



На правах рукописи

Чистов Алексей Александрович

**Амфифильные производные перилена – фотосенсибилизаторы
с противовирусной активностью широкого спектра**

1.4.9 – БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Лаборатории молекулярного дизайна и синтеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель:

Коршун Владимир Аркадьевич, доктор химических наук

Официальные оппоненты:

Иванов Александр Владимирович, доктор биологических наук, заведующий Лабораторией биохимии вирусных инфекций, заместитель директора Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва

Зарубаев Владимир Викторович, доктор биологических наук, заведующий Лабораторией экспериментальной вирусологии Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии имени Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук

Защита состоится «22» октября 2025 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН) по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ ИБХ РАН и на сайте института www.ibch.ru/about/disser/theses

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Вспышки вирусных заболеваний, особенно вызываемых новыми штаммами, всё ещё представляют значительную проблему для человечества. Разработка вакцин или терапевтических препаратов против конкретных штаммов является длительным процессом. Санитарно-эпидемиологические мероприятия способны замедлить распространение инфекции, но для терапии уже заболевших нужны лекарства. Одной из перспективных современных концепций является разработка противовирусных препаратов широкого спектра, которые могли бы быть быстро одобрены/перепрофилированы для борьбы с новыми штаммами/вирусами. Такая концепция возрождает интерес к препаратам с альтернативными мишенями и механизмами действия. Более 75% опасных для человека вирусов являются оболочечными (*enveloped*), т.е. имеют внешнюю оболочку на основе липидного бислоя, образующуюся из клеточных липидов при созревании вириона в клетке. Липиды оболочки вирионов не кодируются в вирусном геноме, кроме того, у вирионов отсутствуют системы репарации. Поэтому липид-таргетирующие препараты, повреждающие оболочку вириона и нарушающие её слияние с клеточной мембраной: 1) будут проявлять активность в отношении всех оболочечных вирусов; 2) исключают выработку резистентности к ним в результате мутаций в вирусном геноме. Разумеется, кроме этих достоинств, у таких препаратов будут серьёзные ограничения, в частности, фотосенсибилизаторы могут действовать лишь в присутствии света и кислорода. Работа посвящена как раз разработке мембрано-активных фотосенсибилизаторов с широким спектром противовирусной активности. Исследование таких препаратов актуально для создания новых методов противовирусной терапии, способных эффективно дополнить арсенал методов борьбы с вирусными заболеваниями человека и животных.

Цель работы и задачи исследования. Пентациклический ароматический углеводород перилен представляет собой флуоресцентное фотостойкое соединение, для производных которого неожиданно была обнаружена противовирусная активность. Целью работы являлось получение библиотеки амфифильных производных перилена и изучение их противовирусных свойств в контексте подтверждения широкого спектра действия и изучения механизма противовирусной активности для этого класса соединений. Для достижения поставленной цели предполагалось решение следующих задач:

1. Синтез исходных 3- и 2-этинильных производных перилена. Получение серий амфифильных периленовых производных (нуклеозидных, урацильных, фенольных) с помощью реакции Соногаширы, азид-алкинового циклоприсоединения и других реакций.
2. Скрининг противовирусной активности полученных соединений на оболочечных вирусах различных семейств, анализ результатов и изучение связи структуры соединений с их биологической активностью.
3. Исследование спектральных, физико-химических и фотохимических свойств (УФ-спектры, спектры флуоресценции и возбуждения, растворимость, измерение скорости/квантового выхода фотогенерации синглетного кислорода) полученных производных.
4. Изучение механизма противовирусной активности в контрольных экспериментах по ингибированию проникновения вируса в клетку, его прямого ингибирования (оценка вируслицидного действия), а также оценка смежных факторов, сопутствующих инфицированию (содержание вируса внутри клетки, синтез вирусных белков и т.д.)
5. Изучение влияния освещения на противовирусный эффект. Оценка протекторного действия различных ловушек синглетного кислорода.

Научная новизна и практическая значимость работы. В данной работе было получено более 50 новых амфифильных противовирусных производных перилена, а также новые функциональные периленовые производные: 2-этинилперилен, 3-(триметилсилилбутадинил)перилен и 3-[(4-триметилсилилэтинилфенил)этинил]перилен. Были улучшены подходы к оптимизации и масштабированию синтеза по реакции Соногаширы, в том числе для малорастворимых субстратов, а также к получению периленсодержащих амидов и продуктов азид-

алкинового циклоприсоединения. Впервые был проведен скрининг противовирусной активности для данного класса соединений на оболочечных вирусах: клещевого энцефалита, коронавируса SARS-CoV-2 и FPIV, гриппа А, парагриппа, респираторно-синцитиального, желтой лихорадки, Чикунгунья, африканской чумы свиней. Впервые была проведена оценка скорости и квантового генерации синглетного кислорода для данного класса соединений, а также были проведены эксперименты по изучению влияния интенсивности и длительности освещения на генерацию синглетного кислорода и связанную с ней противовирусную активность. Была осуществлена визуализация производных перилена в структурах клеток, а также наглядно показано разрушение вириона под действием производного перилена и освещения.

Практическая значимость данной работы заключается в том, что получен новый класс амфифильных производных перилена с активностью широкого спектра в отношении ряда оболочечных вирусов различных семейств. Данные соединения действуют как ингибиторы слияния мембран вириона и клетки. Полученные данные о механизме действия данного класса соединений позволяют проводить разработку и оптимизацию новых фотосенсибилизаторов для терапии вирусных заболеваний, в том числе вызываемых новыми оболочечными вирусами. Дальнейшие фундаментальные исследования позволят уточнить механизм окислительного повреждения вириона и его роль в ингибировании репродукции оболочечных вирусов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработаны и синтезированы противовирусные алкинильные производные перилена на основе нуклеозидов, 1-урацил-уксусной кислоты, а также редуцированные производные на основе урацила и производные «фенольного типа».
2. Проведен скрининг противовирусной активности на оболочечных вирусах: клещевого энцефалита (TBEV), простого герпеса (HSV-1), коронавирусе SARS-CoV-2, гриппа А (IAV), желтой лихорадки (YFV), Чикунгунья (CHIKV), парагриппа (HPIV), респираторно-синцитиальном (RSV), африканской чумы свиней (ASFV) и кошачьего инфекционного перитонита (FIPV). Во большинстве случаев соединения показали субмикромольную активность с высоким терапевтическим индексом (ТИ > 1000).
3. Для всех уникальных сопряженных периленилалкинил(гет)арильных получены данные по спектральным свойствам, таким как УФ-спектры и спектры флуоресценции. Был изучен сольватохромный эффект в различных средах, а также на основании данных экспериментов разработана методика определения растворимости соединений в водных растворах DMSO.
4. Проведено измерение скорости генерации синглетного кислорода, а также ее квантового выхода с использованием различных ловушек: DMA, SOSG и DPBF. Показано, что все протестированные соединения генерируют синглетный кислород в растворе при освещении.
5. На вирусах TBEV, ASFV и SARS-CoV-2 проведено изучение влияния противовирусных производных на разные стадии жизненного цикла вируса, в т.ч. зависимость титра вируса от времени добавления «time-of-addition», вирулицидное действие, предынкубация вируса с клетками с последующей отмывкой, а также эксперименты на разных стадиях интернализации. Результаты показали, что производные перилена обладают мощным вирулицидным действием, при этом также могут оказывать эффект за счёт предварительной сорбции на клеточную мембрану. Через несколько часов после заражения соединения способны оказывать только вторичный эффект, если не осуществляется их отмывка из среды. Показана локализация флуоресцентных производных перилена в структурах клеток, а также разгорание их флуоресценции в липосомах, что позволяет наблюдать различную аффинность соединений к цитоплазматической мембране клетки.
6. Эксперименты по контролю противовирусной активности в зависимости от освещения показывают, что принудительное освещение большей интенсивности, а также увеличение времени экспозиции увеличивает противовирусную активность и цитотоксичность амфи-

фильных периленовых фотосенсибилизаторов. Наблюдается вариация результатов в зависимости от природы соединений и типа клеток – предположительно, больший фотосенсибилизационный эффект оказывают соединения, которые лучше растворяются в липидной мембране. Показано протекторное действие в присутствии ловушек синглетного кислорода – азида натрия и α -токоферола. С помощью просвечивающей электронной микроскопии с негативным окрашиванием была показана наглядная дозозависимая деградация вириона при действии периленового соединения и освещения, при этом наличие α -токоферола оказывало протекторное действие.

Личный вклад автора. Основные результаты получены лично автором или при его непосредственном участии под руководством д.х.н., зав. лаб. молекулярного дизайна и синтеза Коршуна В.А. и при взаимодействии с коллегами. Личный вклад автора заключается в непосредственном участии в выборе направления научной работы, разработке цели и задач исследования по теме диссертационной работы. Автор разрабатывал методы и осуществлял синтез и очистку производных перилена от исходного углеводорода до конечных амфифильных продуктов, анализировал данные по физико-химическим характеристикам веществ (интерпретировал масс-спектры, спектры ЯМР), проводил спектральные исследования полученных соединений (спектры поглощения и флуоресценции), а также участвовал в написании и подготовке к публикации статей и тезисов докладов на научных конференциях по результатам исследования. Кроме результатов автора, в работе были использованы экспериментальные данные, полученные в других лабораториях и в рамках научного сотрудничества с другими организациями: университетом Альберты и Корнелльским университетом (Л. Шанг и др.), НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева (А.А. Штро и др.), Институтом молекулярной биологии Армении (Х. Закарян и др.), Ветеринарным институтом в Брно (Д. Ружек, Л. Эйр и др.), Центром им. М.П. Чумакова (Д.И. Осолодкин, Л.И. Козловская и др.), МГУ им. М.В. Ломоносова (Е.А. Ширшин, А.А. Рубекина, Д.А. Гвоздев, Е.В. Радченко и др.), ИБХ РАН (С.П. Чумаков и др.).

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на Международной междисциплинарной научной конференции «Биологически активные вещества и материалы» (27 мая – 1 июня 2013, Новый Свет, Крым), V International Conference «Chemistry, Structure and Function of Biomolecules» (4–6 June, 2014, Minsk), Международной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 55-летию Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова, (15–19 сентября 2014, Москва), 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry (5–10 July, 2015, Novosibirsk), Втором междисциплинарном симпозиуме по медицинской, органической и биологической химии (27–30 сентября 2015, Новый Свет, Крым), XXII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (18–22 July, 2016, Paris, France), Международной конференции «Химическая биология», посвящённой 90-летию академика Д.Г. Кнорре (24–28 июля 2016, Новосибирск), XXIX Зимней молодёжной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (7–10 февраля 2017, ИБХ, Москва), 30th International Conference of Antiviral Research (ICAR) (21–25 May, 2017, Atlanta, GA, USA), Третьем Междисциплинарном Симпозиуме по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике (МОБИ-ХимФарма2017, 28–31 мая 2017, Севастополь), 254th American Chemical Society National Meeting (20–24 August, 2017, Washington, DC, USA), XXX Зимней молодёжной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (12–15 февраля 2018, ИБХ, Москва), V Всероссийская конференции по органической химии (10–14 сентября 2018, Владикавказ), Четвёртом Междисциплинарном Симпозиуме по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике (МОБИ-ХимФарма2018, 23–36 сентября 2018, Новый Свет, Крым), Markovnikov Congress on Organic Chemistry (21–28 June, 2019, Moscow–Kazan), Всероссийской мультikonференции «Биотехнология – медицине будущего» (29 июня–2 июля 2019, Новосибирск), V Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и

фармакологии» (МОБИ-ХимФарма2019, 15–18 сентября 2019, Судак, Крым), Всероссийской конференции «Синтетическая биология и биофармацевтика» (24–28 июля 2022, Новосибирск), Восьмой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (МОБИ-ХимФарма2023, 24–27 апреля 2023, Санкт-Петербург), конференции «Современные проблемы фотобиологии» (10–17 сентября 2023, Шепси, Краснодарский край), Всероссийской конференции по люминесценции (LUMOS-2024, 23–26 апреля 2024, МГУ, Москва), Десятой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (МОБИ-ХимФарма2025, 22–24 апреля 2025, Санкт-Петербург).

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа изложена на 197 страницах и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 274 ссылки. Диссертация содержит 48 рисунков, 15 схем и 12 таблиц.

Публикации. По материалам работы опубликовано 17 статей в международных рецензируемых журналах и 31 тезис докладов на научных конференциях и симпозиумах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Синтез алкинильных производных перилена

В основе получения новых противовирусных производных лежало получение производных перилена с жёстким линкером и функциональной группой для последующей интеграции в молекулы нуклеозидов и других производных. Разработана улучшенная трёхстадийная методика синтеза 3-этинилперилена (**4**), а пятистадийный синтез ранее не описанного 2-этинилперилена (**9**) (Схема 1). Во втором случае последовательное ацетилирование по Фриделю-Крафтсу, формилирование по Вильсмайеру-Хааку-Арнольду и щелочное элиминирование по Бодендорфу было дополнено стадиями гидрирования и дегидрирования для изменения положения электрофильного замещения в синтезе 2-этинилперилена (**9**).

