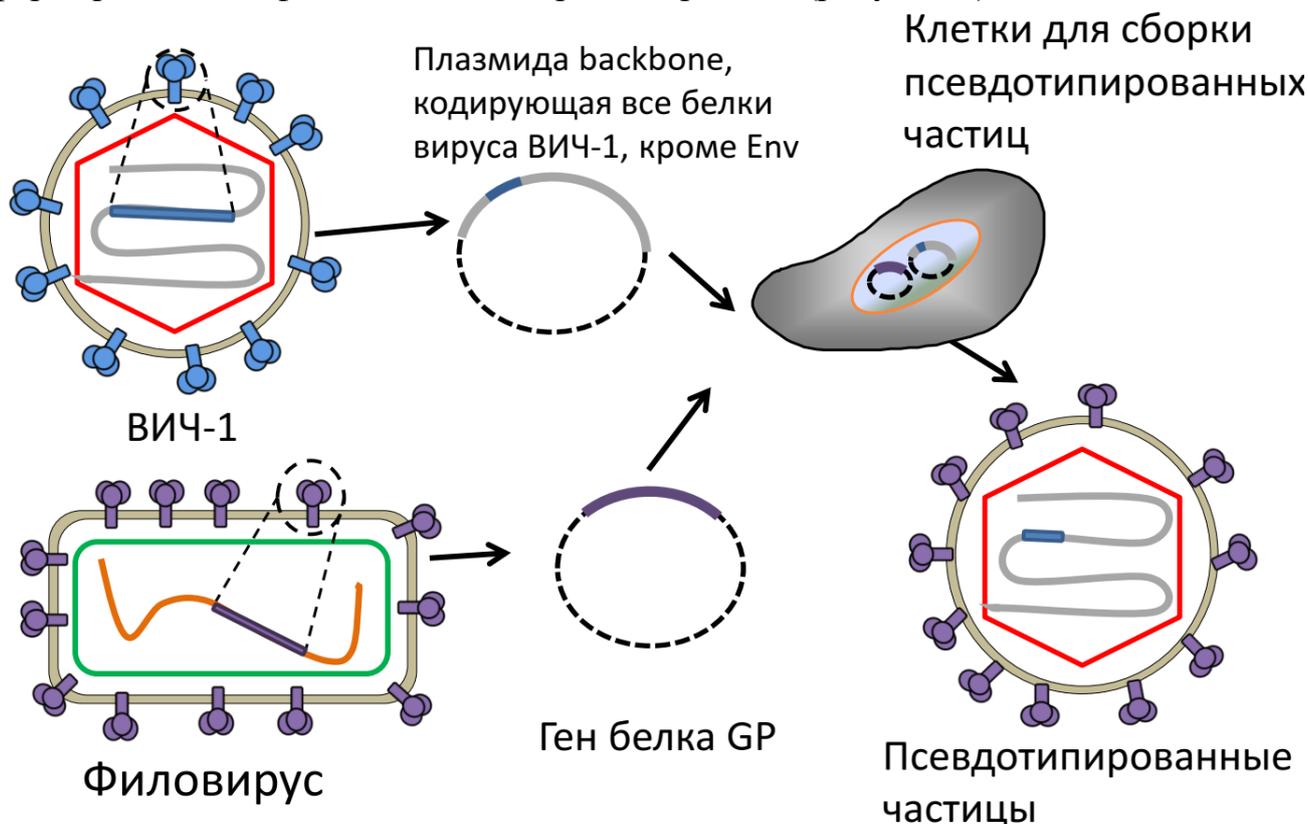
Следующим шагом стало получение рекомбинантной плазмиды, обеспечивающей синтез варианта GP, с делецией муциноподобного домена (рисунок 1). Поскольку муциноподобный домен может играть роль в уходе от иммунных реакций организма, для разработки вакцин этот регион удаляют из последовательности поверхностного гликопротеина.



**Рисунок 1.** Схема получения рекомбинантных плазмид, кодирующих ген GP без муциноподобного домена.

В работе для получения псевдовирuses использовали две системы: лентивирусную и на основе ВВС. Лентивирусные псевдовирuses представляют

собой вирусные частицы, включающие капсидные белки лентивирусного происхождения, псевдотипированные GP филовирусов. Такие псевдовirusы содержат дефектный лентивирусный геном, не способный обеспечить формирование инфекционных дочерних вирионов (рисунок 2).



**Рисунок 2.** Схема получения псевдовirusов на основе лентивирусной системы.

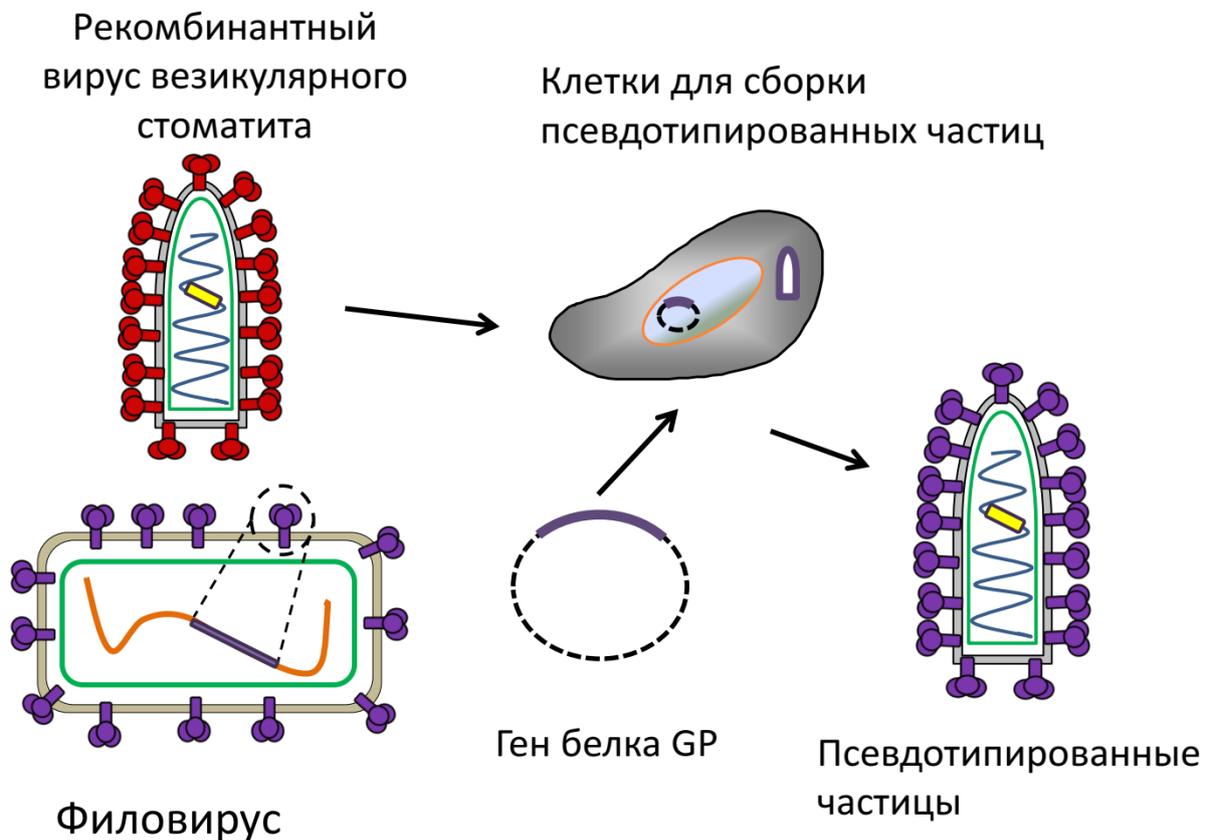
Для сборки вирусных частиц использовали клеточную линию HEK293T (почечный эмбриональный эпителий человека). Для трансфекции использовали две плазмиды: pSG3Δenv (была получена по программе предоставления реагентов для исследования СПИД NIH AIDS Reagent Program, США), и полученные в работе, содержащие ген поверхностного гликопротеина филовирусов. Функциональную активность псевдовirusных частиц анализировали при помощи клеток TZM-bl – генетически модифицированной клеточной линии HeLa. Уровень вирусной инфекции определяется по величине сигнала люминесценции, обусловленной экспрессией Tat-индуцируемого гена люциферазы. Сигнал люминесценции прямо пропорционален количеству зараженных клеток и определяется в относительных люциферазных единицах (ОЛЕ). Результат оценки функциональной активности представлен в таблице 1. Интересно отметить, что сигнал люминесценции, полученный для частиц, псевдотипированных GP EBOV с делецией муциноподобного домена, оказался выше по сравнению с полноразмерным вариантом.

Для получения рабдовирусных частиц использовали рекомбинантный ВВС с удаленным геном поверхностного гликопротеина, вместо которого в геноме расположен ген люциферазы (rVSVΔG(G)).

**Таблица 1.** Варианты псевдовirusов, полученных в работе.

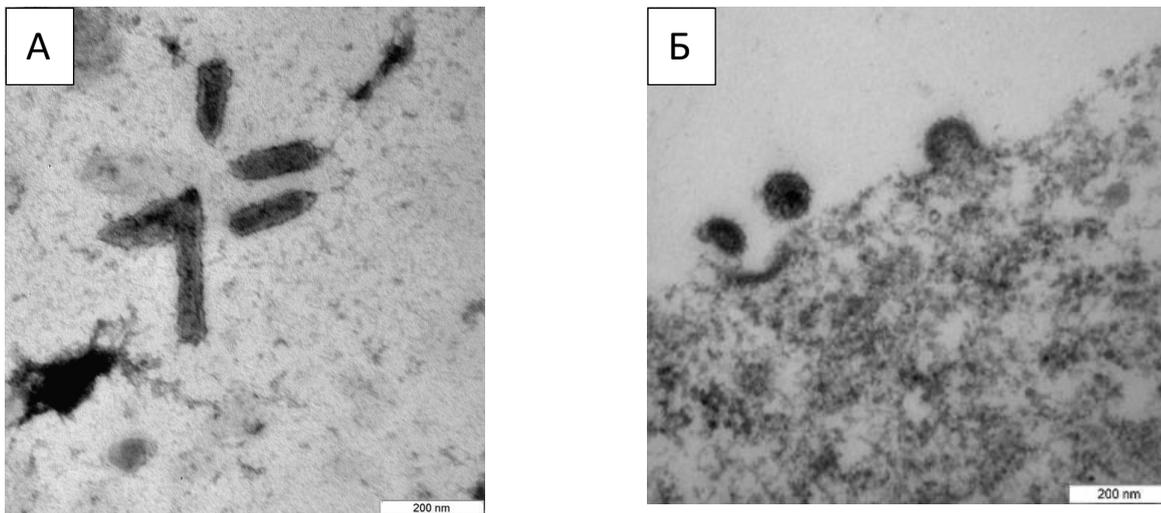
№	Вариант	Название плазмиды	ОЛЕ, lg
1	Zaire ebolavirus	phGPE	5
2	Zaire ebolavirus	phGPEDMLD	6,5
3	Zaire ebolavirus	phGPEdMLDEbov517	4,8
4	Zaire ebolavirus	phGPEdMLDEbov522	4,8
5	Zaire ebolavirus	phGPEdMLDEbov548	4,8

Для получения псевдовирусов проводили трансфекцию культуры клеток НЕК293FT плазмидой, кодирующей поверхностный гликопротеин EBOV, спустя сутки к этой культуре клеток добавили вирусные частицы rVSVΔG(G). Так как геном этого вируса дефектен по белку G, то вирусное потомство образуется за счет инкорпорации поверхностного гликопротеина, ранее синтезированного в клетках. В результате частицы пакуется дефектный геном, содержащий маркерную последовательность люциферазы. Схема получения псевдовирусов на основе рабдовирусной системы представлена на рисунке 3.



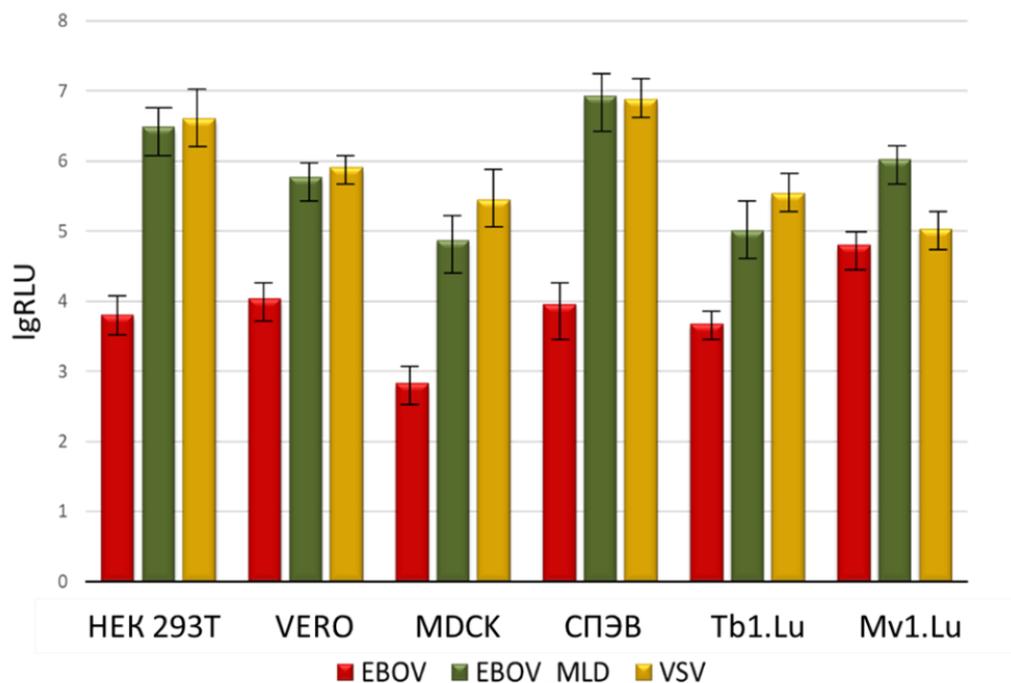
**Рисунок 3.** Схема получения псевдовирусов на основе рабдовирусной системы.

Формирование псевдовирусных частиц кроме функционального анализа было подтверждено при помощи электронной микроскопии. Физический титр псевдовирусных частиц составлял от  $1 \times 10^8$  до  $1 \times 10^{10}$  частиц/мл. При исследовании препарата лентивирусных псевдовирусов детектировались круглые частицы с размером 90-130 нм, в случае использования ВВС наблюдали частицы характерной пулеобразной формы (рисунок 4). Аналогичные функционально активные псевдовирусы на основе ВВС были получены для родственного филовируса марбургвируса Марбург (Volkova N.V., et al., 2021).



**Рисунок 4.** А – Электронная микрофотография частиц ВВС, псевдотипированных GP EBOV; Б – Электронная микрофотография клеток HEK293T с почкующимися лентивирусными частицами, псевдотипированными GP EBOV. Электронные микрофотографии сделаны Зайцевым Б.Н. и Тарановым О.С.

Полученные препараты псевдовирусных частиц использовали для изучения чувствительности различных культур клеток: HEK293T (почка эмбриона человека), Vero (почка африканской зеленой мартышки), MDCK (почка собаки), СПЭВ (почка эмбриона свиньи), Tb1.lu (легкое летучей мыши *T. brasiliensis*), Mv1.lu (легкое американской норки *N. vison*).