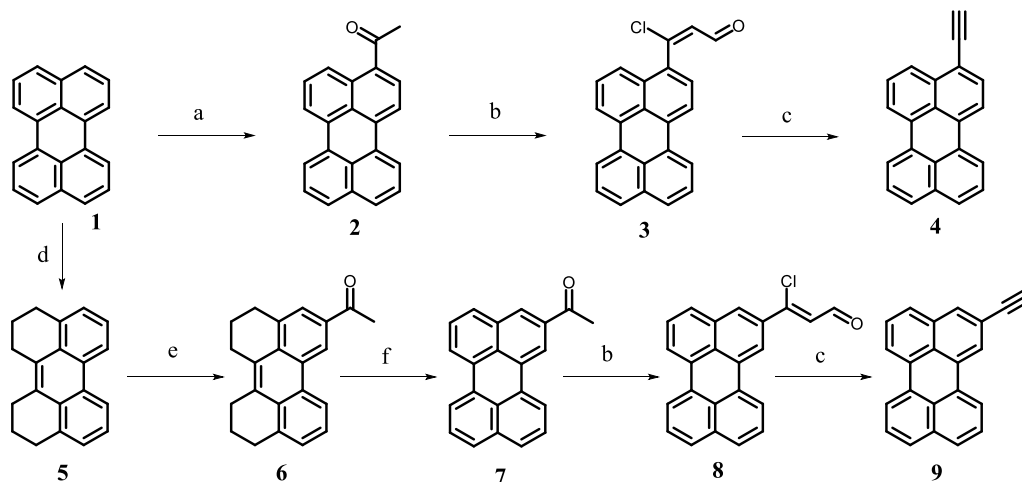


Схема 1. Синтез 3- и 2-этинилперилена. Условия: (a) AcCl , $\text{AlCl}_3/\text{CH}_3\text{NO}_2$, хлорбензол, $40\text{--}50^\circ\text{C}$, **2** – 91%; (b) POCl_3 , DMF, 25°C , **3** – 66%, **8** – 68%; (c) KOH , изопропанол/толуол, кипячение, **4** – 92%, **9** – 79%; (d) H_2 , 10% Pd/C , 17 бар, 60°C , 71%; (e) AcCl , AlCl_3 , CH_2Cl_2 , 0°C , 87%; (f) DDQ, толуол, кипячение, 62%.

Также на основе 3-этинилперилена были получены удлиненные алкинильные производные: 3-(триметилсилилбутадиинил)перилен (**10**) и 3-[(4-триметилсилилэтинилфенил)этинил]перилен (**13**) (Схема 2). В первом случае использовался подход в виде кросс-реакции Глазера, тогда как фенилендиинное производное **13** было получено последовательным этинилированием по Соногашире, с использованием последовательной модификации реакционных сайтов 4-иодфенола.

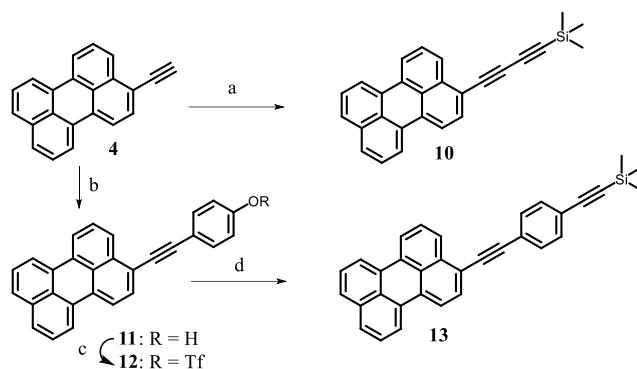


Схема 2. (a) TMS-ацетилен, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, CuI, TMEDA, DMF, 25°C, воздух, 49%; (b) 4-йодфенол, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, CuI, NEt_3 , DMF, 80°C, аргон, 76%; (c) Tf_2O , NEt_3 , 0→25°C, 80%; (d) TMS-ацетилен, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, CuI, NaI, DMF, 25°C, аргон, 64%.

Синтез периленовых нуклеозидных производных

На основе полученных алкинильных производных синтезирован ряд нуклеозидов. Основной подход к синтезу нуклеозидов – галогенирование пиримидинового нуклеозида в положение 5, введение защитных групп (силильных или ацильных), сочетание по Соногашире с соответствующим алкинильным производным, очистка гидрофобного промежуточного производного, удаление защитных групп и получение амфифильных нуклеозидов.

По вышеописанной методике проведен и масштабирован синтез референсного нуклеозидного производного **aUY11 (18)** (Схема 3).

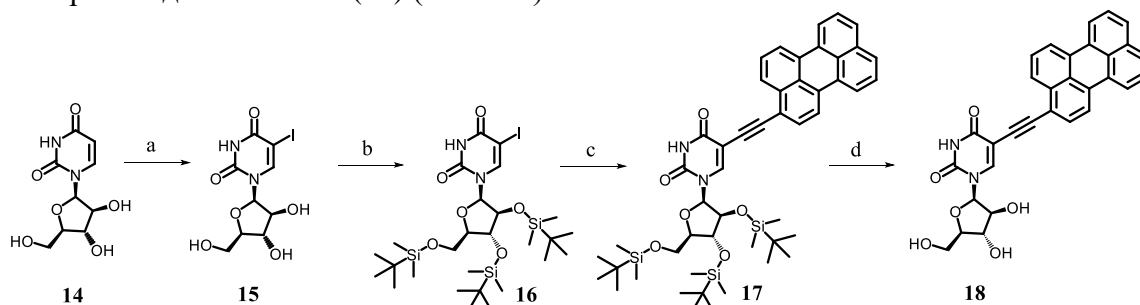


Схема 3. Синтез 5-(перилен-3-илэтинил)-арабино-уридина (**aUY11**). Условия: (a) I_2 , CAN, AcOH, 80°C, 82%; (b) TBDMS-Cl, имидазол, DMF, 25°C, 83%; (c) 3-этинилперилен, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CuI, NEt_3 , DMF, 25°C, аргон, 88%; (d) $\text{NEt}_3 \cdot 3\text{HF}$, THF, 90%.

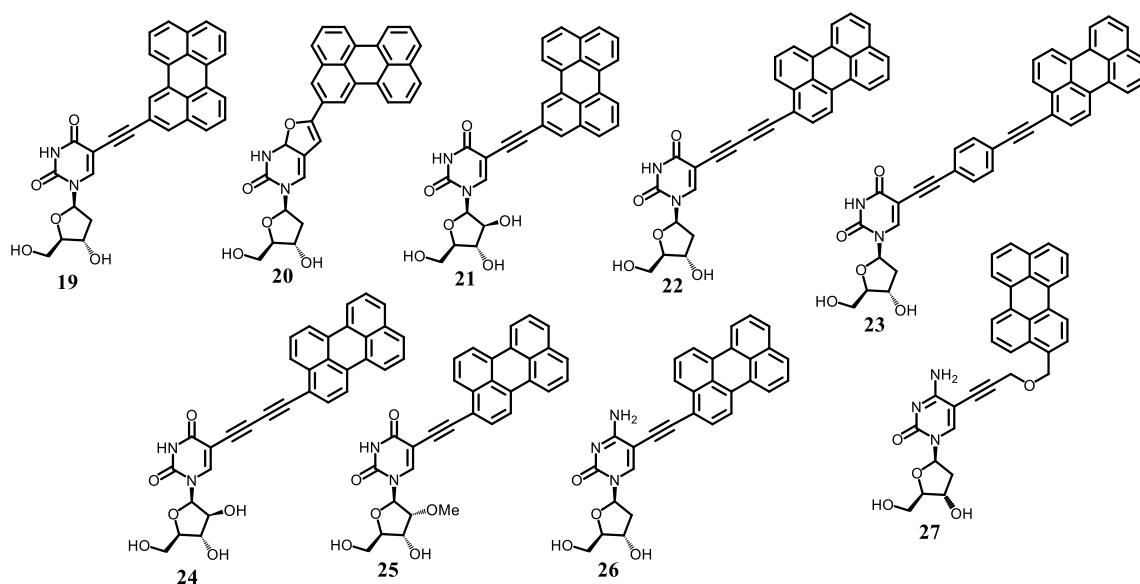


Рис. 1. Нуклеозидные амфифильные производные перилена.

Также получены две основные серии новых нуклеозидов (**19–27**): на основе изменённой гидрофобной и гидрофильной части (Рис. 1).

Синтез ненуклеозидных производных перилена на основе 1-урацилуксусной кислоты

Используя вышеописанный подход для нуклеозидных соединений, получены производные на основе урацил-1-уксусной кислоты, замещённой в положение 5 остатком 3-этинилперилена, по аналогии с ранее полученными нуклеозидами. В качестве защитных групп первоначально были использованы: *трет*-бутильная для карбоксильной группы, пивалоилоксиметильная (Pom) – по положению 3 урацила. Для предотвращения алкилирования полиароматического ядра приходилось удалять *трет*-бутильную защиту до сочетания с этинилпериленом. В другой серии Pom-защита была редуцирована до неудаляемого метильного фрагмента. Таким образом были получены две исходные кислоты **32** и **37**, доступные для дальнейшей первичной (получение амидов) и вторичной (CuAAC, «клик-реакция») дериватизации. Из большинства Pom-производных путем щелочного удаления защитной группы была получена новая серия (кислота **33** и амиды) со свободным положением 3 урацила (Схема 4).

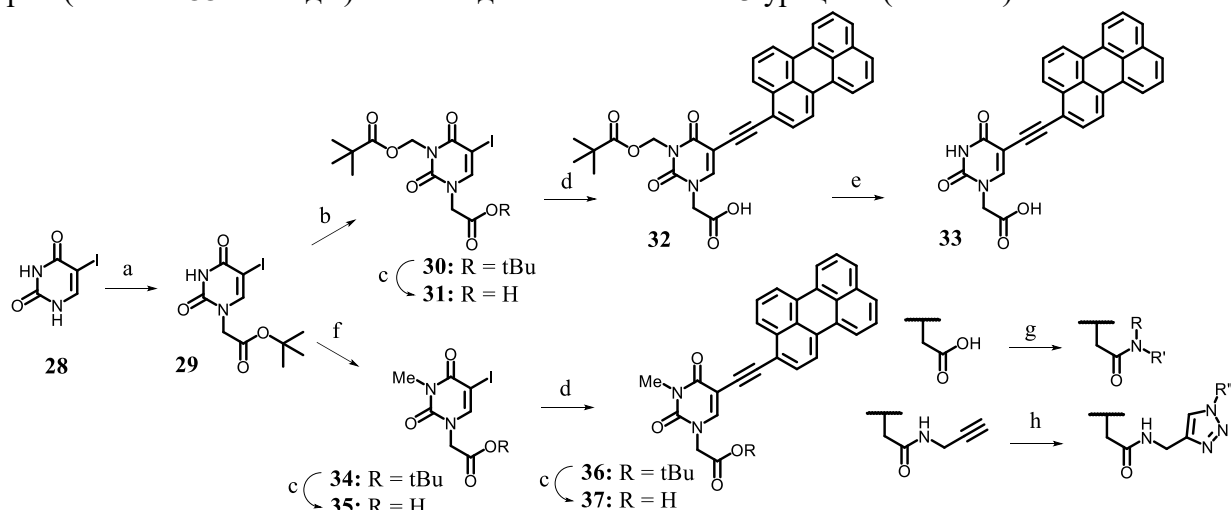
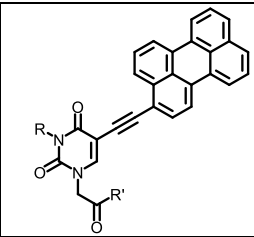
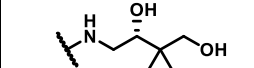
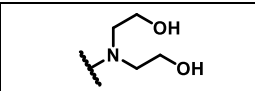
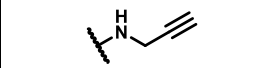
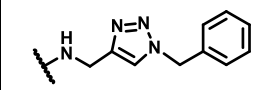
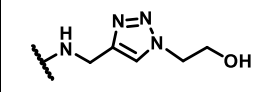
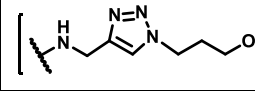


Схема 4. Синтез ненуклеозидных производных перилена. Условия: (а) *трет*-бутиловый эфир бромуксусной кислоты, DIPEA, MeCN/tBuOH, 25°C, 97%; (б) хлорметилпивалат, K₂CO₃, DMF, 25°C, 86%; (с) HCO₂H, 25°C, 90%; (д) 3-этинилперилен, Pd(PPh₃)₄, CuI, NEt₃, DMF, 25°C, аргон, 92%, (е) NaOH (10M водн.), DMSO/MeOH, 25°C, 41%; (ф) MeI, K₂CO₃, DMF, 25°C, 84%; (г) амин, PyBOP, DIPEA, DMF, 25°C, 29–85%; (h) азид, CuSO₄·5H₂O, TBTA, аскорбиновая к-та (водн.), DMSO, 25°C, 38–81%.

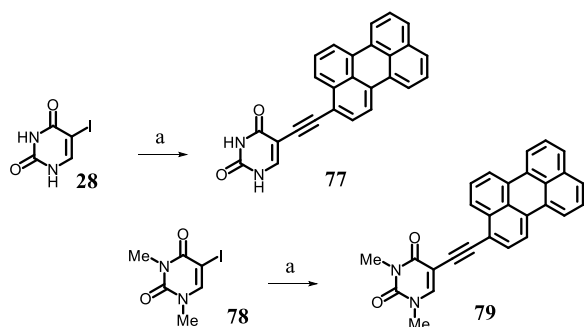
Таким образом были получены обширные серии амидов, всего 43 новых производных (**32**, **33**, **36–76**) (Таблица 1).

Таблица 1. Библиотека амидов 5-(перилен-3-илэтинил)урацил-1-уксусной кислоты.

 R'	R		
	Pom	H	Me
-NHBu	38	53	65
-NH(CH ₂) _n OH			
n = 2	39	54	66
n = 3	40	55	67
n = 4	41	56	68
n = 5	42	57	69
n = 6	43	58	70
	44	59	71

	45	60	72
	46	61	73
	47	62	74
	48	63	75
			
n = 1	49	64	76
n = 2	50	-	-
n = 3	51	-	-
n = 4	52	-	-

Синтез редуцированных производных



При дальнейшей модификации удалось прийти к т.н. редуцированным производным, в которых гидрофильная часть молекулы не просто является ненуклеозидной по своей природе, но значительно упрощена, уменьшена в размере и отличается повышенной гидрофобностью. С одной стороны, такими производными являлись ещё более урезанные производные урацила **77** и **79** (Схема 5).

Схема 5. Синтез редуцированных производных на основе урацила. Условия: (a) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$, CuI , NEt_3 , DMF, 25°C , аргон.