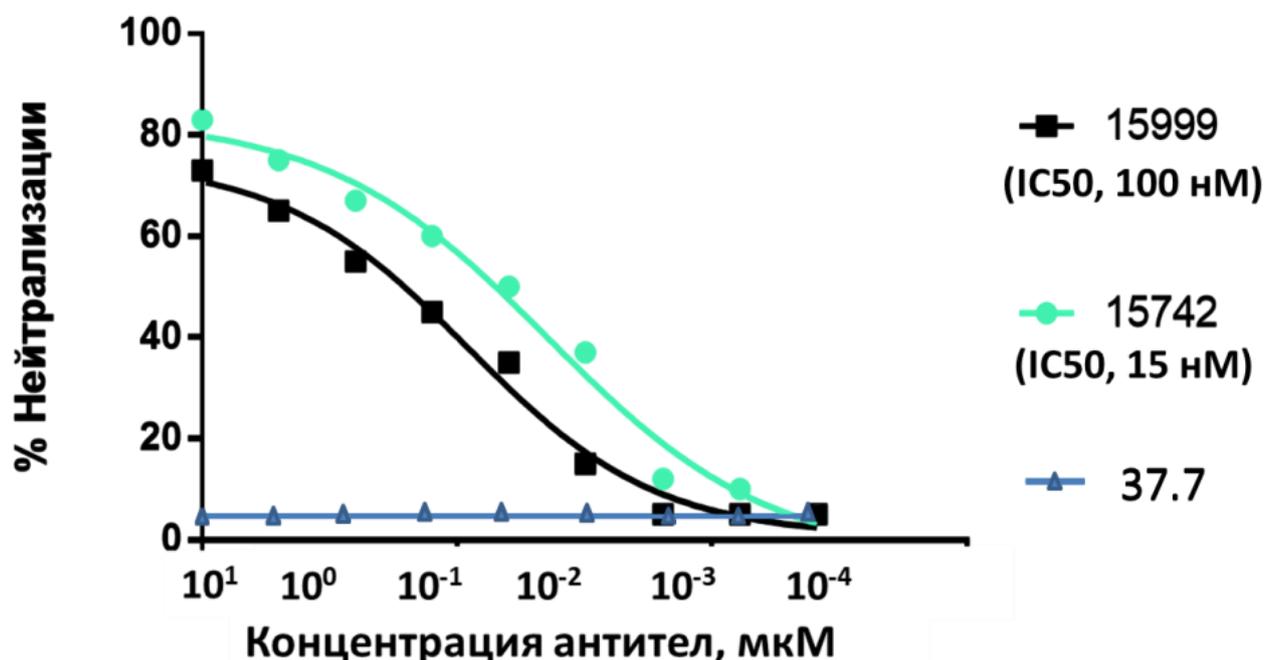
**Рисунок 5.** Уровень люминесценции, детектируемый для различных клеточных линий после проникновения вирусных частиц, псевдотипированных GP эболавируса Заир. EBOV – частицы, содержащие GP эболавируса, EBOV\_MLD – частицы, содержащие GP эболавируса без муциноподобного домена, VSV – частицы, содержащие G ВВС.

Частицы, псевдотипированные гликопротеином без муциноподобного домена, обладают более высокой трансдуцирующей активностью, зачастую на несколько порядков выше по сравнению с частицами, псевдотипированными полноразмерным гликопротеином (рисунок 5).

Для подтверждения антигенных свойств полученных псевдовиральных частиц были выбраны антитела – ADI-15742 и ADI-15999, способные нейтрализовать эболавирусы за счет взаимодействия с консервативным эпитопом, расположенным в петле слияния GP EBOV. Нуклеотидные последовательности, кодирующие переменные домены легкой и тяжелой цепей этих антител, были синтезированы ООО «ДНК-синтез» (Москва, Россия). Синтезированные последовательности были амплифицированы и клонированы в составе интеграционного вектора pVEAL.

Для получения клеток-продуцентов антител ADI-15742 и ADI-15999 проводили катионно-липидную трансфекцию (Lipofectamine 3000, Invitrogen) клеток CHO-K1 плазмидами – pVEAL-15742 (pVEAL-15999) и pCMV(CAT)T7-SB100. Первая содержала последовательность scFv-Fc выбранных антител, вторая содержала последовательность транспозазы SB100. После проведения селекции получили клоны клеточной культуры, продуцирующие рекомбинантный аналог антител ADI-15742 и ADI-15999.

Полученные антитела нейтрализовали псевдовирусы EBOV с IC<sub>50</sub> в диапазоне 15 – 100 нМ, что подтверждает антигенные свойства частиц (рисунок 6).

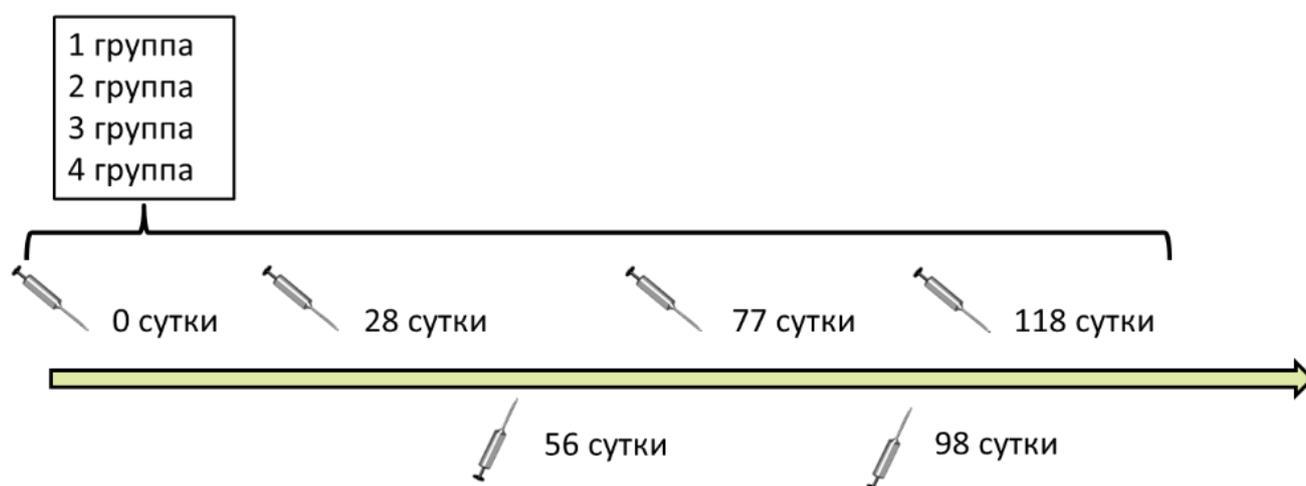


**Рисунок 6.** Кривые нейтрализации рабдовирусных частиц, псевдотипированных GP эболавируса Заир без муциноподобного домена, рекомбинантными антителами ADI-15742 и ADI-15999. В качестве отрицательного контроля использовали антитело 37.7, нейтрализующее вирус Ласса.

### Анализ иммуногенности псевдовирусов EBOV

Анализ иммуногенности псевдовирюсов EBOV проводили на модели кур. Выбор именно этой модели обусловлен рядом преимуществ. Забор антител IgY из желтка яиц не требует травмирующей процедуры забора крови и может проводиться многократно. Это позволяет вести подробный контроль динамики уровня специфических антител после иммунизации. Процедура выделения из желтка позволяет получать препараты IgY высокой степени чистоты без использования хроматографических методов и сложного оборудования. При этом количество препарата IgY после выделения достаточно для проведения необходимых измерений (ИФА, вируснейтрализация и т.д.).