С другой – была синтезирована серия аналогов соединения **11**, которое вопреки ожиданиям также продемонстрировало значительную противовирусную активность, образовав подкласс противовирусных производных «фенольного типа» (**11**, **80–87**) (Рис. 2), полученных полностью аналогично синтезу первого 4-(перилен-3-илэтинил)фенола **11** из этинилпериленов и соответствующих галогенпроизводных фенолов и анилинов.

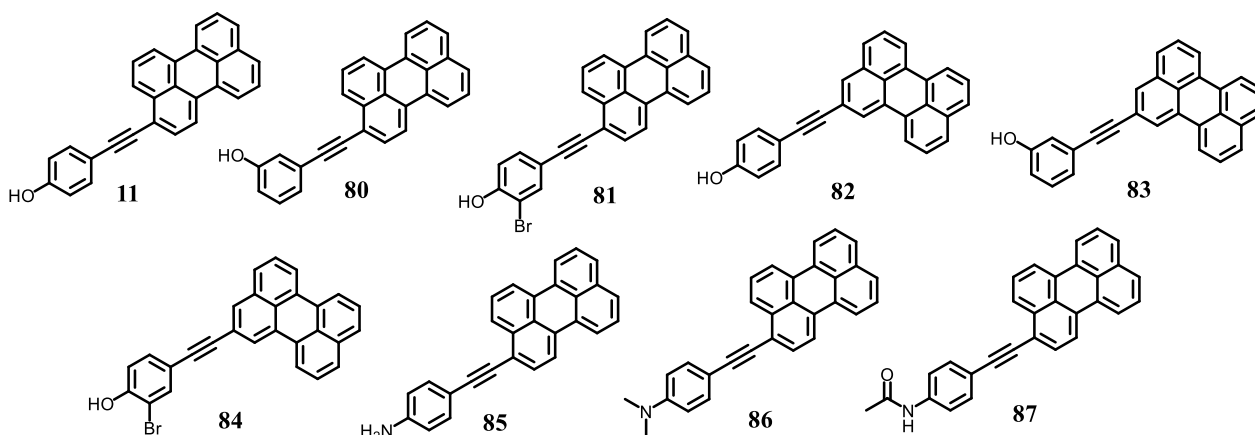


Рис. 2. Производные «фенольного типа».

Противовирусная активность амфифильных производных перилена

Полученные производные, а также ранее известные референсные соединения: 5-(перилен-3-илэтинил)-2'-дезокс-уридин, **dUY11** (**88**) и 3-периленкарбоновая кислота, **C11** (**89**) (Рис. 3) – тестировались в экспериментах *in vitro* на противовирусную активность, а также токсичность по отношению к используемым клеточным культурам, чтобы оценить терапевтический индекс, поскольку ввиду различной природы вирусов, и, соответственно, различных методов оценки противовирусной активности (подсчет числа вирусных бляшек, измерение титра вируса, оценка выживаемости

клеток) данные экспериментов значительно разнятся и зачастую не могут быть сравнены напрямую.

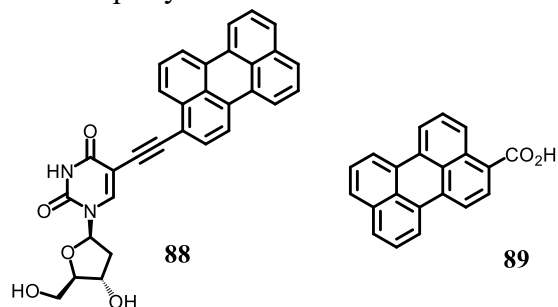


Рис. 3. Противовирусные производные перилена **dUY11** (**88**) и **C11** (**89**).

Основной серией скрининга производных являлось тестирование на вирусе клещевого энцефалита (TBEV). Большинство протестированных соединений показали субмикромольную активность с $TI > 1000$. Вариации структуры не дали чёткой корреляции с активностью, однако, наблюдалась общая положительная тенденция при переходе к нуклеозидным производным; в тоже время были отмечены наиболее активные производные, которые затем использовались в расширенных экспериментах (Таблица 2).

Таблица 2. Противовирусная активность периленовых соединений в отношении вируса клещевого энцефалита (TBEV, штамм Absettarov).

#	EC ₅₀ , μM	CC ₅₀ , μM (PEK)		#	EC ₅₀ , μM	CC ₅₀ , μM (PEK)	
		24 ч	7 д			24 ч	7 д
18	0.018 ± 0.010	> 50	4.4	58	0.0061 ± 0.0024	> 50	> 50
25	0.006 ± 0.002	> 50	> 50	59	0.019 ± 0.003	> 50	> 50
32	0.00121 ± 0.00025	> 50	> 50	60	0.007 ± 0.003	> 50	> 50
33	0.05 ± 0.01	> 50	> 50	61	0.002 ± 0.001	> 50	< 50
36	0.021 ± 0.005	–	18.41	62	0.0081 ± 0.0017	> 50	> 50
37	0.015 ± 0.004	–	> 50	63	0.066 ± 0.013	> 50	> 50
38	0.054 ± 0.003	> 50	> 50	64	0.10 ± 0.05	> 50	37 ± 13
39	0.0021 ± 0.0004	> 50	> 50	65	0.19 ± 0.03	–	37 ± 13
40	0.00043 ± 0.00013	> 50	> 50	66	0.026 ± 0.006	–	> 50
41	0.00069 ± 0.00012	> 50	> 50	67	0.024 ± 0.015	–	> 50
42	0.0016 ± 0.0006	> 50	> 50	68	0.0019 ± 0.0008	–	> 50
43	0.024 ± 0.003	> 50	> 50	69	0.016 ± 0.012	–	> 50
44	0.00079 ± 0.00012	> 50	> 50	70	0.050 ± 0.019	–	> 50
45	0.00044 ± 0.00012	> 50	> 50	71	0.05 ± 0.03	–	> 50
46	0.00097 ± 0.00015	> 50	> 50	72	0.0120 ± 0.0022	–	> 50
47	0.046 ± 0.017	> 50	> 50	73	0.0169 ± 0.0004	–	35
48	0.0010 ± 0.0003	> 50	> 50	74	0.01687 ± 0.00028	–	35
49	0.008 ± 0.001	> 50	18	75	0.013 ± 0.004	–	> 50
50	0.024 ± 0.007	> 50	< 50	76	0.022 ± 0.005	–	> 50
51	0.015 ± 0.001	> 50	< 50	77	0.008 ± 0.002	> 100	37 ± 13
52	0.0033 ± 0.0011	> 50	> 50	79	0.0045 ± 0.0011	–	> 50
53	0.014 ± 0.009	> 50	> 50	86	0.025 ± 0.015	> 100	> 100
54	0.003 ± 0.001	> 50	> 50	87	0.089 ± 0.010	> 100	> 100
55	0.006 ± 0.001	> 50	> 50	88	0.024 ± 0.013	> 50	> 50
56	0.02 ± 0.01	> 50	> 50	89	0.037 ± 0.010	> 50	37 ± 13
57	0.077 ± 0.003	> 50	> 50				

Также был проведен обширный скрининг на вирусах простого герпеса (HSV-1), гриппа А (IAV), коронавирусе SARS-CoV-2, вирусе жёлтой лихорадки (YFV) и Чикунгунья (CHIKV), данные по которым приведены в Таблицах 3,4.

Таблица 3. Противовирусная активность периленовых соединений по отношению к вирусу простого герпеса типа 1 (HSV-1, штамм KOS).

#	EC ₅₀ , μM		CC ₅₀ , μM	
	значение	доверительный интервал	цитостатическая	цитотоксическая
18	0.016	0.012 – 0.02	> 20	> 20
19	0.608	0.429 – 0.864	> 20	> 20
20	1.47	0.827 – 2.584	> 20	> 20
21	0.031	0.02 – 0.047	> 20	> 20
22	0.032	0.025 – 0.041	> 20	> 20
24	0.049	0.036 – 0.066	> 20	> 20
25	0.052	0.04 – 0.069	> 20	> 20

26	1.26	0.779 – 2.045	< 0.6	> 20
27	12.7	8.048 – 21.68	> 20	> 20
32	0.306	0.239 – 0.392	> 20	> 20
33	0.798	0.518 – 1.264	7.5	> 20
38	14.4	9.236 – 23.220	< 0.6	> 20
41	0.02	0.015 – 0.027	0.82	2 < CC ₅₀ < 6
44	0.05	0.038 – 0.065	> 20	> 20
53	0.075	0.053 – 0.106	1.7	6 < CC ₅₀ < 20
56	0.029	0.023 – 0.038	0.82	2 < CC ₅₀ < 6
59	0.06	0.047 – 0.075	9.6	> 20
88	0.043	0.035 – 0.058	> 20	> 20

Таблица 4. Противовирусная активность периленовых соединений по отношению к вирусам желтой лихорадки (YFV, штамм 17D), коронавирусу SARS-CoV-2 (штамм PIK35), вирусу гриппа А (IAV, штамм A/PR/8/34 (H1N1)) и Чикунгунья (CHIKV, штамм Nic).

#	EC ₅₀ , μM				CC ₅₀ , μM	
	YFV	SARS-CoV-2	IAV	CHIKV	Vero	MDCK
18	0.0086 ± 0.0007	< 0.78	5.2 ± 0.4	< 0.78	> 50	894 ± 23
32	0.0041 ± 0.0019	0.15 ± 0.08	0.50 ± 0.02	0.24 ± 0.16	> 50	34 ± 1.9
36	0.0095 ± 0.0017	1.02 ± 0.28	16.4 ± 0.6	0.43 ± 0.10	> 50	> 1943.3
37	0.0049 ± 0.0017	0.06 ± 0.02	3.3 ± 0.4	0.11 ± 0.03	> 50	652 ± 32
38	1.2 ± 0.8	2.55 ± 1.56	4.4 ± 0.4	1.35 ± 0.91	> 50	1321 ± 47
39	0.0025 ± 0.0002	0.07 ± 0.03	> 498	1.1 ± 1.0	> 50	> 1660
40	0.0036 ± 0.0004	0.17 ± 0.13	5.4 ± 0.6	0.13 ± 0.06	> 50	520 ± 56
41	0.016 ± 0.009	0.06 ± 0.02	4.4 ± 0.5	0.19 ± 0.09	> 50	> 1588
42	0.012 ± 0.007	0.09 ± 0.03	230 ± 50	0.17 ± 0.11	> 50	1507 ± 78
43	0.10 ± 0.09	2.37 ± 1.60	5.9 ± 0.8	2.5 ± 2.1	> 50	> 1520
44	0.016 ± 0.011	0.07 ± 0.02	4.7 ± 0.7	0.15 ± 0.04	> 50	994 ± 34
45	0.0052 ± 0.0022	0.05 ± 0.03	1.4 ± 0.3	0.09 ± 0.04	22.8 ± 7.3	852 ± 33
46	0.19 ± 0.14	1.58 ± 0.67	5.0 ± 0.5	0.88 ± 0.75	> 50	1236 ± 65
47	0.36 ± 0.22	3.13 ± 0.86	4.7 ± 0.5	2.3 ± 2.0	> 50	759 ± 11
48	0.028 ± 0.020	0.39 ± 0.22	2.2 ± 0.3	1.5 ± 0.7	> 50	776 ± 35
49	0.11 ± 0.09	0.16 ± 0.05	5.7 ± 0.7	3.0 ± 1.4	> 50	> 1011
65	0.19 ± 0.09	0.63 ± 0.56	5.1 ± 0.3	0.43 ± 0.10	> 50	662 ± 22
66	0.0045 ± 0.0006	0.11 ± 0.04	5.6 ± 0.2	0.38 ± 0.18	> 50	1146 ± 45
67	0.0044 ± 0.002	0.06 ± 0.02	2.9 ± 0.5	0.38 ± 0.18	> 50	931 ± 14
68	0.22 ± 0.06	0.06 ± 0.02	4.5 ± 0.2	0.88 ± 0.75	> 50	1491 ± 89
69	0.0046 ± 0.0006	0.15 ± 0.08	15.3 ± 0.3	1.1 ± 0.7	> 50	1490 ± 23
70	0.05 ± 0.04	1.06 ± 0.76	17.9 ± 1.8	–	> 50	> 1793
71	0.0026 ± 0.0005	0.09 ± 0.05	5.1 ± 0.4	0.88 ± 0.75	> 50	1045 ± 34
72	0.007 ± 0.003	0.02 ± 0.02	3.5 ± 0.7	0.09 ± 0.04	> 50	25.7 ± 2.5
73	0.0013 ± 0.0003	0.27 ± 0.16	2.4 ± 0.4	3.2 ± 0.7	> 50	> 2018
74	0.012 ± 0.003	0.63 ± 0.56	15.9 ± 2.3	–	> 50	> 1590
75	0.009 ± 0.004	0.27 ± 0.10	5.0 ± 0.3	1.1 ± 0.5	> 50	> 1716
76	0.28 ± 0.05	0.10 ± 0.02	3.1 ± 0.5	> 4	> 50	> 1124
77	0.11 ± 0.09	0.16 ± 0.05	5.7 ± 0.7	3.0 ± 1.4	> 50	15.5 ± 1.2
79	0.067 ± 0.003	–	2.2 ± 0.4	–	> 50	243 ± 33
88	–	–	2.7 ± 0.7	–	> 50	492 ± 56

Также были получены данные на вирусах африканской чумы свиней (ASFV), парагриппа (HPIV), альтернативного штамма SARS-CoV-2 из Чехии, а также вирусе кошачьего инфекционного перитонита (FIPV) (Таблицы 5–7, Рис. 4).

Таблица 5. Противовирусная активность периленовых соединений **18**, **32** и **88** в отношении вирусов парагриппа (HPIV-3, штамм v2932) и респираторно-синцитиального вируса (HRSV, штамм A2).

#	EC ₅₀ , μM		CC ₅₀ , μM
	HPIV-3	HRSV	HEp-2
18	1.8 ± 0.2	2.3 ± 0.1	998 ± 59
32	4.3 ± 0.2	1.9 ± 0.1	45 ± 3.4
88	2.2 ± 0.5	1.8 ± 0.2	598 ± 44

Таблица 6. Противовирусная активность производных «фенольного типа» по отношению к коронавирусу SARS-CoV-2 (изолят из пациента 951/2020 в Чехии).

#	EC ₅₀ , μM		CC ₅₀ , μM
	значение	доверительный интервал	
11	0.1203	0.085–0.171	> 10
80	0.05109	0.039–0.067	> 10
81	0.2274	0.150–0.346	> 10
82	0.6138	0.394–0.956	> 10
83	0.3472	0.234–0.514	> 10
84	0.5290	0.165–1.700	> 10

Таблица 7. Противовирусная активность периленовых соединений **18** и **33** в отношении вируса африканской чумы свиней (ASFV, штамм BA71V) на разных культурах клеток.

#	Vero		PAM	
	IC ₅₀ , μM	CC ₅₀ , μM	IC ₅₀ , μM	CC ₅₀ , μM
18	1.6	126.2 ± 8.5	5.8	185.6 ± 10
33	2.3	160.5 ± 10.1	3.6	214.1 ± 5.5

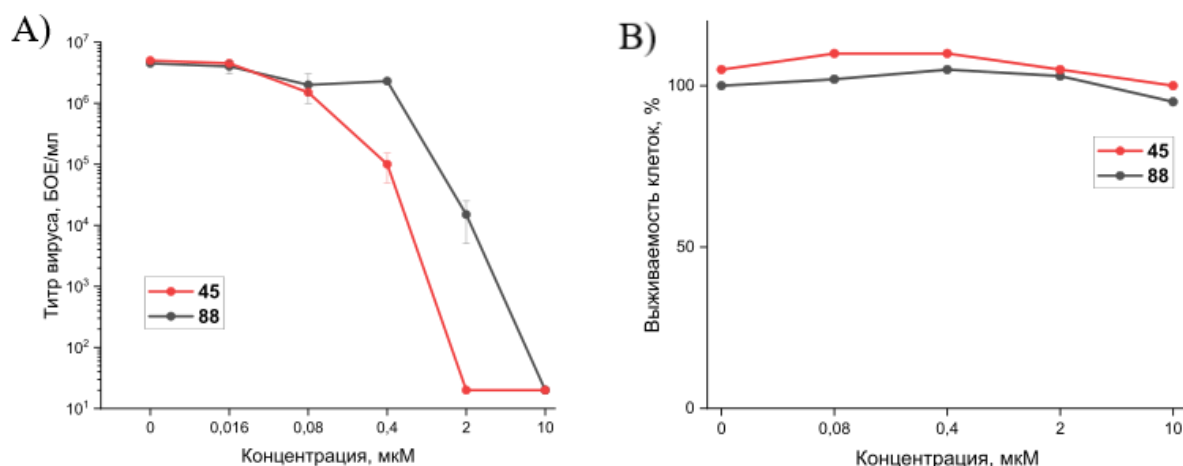


Рис. 4. Ингибирующее действие в отношении FIPV (штамм ATCC VR90) (A) и цитотоксичность в отношении клеток CRFK (B).

Так или иначе противовирусные производные показали активность в отношении всех протестированных оболочечных вирусов, что безусловно указывает на их широкий спектр действия. Во многих случаях цитотоксический эффект был намного ниже, чем значения среднеэффективных концентраций EC₅₀.

Спектральные свойства амфифильных производных перилена

Поскольку производные перилена являются красителями, а также в контексте гипотезы о фотохимическом механизме активности, для них регистрировались спектры поглощения и флуоресценции. Данные были получены для схожих хромофоров на основании вариации со-

пряжённых структур, хотя также проводились и сравнительные эксперименты между гомологичными производными, например, сравнивались 3-пивалоилоксиметил-5-(перилен-3-илэтил)урацил-1-уксусная кислота (**32**) и ее незащищённый (**33**) и 3-метильный (**37**) аналоги, а также редуцированное диметилуарицильное производное (**79**) и референсный нуклеозид **aUY11** (**18**) – что показало отсутствие заметных отличий по спектральным характеристикам в пределах одного хромофора вне зависимости от несопряженных заместителей (Рис. 5).

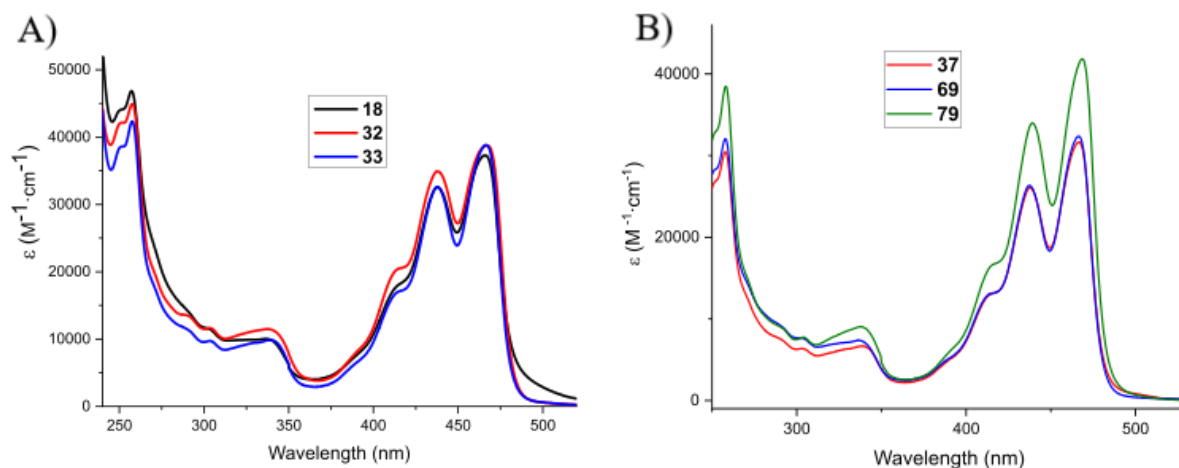


Рис. 5. УФ-спектры ненуклеозидных производных перилена **32** и **33** в сравнении с нуклеозидом **aUY11** (**18**) (A), а также производных 3-метилурацильных производных **37**, и **69**, **79** (B). Растворитель – метанол.

Вариация длины алкинильного линкера, а также в более значительной степени поворот периленового фрагмента (замена положения замещения 3 на 2), наоборот оказали существенные изменения на спектральные свойства, что заметно на нуклеозидных производных с удлинённым линкером **22** и **23**, а также на примере производных «фенольного типа» (Рис. 6).

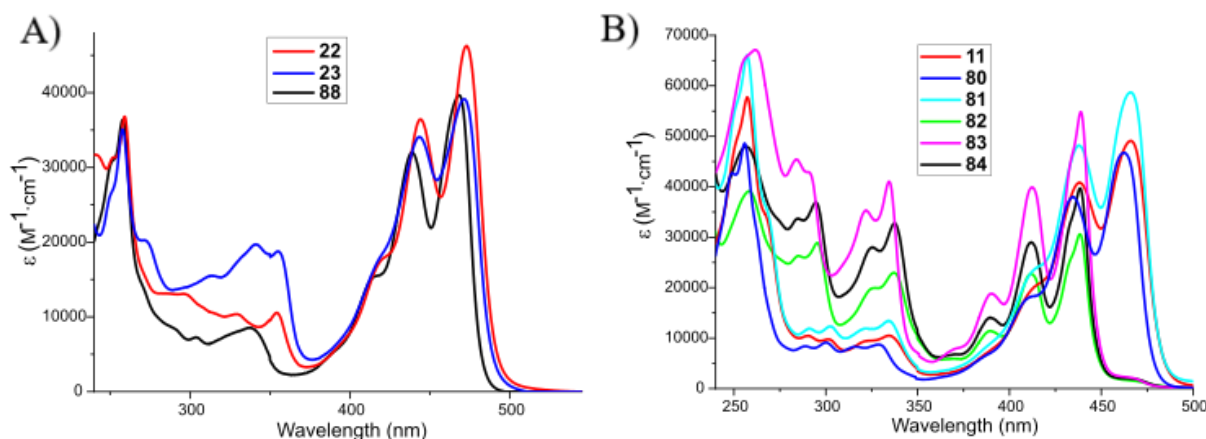


Рис. 6. УФ-спектры нуклеозидных производных перилена с удлинённым линкером **22** и **23** в сравнении с нуклеозидом **dUY11** (**88**) (A), а также различных производных «фенольного типа» (B). Растворитель – метанол.

Одним из интересных следствий амфифильности полученных производных в контексте изучения спектральных свойств стали стерический и сольватохромный эффекты. Так, для разветвлённых производных наблюдалось как собственное уменьшение экстинкции и тушение флуоресценции в истинном растворе за счет увеличения плотности посадки периленовых фрагментов, так и аналогичный процесс при увеличении гидрофильности растворителя (уменьшение концентрации DMSO в этаноле) (Рис. 7).

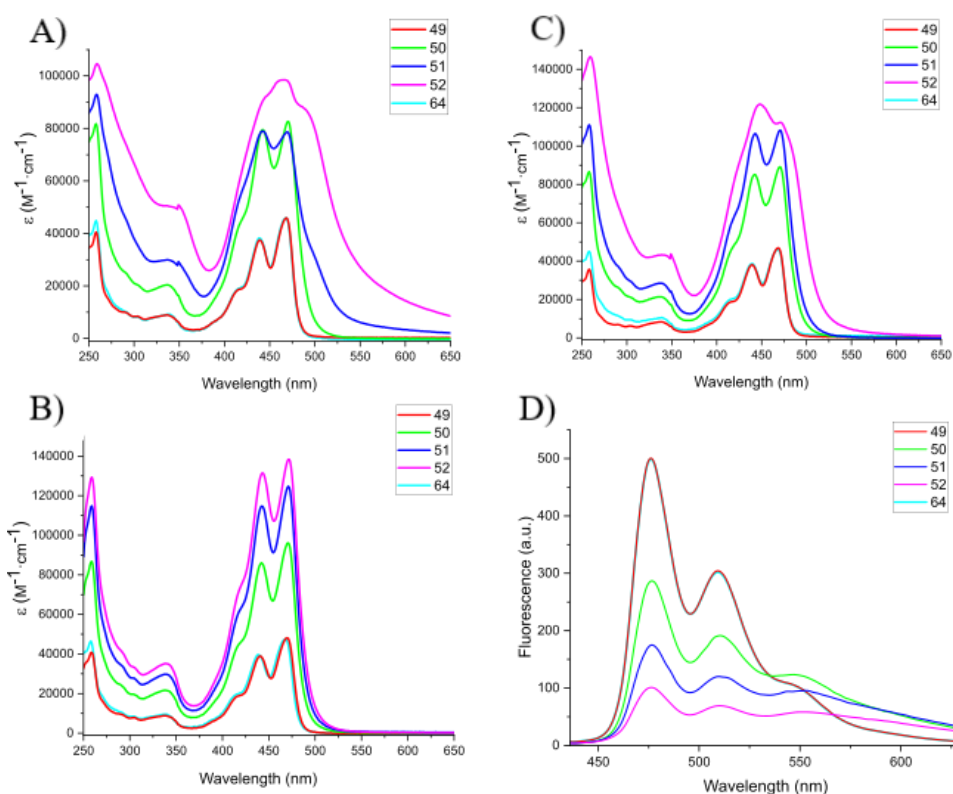


Рис. 7. УФ-спектры и спектры флуоресценции разветвлённых урацилэтиновых ненуклеозидных производных перилена **49–52** и **64** в растворе: (A) 0.2% DMSO в 96% этаноле, (B) 2% DMSO в 96% этаноле, (C) 20% DMSO в 96% этаноле. Растворитель – 96% этанол. Спектры эмиссии и возбуждения флуоресценции регистрировали при возбуждении на 420 нм, и для эмиссии при 530 нм, соответственно.

В более точном эксперименте при различных соотношениях воды и DMSO (Рис. 8) удалось использовать данное свойство для оценки растворимости полученных производных в 15% растворе DMSO – т.к. именно стоковые растворы в DMSO используются во многих противовирусных тестах. Полученные для серии гомологичных ненуклеозидных производных данные приведены в Таблице 8.

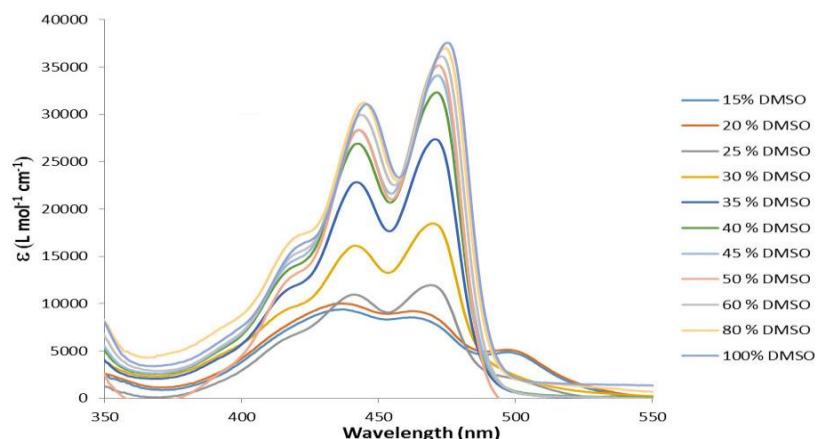


Рис. 8. Сравнение спектров поглощения соединения **dUY11 (88)** при различном соотношении воды и DMSO.

Таблица 8. Растворимость (способность к солюбилизации) некоторых периленовых соединений в 15%-ном водном DMSO.

#	Растворимость, μM	#	Растворимость, μM	#	Растворимость, μM
18	7.8	44	640	73	3.3
32	2950	45	3000	74	6

36	н/р	65	36	75	н/р
37	26.5	66	1.3	76	н/р
38	3	67	202	77	35.7
39	450	68	26.6	79	132
40	49	69	1.7	86	2.5
41	5.3	70	1.2	87	24
42	900	71	89.4	88	15
43	940	72	28.6	89	н/р

Исследование фотогенерации синглетного кислорода

Для серии производных были исследованы фотофизические свойства, связанные с генерацией синглетного кислорода – также в контексте потенциального фотохимического механизма противовирусной активности. В качестве экспериментальных данных были получены как абсолютные скорости генерации синглетного кислорода при освещении, так и данные квантовым выходам генерации в сравнении с известными (рибофлавин) и полученными в смежных экспериментах периленовыми производными (**C1T11**). В качестве сенсоров синглетного кислорода использовались различные его ловушки: SOSG (singlet oxygen sensor green), DMA (9,10-диметилантрацен), DPBF (1,3-дифенилизобензофуран) (Рис. 9). Данные экспериментов приведены в Таблицах 9–11.