Кур – *Gallus domesticus* породы Леггорн белый – иммунизировали очищенными препаратами лентивирусных и рабдовирусных частиц, псевдотипированных поверхностным гликопротеином EBOV без муциноподобного домена. Доза псевдовирюсных частиц составляла  $3 \times 10^9$  частиц/мл на одно животное. Птицы были разделены на 3 экспериментальные группы и одну контрольную (3 животных в группе) (рисунок 7).

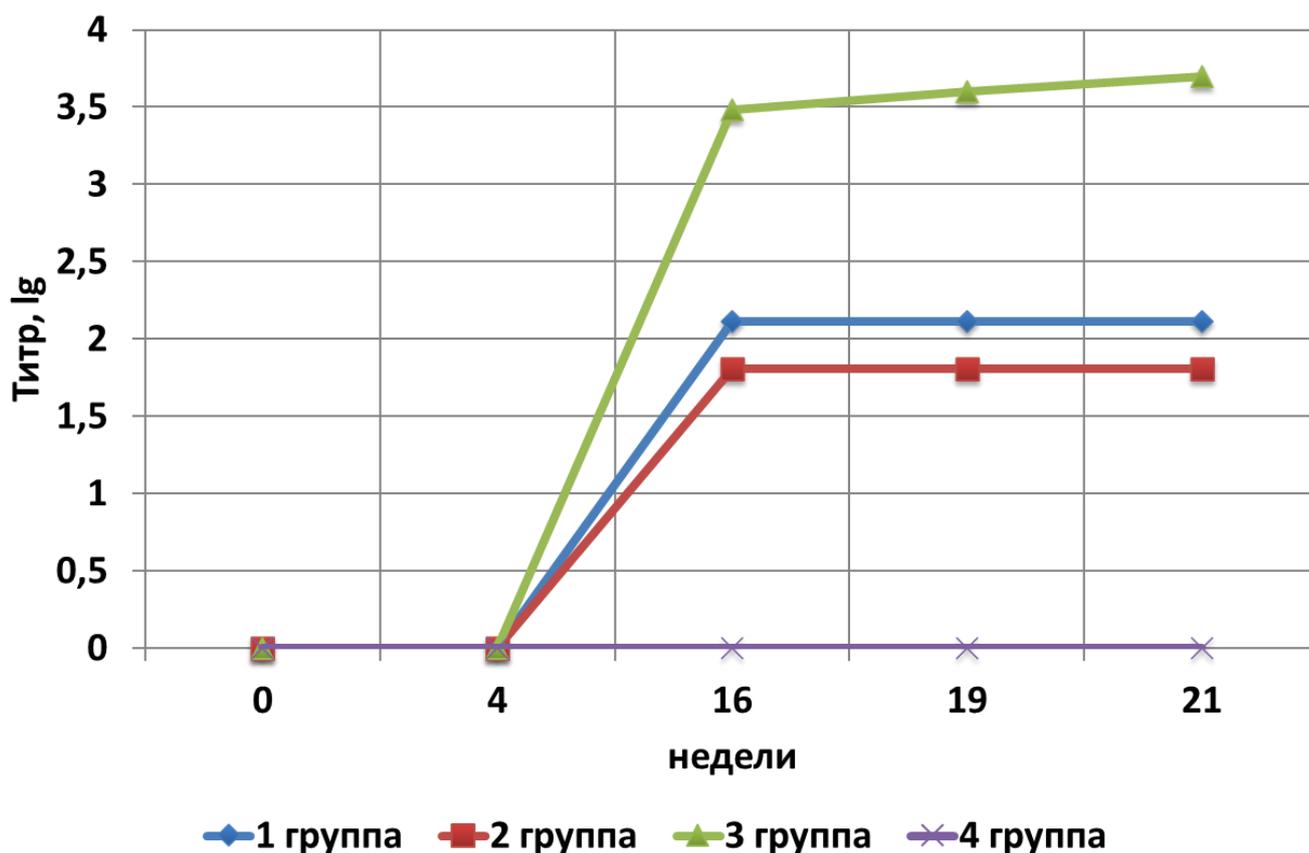


**Рисунок 7.** Схема иммунизации кур псевдовирюсами EBOV.

1 группа –  $3 \times 10^9$  лентивирусных частиц; 2 группа –  $3 \times 10^9$  частиц на основе ВВС; 3 группа –  $3 \times 10^9$  лентивирусных частиц и  $3 \times 10^9$  частиц на основе ВВС в комплексе с неполным адьювантом Фрейнда; 4 группа – физ. раствор.

Первую группу иммунизировали лентивирусными частицами в физ. растворе, вторую частицами на основе ВВС в физ. растворе, а третью смесью лентивирусных частиц и частиц на основе ВВС в комплексе с неполным адьювантом Фрейнда. Препараты вводили курам внутримышечно в область грудных мышц шестикратно с интервалом в 21-28 дней (рисунок 7). Выбор именно таких схем иммунизации (состава, доз и времени) опирался на опыт автора по иммунизации кур рабдовирусными частицами, псевдотипированными поверхностным гликопротеином марбургвируса Марбург (Полежаева О.А., и др., 2020). Оценку иммунного ответа вели по IgY, которые выделяли из куриного желтка по методу Полсона. Полученные препараты использовали для постановки реакции вируснейтрализации с псевдовирюсами EBOV.

Появление антител, нейтрализующих псевдовирюсы EBOV, в желтках иммунизированных птиц было отмечено после третьей иммунизации (рисунок 8).



**Рисунок 8.** Изменение титров антител, нейтрализующих псевдовирussy EBOV.

После пятой иммунизации титр нейтрализующих антител заметно не изменялся. Наибольшая эффективность индукции нейтрализующих антител наблюдалась для третьей группы, где титр достиг значения 1:4096.

#### **Использование псевдовирussy EBOV для поиска соединений, способных блокировать проникновение вируса в клетку-мишень**

Следующей частью данной работы стали эксперименты по использованию частиц ВВС, псевдотипированных поверхностным гликопротеином EBOV, для поиска веществ, способных ингибировать проникновение псевдовирussy в клетки, а также для изучения механизмов этого процесса.

В качестве объекта исследования были выбраны производные терпеноидов, обладающих ингибирующей активностью против ряда вирусов. В частности, было установлено, что производные терпеноидов блокируют процессы проникновения вируса гриппа (Sokolova A.S., et al., 2017), обладают высокой активностью против марбургвируса Марбург (Kononova A.A., et al., 2017) и ортопоксвирусов (Sokolova A.S., et al., 2018).

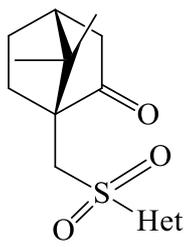
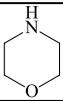
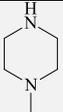
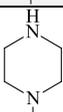
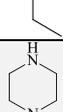
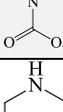
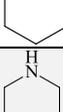
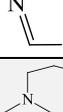
В работе был проведен анализ противовирусной активности библиотеки соединений, полученных на основе природных терпеноидов и их производных, любезно предоставленных д-ром хим. наук Яровой О.И. и сотрудниками лаборатории физиологически активных веществ НИОХ СО РАН. В библиотеку было включено 70 соединений, являющихся производными (1S)-(+)-камфора-10-сульфокислоты, (-)-борнеола, (+)- и (-)-изоборнеола, производными борниламина и изоборниламина. Чистота тестируемых соединений была подтверждена при

помощи ГЖ ХМС, структура доказана с помощью физико-химических и спектральных методов.