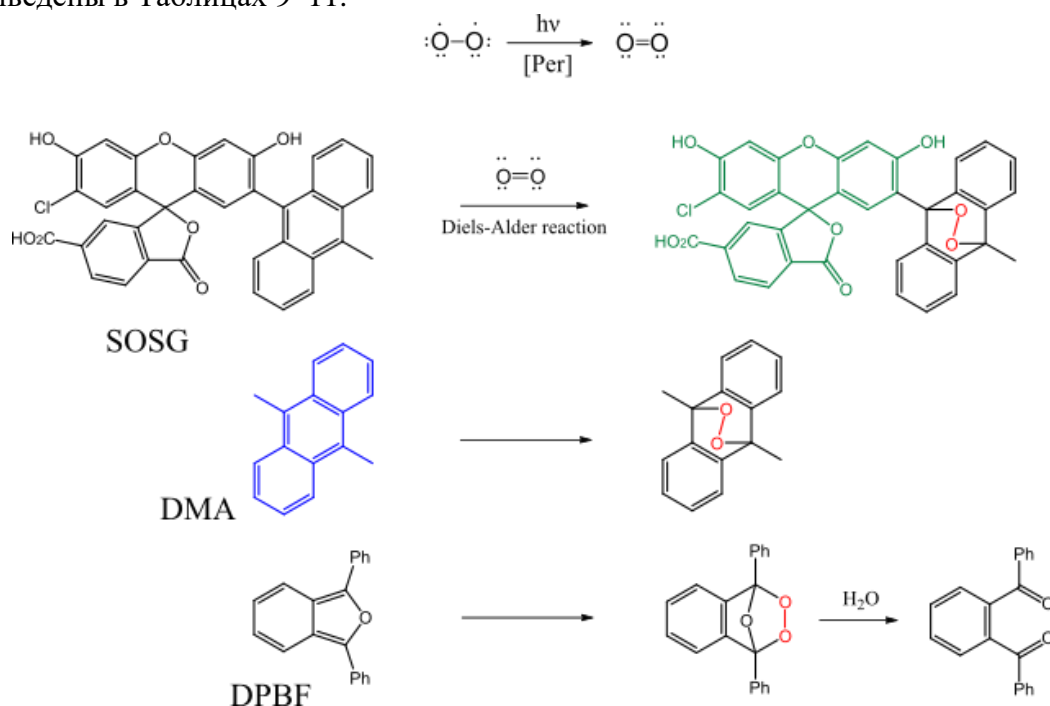


Рис. 9. Механизмы отклика индикаторов синглетного кислорода.

Таблица 9. Начальная скорость фотогенерации синглетного кислорода некоторыми 5-(перилен-3-ил-этинил)урацильными соединениями по индикатору SOSG. Растворитель – метанол.

#	Скорость генерации, с ⁻¹	#	Скорость генерации, с ⁻¹
32	0.018 ± 0.001	70	0.020 ± 0.001
36	0.021 ± 0.001	71	0.017 ± 0.001
37	0.013 ± 0.001	72	0.023 ± 0.001
65	0.037 ± 0.001	73	0.030 ± 0.002
66	0.023 ± 0.001	74	0.018 ± 0.001
67	0.026 ± 0.001	75	0.021 ± 0.001
68	0.021 ± 0.001	77	0.017 ± 0.001
69	0.022 ± 0.001	79	0.066 ± 0.003

Таблица 10. Квантовые выходы фотогенерации синглетного кислорода производными «фенольного типа» по индикатору SOSG относительно периленового производного **C1T11** ($\varphi_{\Delta}^0 = 0.59$).

#	Квантовый выход генерации синглетного кислорода, %	#	Квантовый выход генерации синглетного кислорода, %
11	42.2	82	29.7
80	45.1	83	46.0
81	28.2	84	33.2

Таблица 11. Квантовые выходы фотогенерации синглетного кислорода различными периленовыми производными по индикатору DPBF относительно рибофлавина ($\varphi_{ROS}^0 = 0.51$).

#	Квантовый выход генерации АФК (1O_2), %	#	Квантовый выход генерации АФК (1O_2), %
18	22.8 ± 0.4	44	17.3 ± 0.2
32	20.5 ± 0.2	45	19.1 ± 0.2
38	17.6 ± 0.4	77	12.7 ± 1.2
39	17.3 ± 0.2	79	22.8 ± 0.4
40	16.5 ± 0.2	86	7.1 ± 0.2
41	18.2 ± 0.2	87	23.1 ± 0.4
42	17.2 ± 0.4	88	20.9 ± 0.2
43	18.1 ± 0.4	89	20.0 ± 1.2

Также был проведен сравнительный эксперимент по измерению интенсивности флуоресценции DMA, которая пропорциональна скорости генерации синглетного кислорода в темноте и с принудительным освещением светом синей диодной лампы, а также с добавлением антиоксиданта, α -токоферола (Рис. 10).

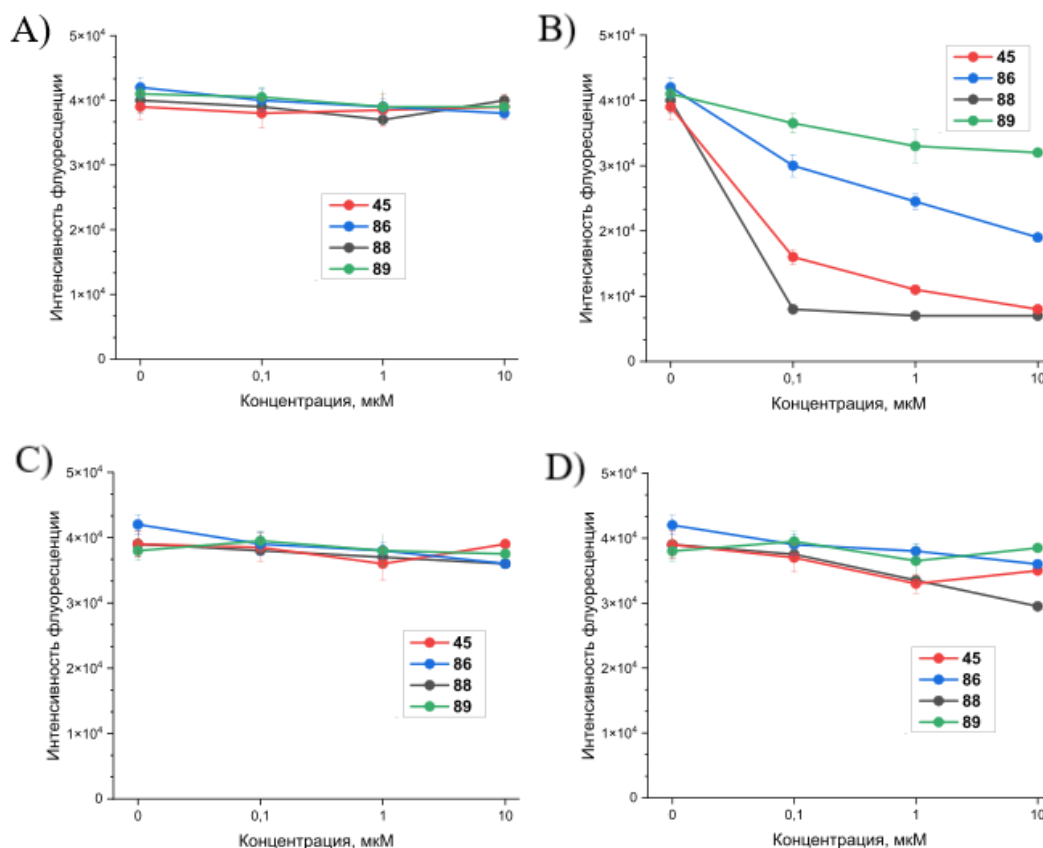


Рис. 10. Изменение интенсивности флуоресценции индикатора DMA в зависимости от условий проведения эксперимента по генерации синглетного кислорода для соединений **45, 86, 88, 89**: А – эксперимент в темноте, В – эксперимент при облучении синей диодной лампой, С и D – аналогично с добавлением α -токоферола.

Изучение влияния амфифильных производных перилена на стадии жизненного цикла вируса

По результатам скрининга на избранных представителях серий – как правило, референсный нуклеозид, ненуклеозидный амид и/или производное «фенольного типа» – были проведены расширенные испытания, связанные с избирательным добавлением или отмывкой противовирусных производных в различных комбинациях с вирусами и клетками, а также на различных этапах жизненного цикла вируса, преимущественно во время инфицирования.

Все эксперименты можно условно разделить на несколько категорий:

- оценка вирулицидного действия как такового;
- «time-of-addition» от -2 до 12 ч, для оценки потенциальной модели противовирусной терапии и ее эффективности;
- изучение процесса интернализации вируса;
- визуализация проникновения как вируса, так и противовирусных производных в клеточные структуры;
- изучение опосредованных процессов, таких как синтез вирусных белков и генетического материала, оценка оксидативного стресса и т.д.

В экспериментах по взаимодействию вируса непосредственно с производными перилена было показано чёткое уменьшение вирусной активности по отношению к контролю на вирусах африканской чумы свиней (ASFV), клещевого энцефалита (TBEV) и коронавирусе SARS-CoV-2 – в последних двух случаях уменьшение титра вируса показано при разных начальных титрах вируса, а в случае коронавируса ещё и как дозозависимое (Рис. 11).

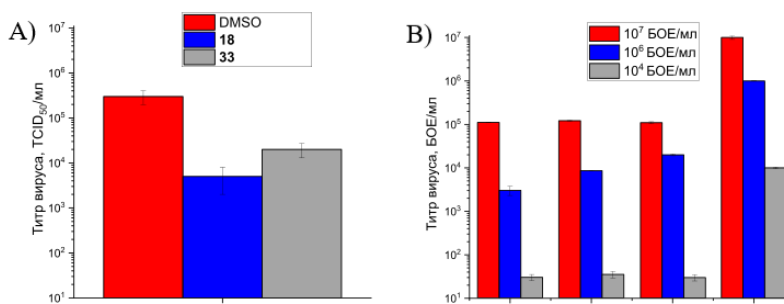


Рис. 11. Оценка вирулицидного действия производных **18** и **33** по отношению к вирусу африканской чумы свиней (штамм Armenia/07) (A) и **11**, **45** и **88** по отношению к коронавирусу SARS-CoV-2 («patient isolate») на клетках Vero.

Поскольку процесс инфицирования (интернализации) занимает достаточно продолжительное время, также проводились эксперименты «time-of-addition», которые элиминировали максимальную эффективность использования противовирусного производного, как с простым добавлением соединений по времени (вируса ASFV) (Рис. 12), так и более развёрнуто с точки зрения дизайна эксперимента – а именно, с различной комбинацией добавления соединения к клеткам/вирусам, включая различное время совместной пред- и постинкубации за счет проведения или отсутствия отмывки клеток – на вирусе SARS-CoV-2 (Рис. 13).

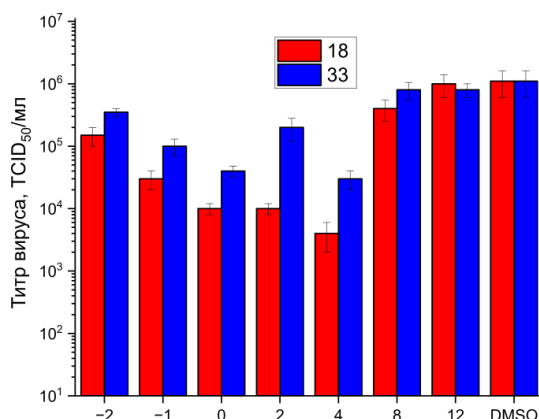


Рис. 12. Оценка противовирусного действия производных **18** и **33** в отношении к вирусу африканской чумы свиней (штамм Armenia/07) на клетках Vero в зависимости от времени добавления соединений к клеткам.

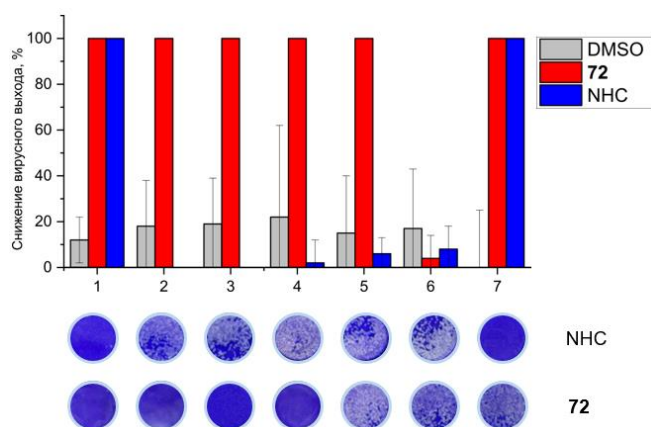


Рис. 13. Оценка противовирусного действия производного **72** в отношении коронавируса SARS-CoV-2 (штамм PIK35) на клетках Vero на различных этапах жизненного цикла вируса. Дизайн экспериментов: 1 – одновременное добавление, 2 – прединкубация с клетками и поздней отмывкой, 3 – прединкубация с клетками и отмывкой на стадии инфицирования, 4 – прединкубация с вирусом и поздней отмывкой, 5 – одновременное добавление с отмывкой, 6 – постинкубация с отмывкой, 7 – постинкубация без отмывки.

Полученный для ASFV результат лишь показал, что после 4 ч после инфицирования резко падает эффективность противовирусной обработки; с другой стороны, слишком раннее прединкубирование также не даёт значительного результата, что позволяет сделать вывод, что наиболее значимой является именно инкубация соединений с вирионами.

Аналогичные результаты показывают и тесты на SARS-CoV-2, проведенные с более строгим дизайном экспериментов, в каждом из которых проверяется только один из сценариев – по-прежнему позднее добавление соединения приводит к пропуску стадии инфицирования, однако, наличие/отсутствие отмывки клеток по-разному влияет на выживаемость вторичных вирионов (Рис. 13, эксперименты 6,7). Несмотря на значительное снижение титра в экспериментах 5 и 7, контроль по образованию бляшек, для которых по определению «рабочий» титр вируса составляет $<0.01\%$ от контрольного, показывает, что наибольший противовирусный эффект оказывает прединкубация как с вирусами (прямое вирулицидное действие), так и с клетками (протекторное действие) – на основе локализации соединений в липидных мембранах – либо одновременное добавление без каких-либо отмывок (эксперимент 1). Стоит отметить, что эксперимент 1 является классическим дизайном для противовирусного скрининга большинства производных.

На вторичный характер действия соединения в экспериментах 5 и 7 указывает также непосредственное измерение вирусного титра другого штамма SARS-CoV-2 внутри клеток и в межклеточной среде, который во втором случае заметно выше (Рис. 14).

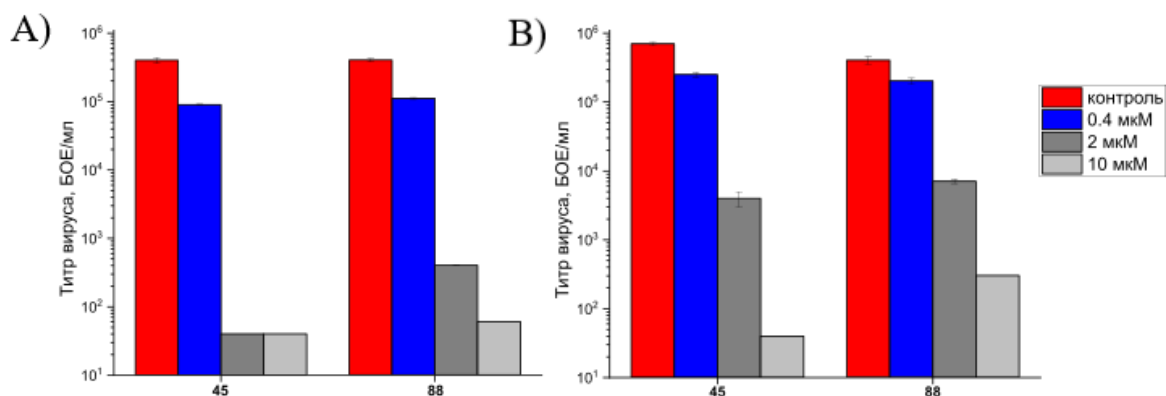


Рис. 14. Оценка противовирусного действия производных **45** и **88** по отношению к коронавирусу SARS-CoV-2 (изолят из пациента 951/2020 в Чехии) на клетках Vero путем измерения вирусного титра в межклеточном пространстве (А) и внутри клеток (В).

Эксперимент на TBEV с контролем бляшкообразования с прединкубацией с клетками и их отмывкой в сравнении с одновременным добавлением соединений и вируса показал значительное снижение активности, что вероятно связано с различной аффинностью соединений к различным клеткам, а также особенностям интернализации различных вирусов (Таблица 12).

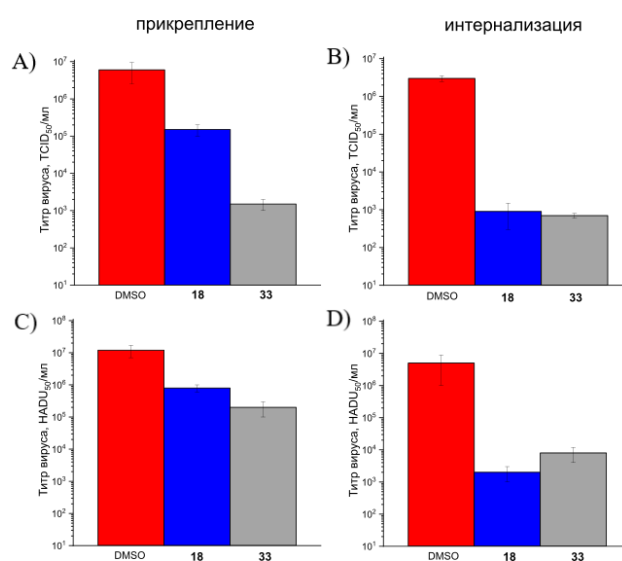
Таблица 12. Активность соединений **18** и **88** в отношении TBEV (штамм Absettarov) на клетках РЕК в зависимости от очередности добавления препарата к вирусам и клеткам.

#	EC ₅₀ , μM		
	одновременное добавление	предынкубация с клетками	предынкубация с вирусом
18	0.018 ± 0.010	2.7 ± 0.8	0.04 ± 0.03
88	0.024 ± 0.013	1.56 ± 0.22	0.04 ± 0.03

Сам процесс интернализации был подробно изучен и, в свою очередь, может быть разбит на два подпроцесса: приклепление и собственно проникновение в клетку – для оболочечных вирусов это рецептор-опосредованное слияние клеточной и вирусной мембран, через стадию изменения кривизны липидного бислоя. Стоит отметить, что изменение кривизны липидного бислоя и, соответственно, слияние даже в нормальных условиях происходит при определённой температуре, тогда как охлаждение значительно замедляет этот процесс и позволяет его контролировать.

Эксперименты аналогично проводились на вирусах ASFV и SARS-CoV-2 (альтернативный штамм). В первом случае при воздействии соединений на вирусные частицы – просто прикрепленные или в процессе слияния – титр вируса в целом значительно снижался в обоих случаях (Рис. 15). Однако, нуклеозидное производное **aUY11** (**10**) оказалось более чуть селективным, тем не менее данная «селективность» может быть обусловлена лишь разницей температур между +4 и +37°C, которая влияет на текучесть мембран и, соответственно, на распределение соединений.

Рис. 15. Оценка противовирусного действия производных **18** и **33** по отношению к вирусу африканской чумы свиней (штамм Armenia/07) на клетках Vero (A–B) и альвеолярных макрофагах (C–D) на различных стадиях проникновения вируса в клетку.



Об этом говорят и данные, строго полученные на коронавирусе, а именно различное снижение вирусного титра в зависимости от температуры предынкубации соединения с вирусом, но без слияния, т.к. совместная инкубация проводится при +4°C, после чего соединения отмываются (Рис. 16A). Слияние вируса с клеткой ингибировалось на коронавирусе и на ASFV (Рис. 16B).

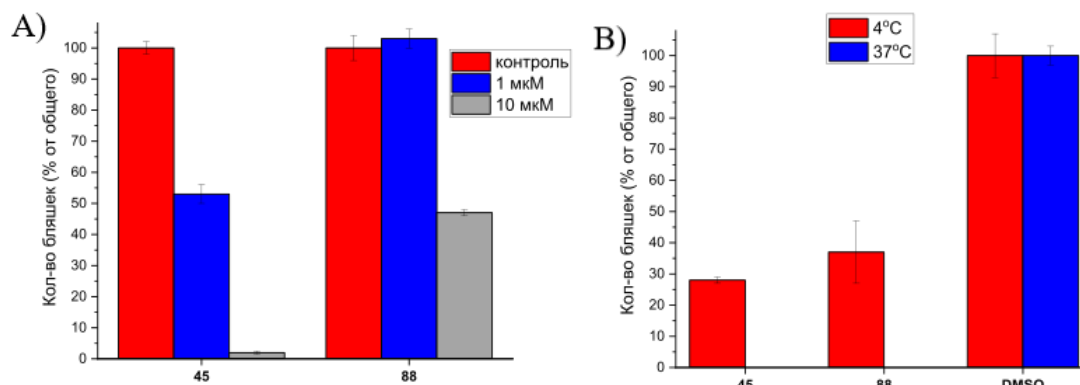


Рис. 16. Оценка противовирусного действия производных **14** (dUY11) и **85** (cm22pUY11) по отношению к коронавирусу SARS-CoV-2 (изолят из пациента 951/2020 в Чехии) на клетках Vero на стадии приклепления (A) и слияния (B).

Визуализация вирусных частиц осложнена крайне малым их размером, непосредственно фотографию вириона возможно увидеть только в условиях электронной микроскопии, которые являются непригодными для жизнедеятельности организмов. Опосредованно показать слияние, а также локализацию противовирусных соединений в клетках позволяет флуоресцентная микроскопия. При этом важно отметить, что производные перилена сами являются флуоресцентными и при этом в удобном «зелёном» канале. Визуализация вирионов в растворе затруднена, т.к. даже в случае локализации красителей в их оболочках – окраску будет приобретать раствор в целом, поэтому нами был использован подход, при котором краситель проявляет себя только при слиянии за счет уменьшения плотности и разгорания – таким образом можно отследить интенсивность процесса, его временные рамки и конкретную локализацию (Рис. 17). В данном случае был использован дикабоцианиновый краситель DiD, который дает интенсивную флуоресценцию в «красном» канале микроскопа. Таким образом нам удалось визуализировать одновременно и локализацию противовирусного соединения, и интенсивность слияния (Рис. 18). Также удалось выяснить, что различные производные визуализируются в различных компартментах клетки совершенно по-разному, однако, сложно установить корреляцию с активностью (Рис. 19).

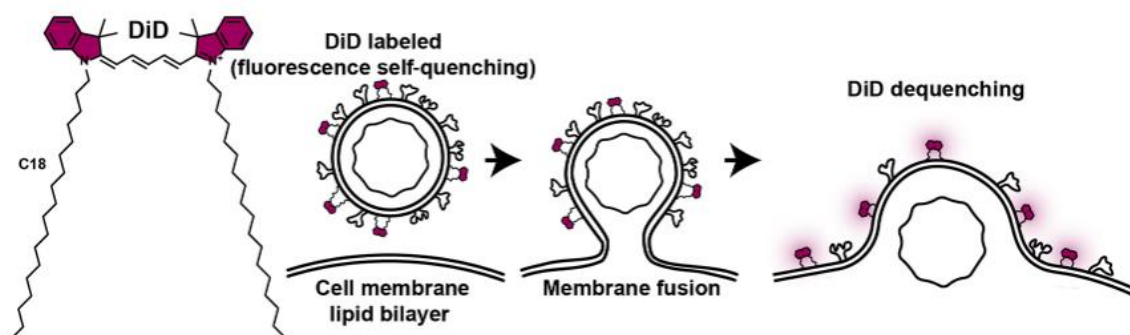


Рис. 17. Механизм разгорания красителя DiD при слиянии меченых вирионов с клеткой: при распределении в клеточной мембране снимается самотушение в результате увеличения расстояния между молекулами красителя.

Возможно, более информативным является измерение разгорания флуоресценции производных перилена в липосомах в модельном эксперименте, которое как раз относительно коррелирует с противовирусной активностью. При этом, как было показано выше, флуоресцентные свойства производных перилена зависят от окружения, что говорит нам о том, что данный эксперимент фактически характеризует их аффинность к модельным липидным мембранам, что может играть определяющую роль в процессе ингибирования вирусной активности (Рис. 20).

Также были изучены вторичные факторы, которые косвенно характеризуют противовирусную активность соединений. Так, для вируса ASFV с помощью иммуноблоттинга было показано снижение количества вирусных белков р30 и р72 (Рис. 21), а также снижение количества вирусной ДНК (кПЦР) и вирусных фабрик (ИФА по белку р32).

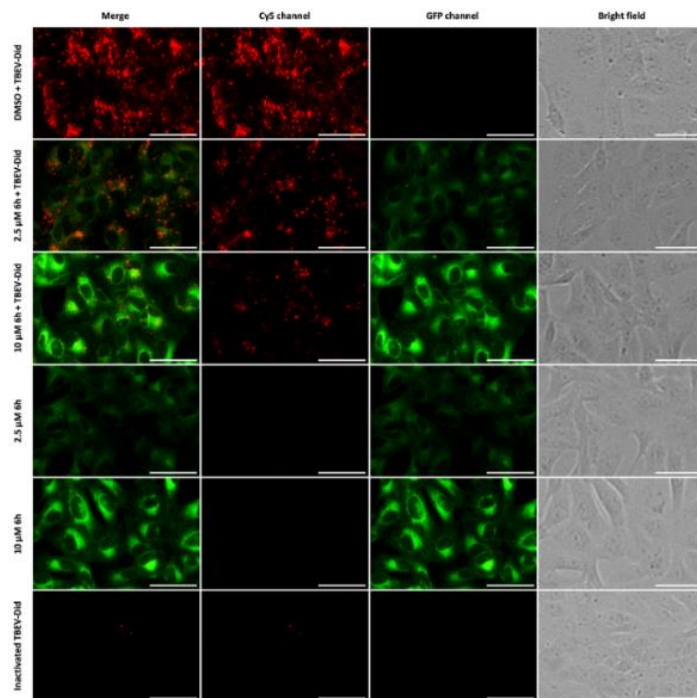


Рис. 18. Визуализация локализации производного 72 и меченых DiD вирионов вируса клещевого энцефалита TBEV (штамм Absettarov) в различных структурах живых клеток PEK

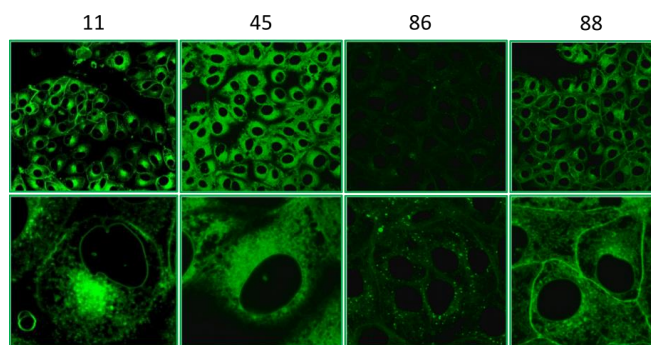


Рис. 19. Визуализация локализации периленил-этильных производных **11**, **45**, **86** и **88** в различных структурах живых клеток Vero.