Для всех соединений с помощью МТТ-теста определена 50% цитотоксичность (CC50) для культуры клеток НЕК293Т. Выбрана стартовая концентрация для титрования, при которой сохраняется 90% выживаемость клеточной культуры для каждого соединения. Были определены 50% ингибирующая концентрация (IC50) синтезированных соединений для VSVΔGGPE и VSVΔGG. Для каждого соединения рассчитывался индекс селективности (SI) – отношение токсичности соединения и ингибирующей активности (CC50/IC50). Статистическую обработку данных и расчеты IC50 проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., Сан-Диего, Калифорния, США). Статистический анализ проводился с 95%-ным уровнем достоверности. Значение P менее 0,05 считалось статистически значимым. Полученные значения для исследуемых веществ приведены в таблицах 2-10.

На первом этапе работы были изучены производные **(1S)-(+)-камфора-10-сульфокислоты**. В качестве вещества сравнения в работе использовали сертралин, обладающий ингибирующей активностью в отношении EBOV. Вещества, взятые для анализа, проявили разную активность, наиболее эффективными ингибиторами оказались соединения **1** и **7**, несущие фрагменты морфолина и триазола (IC50 = 0,9 ± 0,5 мкМ (**1**) и 1,0 ± 0,4 мкМ (**7**)). Более того, эти соединения проявили низкую токсичность, в результате для них были получены высокие значения индекса селективности (SI) (921 и 1764) (таблица 2). Производное **8**, содержащее алифатический линкер между сульфамидной группой и морфолиновым фрагментом, также продемонстрировало высокую ингибирующую активность, значение SI составило 232. Высокое значение SI (134) также было обнаружено для производного пиперазина **4**, несущего N-этоксикарбонильный заместитель в пиперазиновом кольце (таблица 2).

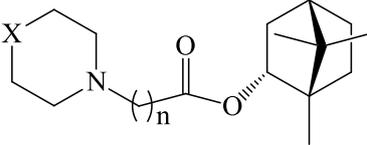
**Таблица 2.** Ингибирующая активность синтезированных производных (1S)-(+)-камфора-10-сульфокислоты.

Вещ-во	Het	IC50 (мкМ)	CC50 (мкМ)	SI	
1		0,9±0.5	829±24	921	
2		540±20	795±25	1,5	
3		91±4	761±32	8	
4		5±1	671±18	134	
5		60±8	835±40	14	
6		49±7	797±19	16	
7		1±0,4	1764±59	1764	
8		3±1	697±21	232	
Сертралин		0,7±0,3	408±26	543	

Соединения **2-3**, содержащие пиперазиновый цикл с алкильным заместителем в положении 4, оказывали значительно меньшее влияние на способность псевдовируса эболавируса Заир проникать в клетку-хозяина ( $IC_{50} = 91 \pm 4$  мкМ (**3**) и  $540 \pm 20$  мкМ (**2**)). Производные пиперидина **5-6** проявляют умеренную активность (таблица 2).

На втором этапе была проанализирована активность производных (-)-борнеола, (+)- и (-)- изоборнеола, борниламина и изоборниламина. Производные (-)-борнеола, включающие радикалы пиперидина и 4-метилпиперидина **9-17**, имеющие длинный линкер ( $n \geq 2$ ), продемонстрировали высокую эффективность ингибирования с высокими значениями SI 162-956. Гидрохлоридные соли **13** и **18** показали многообещающую противовирусную активность ( $IC_{50}$  0,8 и 0,4 мкМ), но были значительно более токсичны ( $CC_{50}$  87,0 и 69,8 мкМ) по сравнению со свободными основаниями **10** и **15** ( $CC_{50}$  289,7 и 279,7 мкМ) (таблица 3).

**Таблица 3.** Ингибирующая активность производных (-)-борнеола.

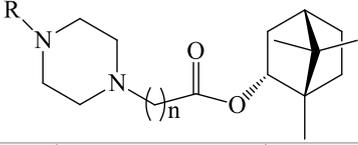
Вещ-во, n	X	CC50 (мкМ)	IC50 (мкМ)		SI	SI EBOV
			GPE	VSV-G		
						
<b>9, n=1</b>	CH <sub>2</sub>	141,4±14,1	15,7±0,8	122,5±13,5	9	
<b>10, n=2</b>	CH <sub>2</sub>	289,7±22,6	1,7±0,1	93,0±9,3	170	<b>9</b>
<b>11, n=3</b>	CH <sub>2</sub>	74,8±6,1	0,3±0,01	50,1±4,5	<b>230</b>	
<b>12, n=4</b>	CH <sub>2</sub>	100,9±12,1	0,6±0,05	105,4±8,4	162	
<b>13, n=2</b>	CH <sub>2</sub> , HCl	87,0±7,8	0,8±0,06	89,4±6,3	112	<b>31</b>
<b>14, n = 1</b>	CHCH <sub>3</sub>	71,6±6,4	8,5±1,1	35,0±2,4	8	
<b>15, n = 2</b>	CHCH <sub>3</sub>	279,7±28,3	0,3±0,04	289,7±19,7	<b>956</b>	<b>1,3</b>
<b>16, n =3</b>	CHCH <sub>3</sub>	171,1±12,8	9,3±1,1	276,4±13,5	18	
<b>17, n = 4</b>	CHCH <sub>3</sub>	73,0±3,1	0,2±0,02	83,5±7,3	<b>408</b>	
<b>18, n = 2</b>	CHCH <sub>3</sub> , HCl	69,8±5,6	0,4±0,03	71,5±5,4	171	<b>2,2</b>
<b>19, n = 1</b>	O	326,9±45,8	24,9±1,1	290,7±26,5	13	
<b>20, n = 2</b>	O	304,7±19,5	8,5 ± 0,7	319,8±30,1	36	
<b>21, n = 3</b>	O	210,1±14,3	6,5±0,5	287,7±14,4	33	
<b>Сертралин</b>		408±35,9	0,7±0,07	NT	582	<b>2</b>

Введение морфолинового кольца неблагоприятно для ингибирующей активности, хотя производные **19-21** проявляют низкую токсичность (CC50 = 210-326 мкМ) (таблица 3).

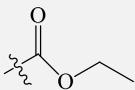
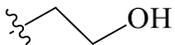
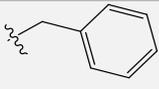
Некоторые из соединений были также проверены на способность блокировать натуральный эболавирус Заир. При этом соединение **13** ингибировало вирус с SI (EBOV), равным 31 (таблица 3).

Почти все 4-замещенные производные пиперазина показали хорошую противовирусную активность, за исключением производных этилпиперазин-1-карбоксилата **28-30**. Производные **22-27** и **32-33**, содержащие алкильные или гидроксиэтиленовые группы в пиперазиновом кольце с длиной линкера  $n \geq 2$ , были значительно более активными, показывая значения IC50 от 0,1 до 1,8 мкМ и значения CC50 от 99,2 до 282 мкМ.

**Таблица 4.** Ингибирующая активность производных (-)-борнеола.

Вещ-во, n	R	CC50 (мкМ)	IC50 (мкМ)		SI
			GPE	VSV-G	
					
<b>22, n =1</b>	CH <sub>3</sub>	312,5±30,6	6,8 ± 0,8	484,7±48,0	46
<b>23, n =2</b>	CH <sub>3</sub>	282,0±25,7	0,3±0,03	173,2±15,7	<b>870</b>
<b>24, n =3</b>	CH <sub>3</sub>	99,2±8,8	0,6±0,04	97,3±8,7	160

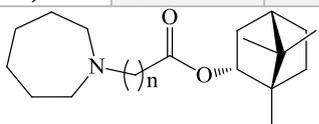
Продолжение Таблицы 4

<b>25, n = 1</b>	<b>C<sub>2</sub>H<sub>5</sub></b>	<b>129,7±11,5</b>	<b>1,6±0,1</b>	<b>263,6±21,9</b>	<b>80</b>
<b>26, n = 2</b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	263,6±24,3	1,6±0,1	80,5±5,9	170
<b>27, n = 3</b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	130,8±10,5	0,1±0,01	165,3±11,4	<b>880</b>
<b>28, n = 1</b>		227,0±13,6	19,9±2,1	112,9±8,9	11
<b>29, n = 2</b>		109,7±9,5	28,3±1,9	NT	4
<b>30, n = 3</b>		60,4±4,7	2,6±0,2	49,1±3,8	23
<b>31, n = 1</b>		295,9±32,8	13,9±1,0	394,2±38,2	21
<b>32, n = 2</b>		271,8±32,6	1,8 ± 0,1	258,9±25,9	153
<b>33, n = 3</b>		224,1±28,0	0,3±0,02	192,0±19,2	658
<b>34, n = 1</b>		247,3±23,0	2,2±0,2	24,1±2,4	114
<b>35, n = 3</b>		71,1±5,7	0,6±0,1	50,4±5,1	125
<b>36, n = 1</b>			59,4±5,6	1,3±0,1	39,8±3,4
<b>37, n = 2</b>	39,0±3,7		0,3±0,03	27,0±2,4	150
<b>38, n = 3</b>	30,1±2,0		0,3±0,03	26,0±2,3	100
<b>Сертралин</b>		408 ± 35,9	0,7±0,07	NT	582

Производное пиперазина **35**, содержащее 2-аминоэтильное замещение у атома азота, показало низкое значение IC<sub>50</sub> и высокую токсичность, в то время как соединение **34** имело значение CC<sub>50</sub>, равное 247 мкМ, и значение SI, равное 114. Интересно, что липофильная бензильная группа у атома азота значительно увеличивает токсичность соединений **36-38**, значения CC<sub>50</sub> которых варьируются от 30 до 59 мкМ (таблица 4).

Кроме того, производные азепана **39** и **41** продемонстрировали высокую токсичность, тогда как соединение **40** с длиной линкера  $n \geq 2$  показало высокое значение CC<sub>50</sub>, равное 182 мкМ, и умеренную активность, со значением IC<sub>50</sub>, равным 5,1 мкМ (таблица 5).

**Таблица 5.** Ингибирующая активность производных (-)-борнеола.

Вещ-во, n	CC <sub>50</sub> (мкМ)	IC <sub>50</sub> (мкМ)		SI
		GPE	VSV-G	
				
<b>39, n = 1</b>	71,6±7,9	1,0±0,1	NT	70
<b>40, n = 2</b>	182,5±16, 2	5,1±0,4	191,2±1 1,1	36
<b>41, n = 3</b>	62,2±5,7	0,2±0,0 2	NT	<b>250</b>

Производные с симметричными группами N, N-диалкиламинов не проявили заметной противовирусной активности, при этом исключением является (1S,2S,4S)-1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-ил 4- (диэтиламино) бутаноат (**47**), демонстрирующий высокую активность против rVSDGGPE с IC<sub>50</sub>, равным 0,3 мкМ, и низкую токсичность (CC<sub>50</sub> 165 мкМ) (таблица 6).

**Таблица 6.** Ингибирующая активность производных (-)-борнеола.

Вещ-во, n	R	CC50 (мкМ)	IC50 (мкМ)		SI
			GPE	VSV-G	
<b>42, n = 1</b>	CH <sub>3</sub>	388,6 ± 38,1	250,7 ± 22,3	522,6 ± 63,2	2
<b>43, n = 2</b>	CH <sub>3</sub>	505,2 ± 34,9	30,0 ± 2,6	NT	17
<b>44, n = 3</b>	CH <sub>3</sub>	100,6 ± 7,0	1,5 ± 0,1	NT	67
<b>45, n = 1</b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	344,0 ± 33,0	5,6 ± 0,5	560,9 ± 66,7	61
<b>46, n = 2</b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	326,9 ± 31,7	12,4 ± 1,1	411,4 ± 48,9	26
<b>47, n = 3</b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	165,8 ± 12,8	0,3 ± 0,03	195,4 ± 23,1	<b>490</b>

Полученные результаты показали, что пиперидиновый, 4-метилпиперидиновый и 4-алкил- или -гидроксиалкилзамещенный пиперазиновый цикл могут быть более предпочтительными, чем морфолиновые, азепановые или 4-бензилзамещенные пиперазиновые группы. Таким образом, мы подтвердили, что длина линкера сильно влияет на токсичность. Производные пиперидина, 4-метилпиперидина, N-этилпиперазина и азепана были наименее токсичными с длиной линкера  $n \geq 2$  по сравнению с соединениями, у которых  $n \geq 1$  или 3,4 (таблицы 3-6).

**Таблица 7.** Противовирусная активность синтезированных производных (+)- и (-)-изоборнеола.

Вещ-во, n	R	CC50 (мкМ)	IC50 (мкМ)	GPE	SI
<b>48</b>	H	80,5 ± 9,9	2,9 ± 0,3	28	3,99
<b>49</b>	CH <sub>3</sub>	34,1 ± 4,0	3,1 ± 0,3	11	4,36
<b>50</b>	H	89,5 ± 8,0	3,6 ± 0,3	25	3,72
<b>51</b>	CH <sub>3</sub>	34,1 ± 2,7	4,4 ± 0,4	8	4,36

Сравнение соединений с одинаковыми заместителями **9-18**, **48** и **50**, (+)- и (-)-изоборнеола **49** и **51** показали более низкие значения IC<sub>50</sub>, чем производные (-)-борнеола **9** и **14**. Однако, производные (+)- и (-)-изоборнеола были более токсичными, чем аналоги в серии (-)-борнеола.

В ряду соединений **52-54**, **61-63** все исследованные соединения обладали противовирусной активностью от хорошей до отличной, со значениями IC<sub>50</sub> от 0,6 до 27 мкМ, и пять из них имели значения SI более 100 (таблица 8).

**Таблица 8.** Ингибирующая активность производных (-)-изоборниламина.

Вещ-во, n	Y	CC50 (мкМ)	IC50 (мкМ)		SI
			GPE	VSV-G	
<b>52, n =1</b>	O	838,1 ± 71,2	5,7 ± 0,7	838,1 ± 74,6	<b>147</b>
<b>53, n =2</b>	O	312,5 ± 37,8	22,1 ± 2,2	312,5 ± 21,9	14
<b>54, n =3</b>	O	171,8 ± 21,1	9,4 ± 0,7	171,8 ± 10,3	18
<b>55, n =1</b>	NCH <sub>3</sub>	853,3 ± 101,5	13,3 ± 1,1	853,3 ± 42,7	64
<b>56, n =2</b>	NCH <sub>3</sub>	485,6 ± 55,4	2,6 ± 0,3	485,6 ± 19,4	<b>187</b>
<b>57, n =3</b>	NCH <sub>3</sub>	474,7 ± 51,7	2,5 ± 0,3	474,7 ± 21,4	<b>191</b>
<b>58, n =1</b>	NC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	660,2 ± 71,3	8,5 ± 0,8	660,2 ± 30,4	78
<b>59, n =2</b>	NC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	564,9 ± 49,7	0,6 ± 0,04	564,9 ± 49,7	<b>908</b>
<b>60, n =3</b>	NC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	268,2 ± 17,9	2,1 ± 0,14	268,2 ± 23,6	<b>129</b>
<b>61, n = 1</b>	CHCH <sub>3</sub>	78,0 ± 6,9	27,0 ± 1,6	78,0 ± 6,9	2,9
<b>62, n = 2</b>	CHCH <sub>3</sub>	93,6 ± 10,0	2,6 ± 0,1	93,6 ± 7,3	36
<b>63, n = 3</b>	CHCH <sub>3</sub>	141,6 ± 14,3	3,4 ± 0,3	141,6 ± 12,7	41

Для соединений **55-57** наблюдается увеличение токсичности с увеличением длины линкера, тогда как для производных 4-метилпиперидина наблюдалось снижение токсичности с увеличением длины линкера.