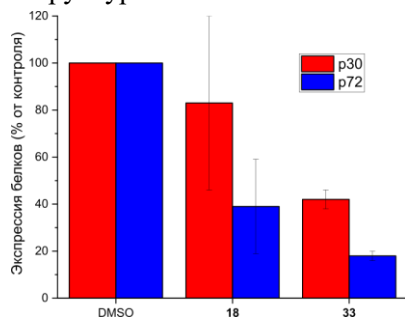


Рис. 21. Оценка действия производных **18** и **33** на экспрессию белков вируса африканской чумы свиней (штамм Armenia/07) на клетках Vero

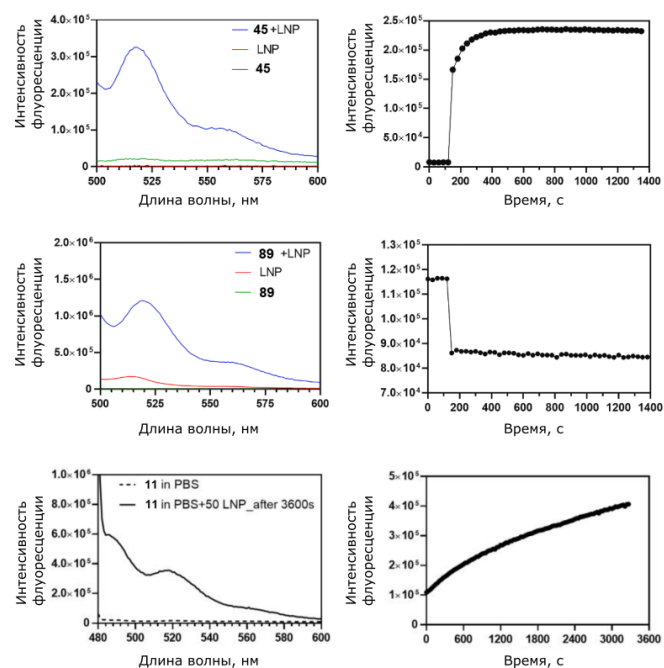


Рис. 20. Спектры флуоресценции производных **11**, **45** и **89** и разгорание/тушения их флуоресценции в липосомах.

Влияние фотогенерации синглетного кислорода на противовирусную активность

Изучив условия, при которых периленовые производные могут ингибировать проникновение вируса в клетку, а также обладая представлениями о том, что они являются мощными источниками генерации синглетного кислорода осталось только проверить гипотезу фотохимического ингибирования вирусных частиц *in vitro*.

В первую очередь на вирусе SARS-CoV-2 было протестировано, влияет ли принудительное освещение синей диодной лампой (коррелирует со спектром поглощения хромофора) на активность. Действительно, удалось обнаружить значительно увеличение активности, однако, не для всех производных, а только для тех, которые визуально более активно встраивались в мембраны (Рис. 22).

В параллельном эксперименте наоборот все манипуляции проводились при свете красной лампы, что позволяло полностью исключить фотосенсибилизацию. В подобном эксперименте противовирусная активность резко упала, вплоть до концентраций 100 мкМ, которые значительно превышают значения EC_{50} , полученные в стандартных условиях (Рис. 23). Аналогичный результат был показан и на другом коронавирусе FIPV (Рис. 24)

Вероятно, следовало ожидать увеличения цитотоксического эффекта, который способны оказать фотосенсибилизаторы. Действительно, клетки Vero, в случае использования соединений, которые хорошо локализуются в мембранах, показали довольно низкую выживаемость при принудительном облучении с соединениями, с другой стороны, клетки носители FIPV (CRFK) – оказались более устойчивыми (Рис. 25).

Помимо дозозависимых экспериментов был проведен и эксперимент по уменьшению титра вируса везикулярного стоматита (VSV) в зависимости от времени экспозиции с синей лампой, который показал зависимость активности не только от концентрации соединения, но и времени экспозиции (Рис. 26).

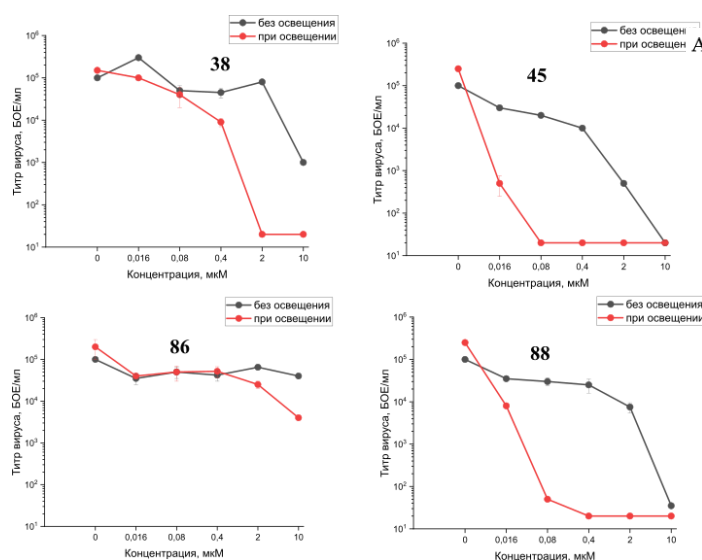


Рис. 22. Оценка противовирусного действия производных **38**, **45**, **86** и **88** по отношению к коронавирусу SARS-CoV-2 (изолят из пациента 951/2020 в Чехии) при дневном освещении и принудительном освещении синей диодной лампой.

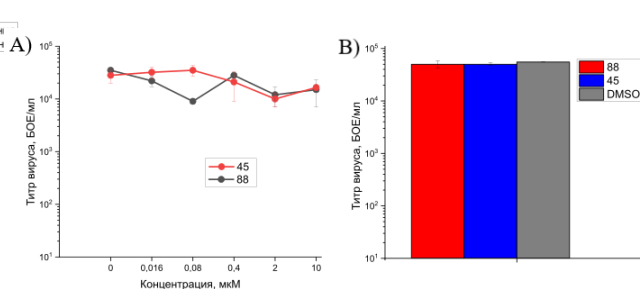


Рис. 23. Оценка противовирусного действия производных **45** и **88** по отношению к коронавирусу SARS-CoV-2 (изолят из пациента 951/2020 в Чехии) при свете красной лампы при различных концентрациях соединений (А), в т.ч. при добавлении 100 мкМ (В).

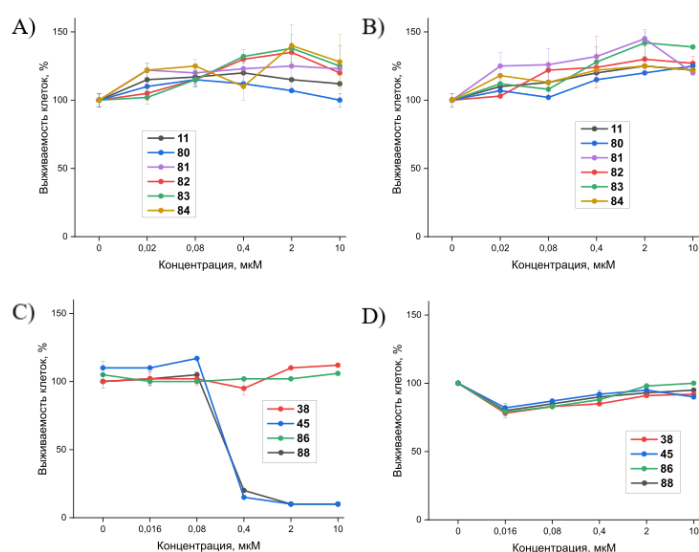


Рис. 24. Оценка противовирусного действия производного **11** по отношению к вирусу инфекционного перитонита кошек FIPV (штамм WSU 79-1146) при подготовке эксперимента при дневном освещении, в свете красной лампы, а также при принудительном освещении синей диодной лампой.

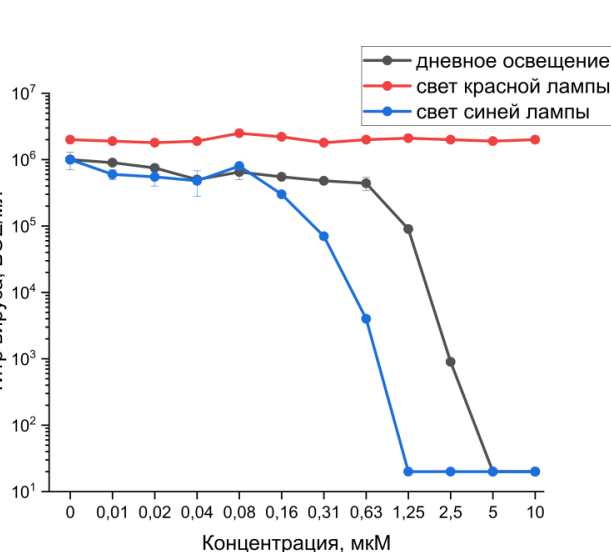


Рис. 25. Оценка цитотоксического действия периленовых производных по отношению к клеткам Vero при инкубировании с принудительным освещением синей диодной лампой (А, С) и в темноте (В, D).

Использование различных добавок, таких как азид натрия (ловушка синглетного кислорода) и α -токоферол (антиоксидант) на VSV также, как и ранее в эксперименте с разгоранием флуоресценции DMA, однозначно продемонстрировало их протекторный эффект (Рис. 27).

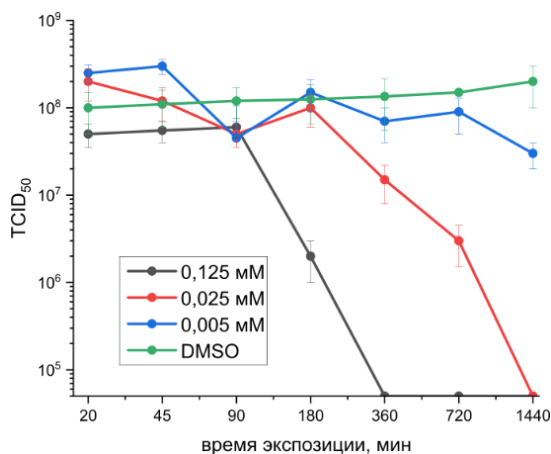


Рис. 26. Снижение титра вируса везикулярного стоматита VSV (штамм Indiana) при различных концентрациях производного **72** при освещении синей диодной лампой.

Наконец, был проведён и наглядный эксперимент по визуализации вириона, подвергнутого облучению в присутствии противовирусного соединения, а также аналогичный эксперимент с добавлением токоферола. После воздействия вирионы были закреплены на подложке и визуализированы методом просвечивающей электронной микроскопии с негативным окрашиванием. Визуально заметно, что вирион подвергается дозозависимому разрушению в присутствии соединения, тогда как α -токоферол снижает данный эффект как антиоксидант (Рис. 28).

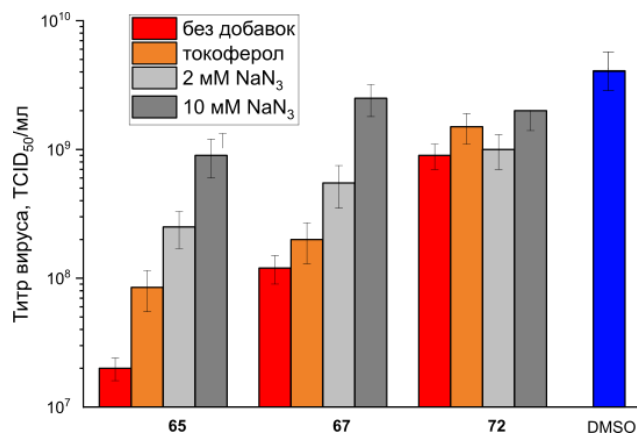
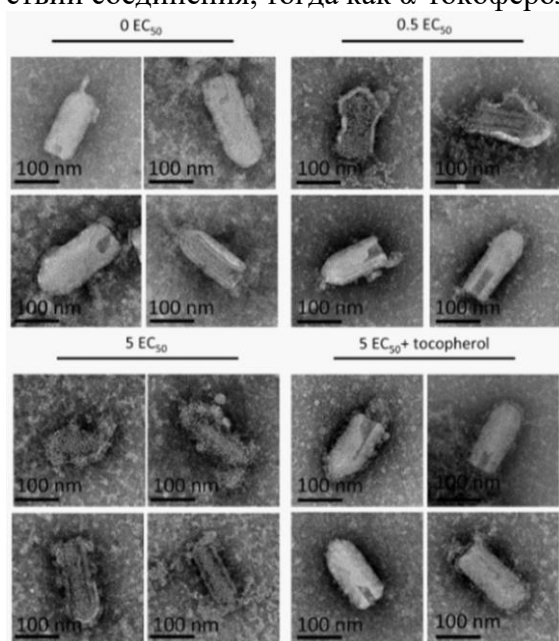


Рис. 27. Оценка противовирусной активности производных **65**, **67** и **72** по отношению к вирусу везикулярного стоматита VSV (штамм Indiana) с использованием различных добавок – ингибиторов активности синглетного кислорода.

Рис. 28. Визуализация разрушения вирионов вируса везикулярного стоматита VSV (штамм Indiana) при действии соединения **72** в различных концентрациях и защитного эффекта токоферола методом просвечивающей электронной микроскопии с отрицательным окрашиванием (NS-TEM).

ВЫВОДЫ

1. На основе исходных структур, 5-(перилен-3-илэтинил)-2'-дезоксидеокси-уридина и 5-(перилен-3-илэтинил)-арабино-уридина, синтезированы серии периленилэтильных производных, в том числе с вариациями положения замещения в периленовом ядре (2- и 3-), линкера (кроме этинильного – бутадиилильный и линкер с разобщением сопряжения периленового и арильного остатков), а также с последовательным упрощением структуры путём замены углеводной части фрагментов урацильных нуклеозидов на 1-карбоксамидометильные заместители различной степени гидрофобности или путём замены урацила на замещённые фенильные остатки.