**Таблица 9.** Ингибирующая активность производных изоборнеола.

Вещ-во, n	Het	CC50 (мкМ)	IC50 (мкМ)		SI	SI EBOV
			GPE	VSV-G		
<b>64, n=2</b>		497,2 ± 8,0	0,12 ± 0,04	123,3±4,0	<b>4166</b>	<b>12</b>
<b>65, n=2</b>		941,9±18,8	6,3±0,3	941,9±18,8	<b>150</b>	<b>3,6</b>
<b>66, n=3</b>		2119,3±49,2	473,1 ±11,4	946,1±22,7	4	
<b>67, n=2</b>		447,3±10,7	1,3±0,1	110,9±3,6	<b>357</b>	
<b>68, n=3</b>		148,5±5,4	67,5±2,7	-	<b>2</b>	
<b>69, n=2</b>		860,1±22,4	0,6±0,2	934,9±26,2	<b>1433</b>	<b>10</b>

## Продолжение Таблицы 9

70, n=2		721,4±14,4	112,5±3,6	360,7±10,8	6	
---------	---	------------	-----------	------------	---	--

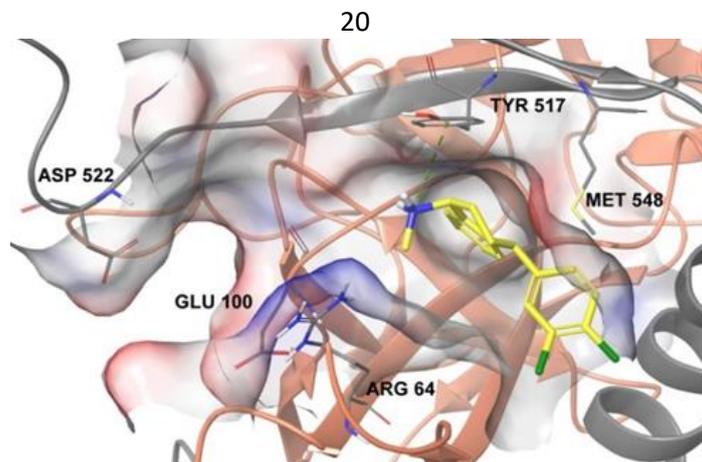
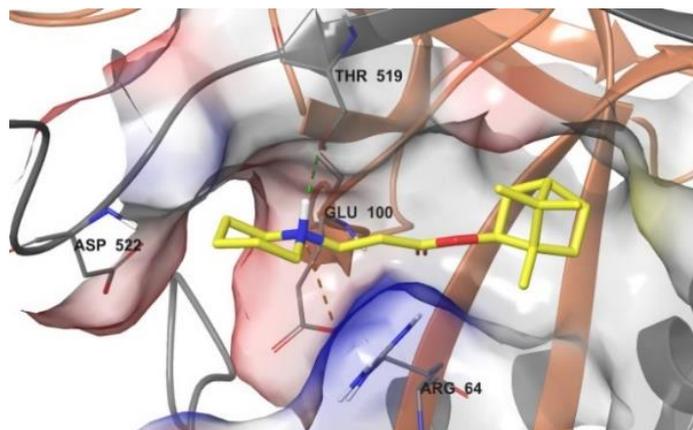
Наиболее эффективными ингибиторами были производные **64** (IC<sub>50</sub> = 0,12 мкМ), **65** (IC<sub>50</sub> = 6,3 мкМ), **67** (IC<sub>50</sub> = 1,3 мкМ) и **69** (IC<sub>50</sub> = 0,6 мкМ), несущие фрагменты пирролидина, пиперидина, 4-метилпиперидина и морфолина, соответственно. При этом аналог **66** с длиной линкера 2 оказался неактивным. Производное **67** не проявляло противовирусной активности и продемонстрировало высокую токсичность (50% цитотоксическая концентрация (CC<sub>50</sub>) = 40,2 мкМ). Производное **64**, содержащее пирролидиновую группу, проявляло хорошую ингибирующую активность (IC<sub>50</sub> = 18,3 мкМ) при низкой токсичности (CC<sub>50</sub> = 230,7 мкМ). Производные **65** и **69** также проявляли умеренную противовирусную активность, но в то же время были достаточно токсичны (CC<sub>50</sub> = 55,9 и 57,5 мкМ) (таблица 9).

### Изучение сайта связывания веществ с поверхностным гликопротеином эболавируса Заир

На основе структурного сходства между производными терпеноидов, использованных в работе, и сертралином было высказано предположение, что они могут взаимодействовать с одним и тем же регионом GP EBOV. Для проверки этой гипотезы был проведен теоретический докинг соединений в регионе взаимодействия сертралина, который известен из результатов рентгеноструктурного анализа (Ren et al., 2018). На основании полученной модели были выявлены ключевые аминокислотные остатки: тирозин в позиции 517, аспарагиновая кислота в позиции 522 и метионин в позиции 548, потенциально участвующие в образовании комплекса с производными терпеноидов (рисунок 9).

Основываясь на результатах молекулярного докинга, при помощи сайт-направленного мутагенеза были получены три рекомбинантных плазмиды: phGPEdMLDEbov517, phGPEdMLDEbov522, phGPEdMLDEbov548, содержащие варианты гена GP с заменами аминокислот в позиции Y517, D522 и M548. Схема их получения аналогична представленной на рисунке 1. Для этого получали два ПЦР фрагмента, перекрывающихся в области нуклеотидной замены. Затем проводили отжиг ампликонов с последующей ПЦР-амплификацией с использованием фланкирующих олигонуклеотидных праймеров. Полученный продукт клонировали в составе вектора phGP.

С использованием полученных плазмид на основе системы псевдотипирования ВВС были получены псевдовirusы с тремя вариантами GP, несущими замены на остаток аланина в положениях 517, 522 и 548.

**А****Б**

**Рисунок 9.** Модель взаимодействия низкомолекулярных соединений с участком GP EBOV. А – сертралин; Б - (1S,4S)-1,7,7-триметилбicyclo [2.2.1]гептан-2-ил-3-(4-метилпиперидин-1-ил)пропаноат. Моделирование проведено Баевым Д.С.

Полученные частицы были использованы для сравнительного анализа ингибирующей активности веществ, в качестве контроля использовали вариант GP без мутаций. Были проанализированы соединения: **10**, **15**, **26**, **16** и **24**, с длинными линкерами; и два (+) -камфорамида, **53** и **61**.

В противовирусном анализе значения IC<sub>50</sub> соединения **10** по отношению к GPY517A и GPM548A составляли 3,7 и 47,1 мкМ (таблица 10). Наблюдалось 20-кратное увеличение значения IC<sub>50</sub> для GPM548A по сравнению с таковым для GP. Напротив, наблюдалась аналогичная способность **10** ингибировать GP и мутант GPD522A (IC<sub>50</sub> 1,7 и 2,2 мкМ). Аналогичные результаты наблюдались для соединения **15**, где было обнаружено более чем 30-кратное увеличение значения IC<sub>50</sub> для GPM548A по сравнению с наблюдаемым для GP. Ингибирующая активность производных **16** и **24** в отношении всех мутантных псевдотипированных вирусных частиц и GP была различной. Для агента **16** наблюдали более чем 20-кратное снижение значения IC<sub>50</sub> в отношении мутантных вирусных частиц, псевдотипированных GPY517A и GPD522A (IC<sub>50</sub> 0,4 мкМ), по сравнению с наблюдаемым для GP (IC<sub>50</sub> 9,3 мкМ). Для производного **24** было отмечено более чем 20-кратное увеличение значения IC<sub>50</sub> для всех мутантных псевдотипированных вирусных частиц по сравнению с наблюдаемым для GP.

**Таблица 10.** Ингибирующая активность производных (-)-борнеола против различных вариантов GP.

Вещ-во	IC50 (мкМ)			
	GP	GPY517A	GPD522A	GPM548A
<b>10</b>	1,7 ± 0,2	3,7 ± 0,4	2,2 ± 0,3	47,1 ± 6,1
<b>15</b>	0,3 ± 0,03	48,1 ± 4,8	4,9 ± 0,5	112,2 ± 14,7
<b>16</b>	9,3 ± 0,8	0,4 ± 0,03	0,4 ± 0,04	1,2 ± 0,2
<b>24</b>	0,6 ± 0,1	18,3 ± 2,2	18,3 ± 1,9	12,2 ± 1,4
<b>26</b>	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,1	0,5 ± 0,04	1,0 ± 0,1
<b>53</b>	22,1 ± 2,7	173,1 ± 11,8	17,7 ± 1,4	65,2 ± 5,8
<b>61</b>	27,0 ± 1,9	1,7 ± 0,2	11,6 ± 0,8	44,2 ± 3,4

Ингибирующая активность соединения **26** в отношении мутантных псевдотипированных вирусных частиц немного отличалась от противовирусной активности в отношении GP. Значения IC50 амида **53** против GP и мутанта GPD522A были почти одинаковыми (IC50 22,1 и 17,7 мкМ), тогда как значения IC50 против GP и мутантов GPY517A, GPM548A существенно отличается. Для производного **61** значительная разница наблюдалась только для мутации Y517A.

Наблюдаемая разница в активности соединений для различных вариантов GP (с заменами в позициях Y517, D522 и M548) позволяет утверждать, что исследованные соединения действительно проявляют активность за счет взаимодействия с сайтом взаимодействия сертралина.

### ВЫВОДЫ

1. Разработаны плазмиды, обеспечивающие получение функциональных лентивирусных и рабдовирусных частиц, псевдотипированных полноразмерными и делеционными GP филовирсов.
2. Полученные вирусоподобные частицы обладают трансдуцирующей активностью в диапазоне от 4,5 до 6,5 ОЛЕ. Псевдовирсы на основе лентивирусов имеют шарообразную форму и размер 80-90 нм, псевдовирсы на основе вируса везикулярного стоматита сохраняют типичную морфологию рабдовирусных частиц, размер 90-130 нм. При этом поверхностный белок GP сохраняет антигенные свойства.
3. Использование псевдовирсов в качестве иммуногена обеспечивает индукцию антител, нейтрализующих эболавирус. В группе кур, иммунизированных смесью лентивирусных и рабдовирусных частиц, титр нейтрализующих антител достиг 1:4096.
4. С использованием псевдовирсных систем проведено исследование противовирусной активности 70 соединений - производных полусинтетических терпеноидов (на модели одноциклового псевдовирсной инфекции). Обнаружены соединения, относящиеся к N-гетероциклическим производным сложных эфиров борнеола, специфически ингибирующие проникновение псевдовирса с поверхностным белком эболавируса в клетку. Наиболее активным является гидрохлорид (1S,4S)-1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-ил-3-(4-метилпиперидин-1-ил)пропаноат, его полуингибирующая концентрация составляет

$0,8 \pm 0,06$  мкМ, при индексе селективности равном 112 для псевдовирусов и 31 в случае натурального вируса, что отражает его сравнительно низкую токсичность.

5. Показано что исследованные вещества ингибируют проникновение псевдовирусов за счет взаимодействия с областью поверхностного гликопротеина эболавируса Заир включающего аминокислотные остатки тирозина в позиции 517, аспарагиновой кислоты в позиции 522 и метионина в позиции 548 с которой так же взаимодействует сертралин.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК

1. Соколова А.С., Баранова Д.Б., Яровая А.В., Баев Д.С., Полежаева О.А., **Зыбкина А.В.**, Щербаков Д.Н., Толстикова Т.Г., Салахутдинов Н.Ф. Синтез производных (1S)-(+)-камфора-10-сульфоукислоты и изучение их противовирусной активности в качестве ингибиторов филовирусных инфекций *in vitro* и *in silico* // Известия академии наук. Серия химическая. – 2019. – Т.68. – №5. – С.1041-1046.
2. Sokolova A.S., Yarovaia O.I., **Zybkina A.V.**, Mordvinova E.D., Shcherbakova N.S., Zaykovskaya A.V., Baev D.S., Tolstikova T.G., Shcherbakov D.N., Pyankov O.V., Maksyutov R.A., Salakhutdinov N.F. Monoterpenoid-based inhibitors of filoviruses targeting the glycoprotein-mediated entry process // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2020. – V. 207. – P. 112726.
3. Полежаева О.А., **Зыбкина А.В.**, Зайковская А.В., Пьянков О.В., Пьянков С.А., Семенова А.В., Кочнева Г.В., Щербаков Д.Н. Получение иммуноглобулинов класса Y, нейтрализующих вирус Марбург // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2020. – №. 4. – С. 86-91.
4. Volkova N.V., O.V. Pyankov, A.V. Ivanova, A.A. Isaeva, **A.V. Zybkina**, E. I. Kazachinskaya, D.N. Shcherbakov. Prototype of a DNA vaccine against the Marburg virus // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2021. – P. 475-478.
5. Sokolova A.S., Putilova V.P., Yarovaia O.I., **Zybkina A.V.**, Mordvinova E.D., Zaykovskaya A.V., Shcherbakov D.N., Orshanskaya I.R., Sinigubova E.O., Esaulkova I.L., Borisevich S.S., Bormotov N.I., Shishkina L.N., Zarubaev V.V., Pyankov O.V., Maksyutov R.A., Salakhutdinov N.F. Synthesis and Antiviral Activity of Camphene Derivatives against Different Types of Viruses // *Molecules*. – 2021. – V. 26. – P. 2235.

### Патенты

1. «Применение гидрохлорида (1s,2r,4s)-1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-ил 3-(пиперидин-1-ил)-пропионата в качестве ингибитора вируса эбола» О.И. Яровая, А.С. Соколова, Д.Н. Щербаков, **А.В. Зыбкина**, А.В. Зайковская, О.В. Пьянков, Р.А. Максютков. Заявка 2019109597, приоритет от 01.04.2019, Патент RU 2 697 716 , Бюл. № 23, опубликовано: 19.08.2019.
2. «Универсальный интеграционный вектор pVEAL и рекомбинантная плазмида pVEAL -15742, обеспечивающая синтез и секрецию scFv-Fc антител ADI-15742 против вируса Эбола в клетках млекопитающих и полученная с использованием вектора pVEAL» Исаева А.А., Несмеянова В.С., **Зыбкина А.В.**, Щербаков Д.Н., Шаньшин Д.В., Волкова Н.В. Заявка №2020136988, приоритет от 10.11.2020, Патент RU 2 749 459 , Бюл. №17, опубликовано: 11.06.2021.
3. «N-гетероциклические производные (1S)-(+)-камфора-10-сульфоукислоты, используемые в качестве ингибиторов вируса Эбола» Баранова Д.В., Соколова А.С., Яровая О.И., Щербаков Д.Н., **Зыбкина А.В.**, Зайковская А.В., Пьянков О.В., Максютков Р.А., Салахутдинов Н.Ф. Заявка №2020124853, приоритет от 17.07.2020, Заявка на изобретение RU 2020 124 853, Бюл. №2, опубликовано: 19.01.2022.