2. Скрининг противовирусной активности полученных серий на широкой панели оболочечных вирусов разных семейств (вирусы клещевого энцефалита, простого герпеса, жёлтой лихорадки, гриппа, парагриппа, коронавирус, вирус чикунгунья, респираторно-синцитиальный вирус, вирус великулярного стоматита, вирус Африканской чумы свиней, вирус кошачьего инфекционного перитонита) продемонстрирована связь структуры с активностью, в т.ч. необязательность присутствия углеводного и вообще неклеозидного фрагмента молекулы, важность сопряжения периленового и арильного остатков, и необходимость некоторого оптимального баланса полярности в гидрофильной части молекулы (вариация нехромофорных заместителей приводит к изменению значений активности в широком диапазоне, до 4 порядков EC₅₀).
3. Изучены спектральные (поглощение, флуоресценция) и фотохимические (начальные скорости и квантовые выходы фотогенерации синглетного кислорода) свойства периленилэтильных соединений; показано, что для высокой антивирусной активности вещество должно быть мощным фотосенсибилизатором.
4. В *in vitro* экспериментах по ингибированию вирусной активности в условиях контролируемой освещённости, а также с использованием антиоксидантов и ловушек синглетного кислорода, было показано, что фотосенсибилизация приводит к ингибированию слияния вирионов с клетками; с помощью просвечивающей электронной микроскопии показано, что в основе эффекта лежит фотохимическое повреждение вирионов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Mariewskaya K.A., Gvozdev D.A., **Chistov A.A.**, Straková P., Huvarová I., Svoboda P., Kotouček J., Ivanov N.M., Krasilnikov M.S., Zhitlov M.Y., Pak A.M., Mikhnovets I.E., Nikitin T.D., Korshun V.A., Alferova V.A., Mašek J., Růžek D., Eyer L., Ustinov A.V. Membrane-targeting peryleneethynylphenols inactivate medically important coronaviruses via the singlet oxygen photogeneration mechanism. *Molecules*, **28** (17), 6278 (2023). <https://doi.org/10.3390/molecules28176278>
2. Straková P., Bednář P., Kotouček J., Holoubek J., Fořtová A., Svoboda P., Štefánik M., Huvarová I., Šimečková P., Mašek J., Gvozdev D.A., Mikhnovets I.E., **Chistov A.A.**, Nikitin T.D., Krasilnikov M.S., Ustinov A.V., Alferova V.A., Korshun V.A., Růžek D., Eyer L. Antiviral activity of singlet oxygen-photogenerating perylene compounds against SARS-CoV-2: Interaction with the viral envelope and photodynamic virion inactivation. *Virus Res.*, **334**, 199158 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199158>
3. **Chistov A.A.**, Chumakov S.P., Mikhnovets I.E., Nikitin T.D., Slesarchuk N.A., Uvarova V.I., Rubekina A.A., Nikolaeva Y.V., Radchenko E.V., Khvatov E.V., Orlov A.A., Frolenko V.S., Sukhorukov M.V., Kolpakova E.S., Shustova E.Y., Galochkina A.V., Streshnev P.P., Osipov E.M., Sapozhnikova K.A., Moiseenko A.V., Brylev V.A., Proskurin G.V., Dokukin Y.S., Kutyaakov S.V., Aralov A.V., Korshun V.A., Strelkov S.V., Palyulin V.A., Ishmukhametov A.A., Shirshin E.A., Osolodkin D.I., Shtro A.A., Kozlovskaya L.I., Alferova V.A., Ustinov A.V. 5-(Perylene-3-ylethynyl)uracil as an antiviral scaffold: potent suppression of enveloped virus reproduction by 3-methyl derivatives *in vitro*. *Antivir. Res.*, **209**, 105508 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105508>
4. Alferova V.A., Mikhnovets I.E., **Chistov A.A.**, Korshun V.A., Tyurin A.P., Ustinov A.V. Perylene as a controversial antiviral scaffold. *Annu. Rep. Med. Chem.*, **58**, 93–156 (2022). <https://doi.org/10.1016/bs.armc.2022.08.001>
5. Mariewskaya K.A., Tyurin A.P., **Chistov A.A.**, Korshun V.A., Alferova V.A., Ustinov A.V. Photosensitizing antivirals. *Molecules*, **26** (13), 3971 (2021). <https://doi.org/10.3390/molecules26133971>
6. Николаева Ю.В., Улащик Е.А., Чекерда Е.В., Галочкина А.В., Слесарчук Н.А., **Чистов А.А.**, Никитин Т.Д., Коршун В.А., Шманай В.В. Устинов А.В., Штро А.А. Производные 5-(перилен-3-илэтинил)урацила ингибируют репродукцию респираторных вирусов. *Биоорганическая химия*, **46** (3), 273–279 (2020).

- Engl. transl.: Nikolayeva Y.N., Ulashchik E.A., Chekerda E.V., Galochkina A.V., Slesarchuk N.A., **Chistov A.A.**, Nikitin T.D., Korshun V.A., Shmanai V.V., Ustinov A.V., Shtro A.A. 5-(Perylen-3-ylethynyl)uracil derivatives inhibit reproduction of respiratory viruses. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 46 (3), 315–320 (2020). <https://doi.org/10.1134/S1068162020030139>
7. Slesarchuk N.A., Khvatov E.V., **Chistov A.A.**, Proskurin G.V., Nikitin T.D., Laszarevich A.I., Ulanovskaya A.A., Ulashchik E.A., Orlov A.A., Jegorov A.V., Ustinov A.V., Tyurin A.P., Shmanai V.V., Ishmukhametov A.A., Korshun V.A., Osolodkin D.I., Kozlovskaya L.I., Aralov A.V. Simplistic perylene-related compounds as inhibitors of tick-borne encephalitis virus reproduction. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 30 (10), 127100 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127100>
 8. **Chistov A.A.**, Orlov A.A., Streshnev P.P., Slesarchuk N.A., Aparin I.O., Rath B., Brylev V.A., Kutya-kov S.V., Mikhura I.V., Ustinov A.V., Westman G., Palyulin V.A., Jain N., Osolodkin D.I., Kozlovskaya L.I., Korshun V.A. Compounds based on 5-(perylene-3-ylethynyl)uracil scaffold: High activity against tick-borne encephalitis virus and non-specific activity against enterovirus A. *Eur. J. Med. Chem.*, 171, 93–103 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.029>
 9. Sapozhnikova K.A., Slesarchuk N.A., Orlov A.A., Khvatov E.V., Radchenko E.V., **Chistov A.A.**, Ustinov A.V., Palyulin V.A., Kozlovskaya L.I., Osolodkin D.I., Korshun V.A., Brylev V.A. Ramified derivatives of 5-(perylene-3-ylethynyl) uracil-1-acetic acid and their antiviral properties. *RSC Adv.*, 9 (45), 26014–26023 (2019). <https://doi.org/10.1039/C9RA06313G>
 10. Speerstra S., **Chistov A.A.**, Proskurin G.V., Aralov A.V., Ulashchik E.A., Streshnev P.P., Shmanai V.V., Korshun V.A., Shang L.M. Antivirals acting on viral envelopes via biophysical mechanisms of action. *Antivir. Res.*, 149, 164–173 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.11.018>
 11. Hakobyan A., Galindo I., Nañez A., Arabyan E., Karalyan Z., **Chistov A.A.**, Streshnev P.P., Korshun V.A., Alonso C., Zakaryan H. Rigid amphipathic fusion inhibitors demonstrate antiviral activity against African swine fever virus. *J. Gen. Virol.*, 99 (1), 148–156 (2018). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000991>
 12. Proskurin G.V., Orlov A.A., Brylev V.A., Kozlovskaya L.I., **Chistov A.A.**, Karganova G.G., Palyulin V.A., Osolodkin D.I., Korshun V.A., Aralov A.V. 3'-O-Substituted 5-(perylene-3-ylethynyl)-2'-deoxyuridines as tick-borne encephalitis virus reproduction inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, 155, 77–83 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.040>
 13. Aralov A.V., Proskurin G.V., Orlov A.A., Kozlovskaya L.I., **Chistov A.A.**, Kutya-kov S.V., Karganova G.G., Palyulin V.A., Osolodkin D.I., Korshun V.A. Perylenyltriazoles inhibit reproduction of enveloped viruses. *Eur. J. Med. Chem.*, 138, 293–299 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.014>
 14. **Chistov A.A.**, Kutya-kov S.V., Guz A.V., Mikhura I.V., Ustinov A.V., Korshun V.A. Improved large-scale synthesis of 5-(perylene-3-ylethynyl)-arabino-uridine (aUY11), the broad-spectrum antiviral. *Org. Prep. Proc. Int.*, 49 (4), 377–381 (2017). <https://doi.org/10.1080/00304948.2017.1343040>
 15. **Chistov A.A.**, Kutya-kov S.V., Ustinov A.V., Aparin I.O., Glybin A.V., Mikhura I.V., Korshun V.A. 2-Ethynylperylene and improved synthesis of 3-ethynylperylene. *Tetrahedron Lett.*, 57 (9), 1003–1006 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.01.067>
 16. Orlov A.A., **Chistov A.A.**, Kozlovskaya L.I., Ustinov A.V., Korshun V.A., Karganova G.G., Osolodkin D.I. Rigid amphipathic nucleosides suppress reproduction of the tick-borne encephalitis virus. *Med. Chem. Commun.*, 7 (3), 495–499 (2016). <https://doi.org/10.1039/C5MD00538H>
 17. **Chistov A.A.**, Ivanov N.M., Kutya-kov S.V., Ustinov A.V., Glybin A.V., Mikhura I.V., Streshnev P.P., Korshun V.A. Fluorescent nucleosides with an elongated rigid linker: attaching perylene to a nucleobase via a one-pot desilylation/Sonogashira reaction. *Tetrahedron Lett.*, 57 (43), 4821–4823 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.09.050>

Тезисы конференций и симпозиумов

1. **Чистов А.А.**, Глыбин А.В., Колпите Ч., Шанг Л., Коршун В.А., Устинов А.В. Синтез и противовирусная активность 5-(3-периленилэтинил)-арабино-уридина. Международная междисциплинарная научная конференция «Биологически активные вещества и материалы». 27 мая – 1 июня 2013, Новый Свет, Крым, Украина, Материалы конференции, Том 1, стр. 33–34.
2. **Chistov A.A.**, Glybin A.V., Colpitts C.C., Shang L.M., Mikhaleva M.A., Guz A.V., Streshnev P.P., Kutya-kov S.V., Prokhorenko I.A., Stepanova I.A., Korshun V.A., Ustinov A.V. Antiviral arylethynyl nucleosides. V International Conference «Chemistry, Structure and Function of Biomolecules». Minsk, 4–6 June, 2014, Book of abstracts, 11–12.

3. Устинов А.В., **Чистов А.А.**, Стрешнев Ф.П., Гузь А.В., Кутяков С.В., Коршун В.А. Новые полициклические ароматические соединения с противовирусной активностью. Международная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 55-летию Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова, Москва, 15–19 сентября, 2014, стендовый доклад.
4. Korshun V.A., **Chistov A.A.**, Proskurin G.V., Ustinov A.V. The story of amphipathic antiviral nucleosides. 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry. Novosibirsk, 5–10 July, 2015, Book of abstracts, 80.
5. **Chistov A.A.**, Orlov A.A., Guz A.V., Streshnev P.P., Kutyakov S.V., Ustinov A.V., Korshun V.A., Osolodkin D.I., Kozlovskaya L.I., Karganova G.G. Arylethynyl nucleosides as potent inhibitors of tick-borne encephalitis virus reproduction. 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry. Novosibirsk, 5–10 July, 2015, Book of abstracts, 159.
6. Коршун В.А., Устинов А.В., **Чистов А.А.**, Проскурин Г.В., Аралов А.В. Амфипатические противовирусные нуклеозиды. Второй междисциплинарный симпозиум и молодежный форум по медицинской, органической и биологической химии. Крым, Новый Свет, 27–30 сентября 2015 г., 34.
7. **Чистов А.А.**, Кутяков С.В., Устинов А.В., Коршун В.А. Синтез несимметричных нуклеозидных 1,3-бутадинов с помощью реакции Соногаширы. Второй междисциплинарный симпозиум и молодежный форум по медицинской, органической и биологической химии. Крым, Новый Свет, 27–30 сентября 2015 г., 182.
8. Sapozhnikova K., Chernik A., Streshnev P., Rath B., Aparin I., Kutyakov S., **Chistov A.**, Jain N., Korshun V., Brylev V. Clusters of 5-(perylene-3-ylethynyl)uracil, an antiviral pharmacophore. XXII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids. Paris, France, 18–22 July, 2016, Abstract book, 114–115.
9. **Chistov A.A.**, Proskurin G.V., Orlov A.A., Aralov A.V., Brylev V.A., Tyurin A.P., Prokhorenko I.A., Kutyakov S.V., Aparin I.O., Ivanov N.M., Ulashchik E.A., Streshnev F.P., Sapozhnikova K.A., Korelskaya K.S., Myasoutova A.A., Shmanai V.V., Ustinov A.V., Osolodkin D.I., Korshun V.A. Perylene derivatives of nucleosides: synthesis and antiviral properties. Международная конференция «Химическая биология» посвященная 90-летию академика Д.Г. Кнорре. Новосибирск, 24–28 июля 2016 г., Материалы конференции, 52.
10. Стрешнев Ф.П., **Чистов А.А.**, Апарин И.О., Сапожникова К.А., Орлов А.А., Коршун В.А., Козловская Л.И., Осолодкин Д.И., Ратхи Б., Джайн Н., Брылёв В.А. Синтез 5-(перилена-3-илэтинил)урацил уксусной кислоты и её амидов для изучения биологической активности против оболочечных вирусов. Международная конференция «Химическая биология» посвященная 90-летию академика Д.Г. Кнорре. Новосибирск, 24–28 июля 2016 г., Материалы конференции, 182.
11. Сапожникова К.А., Брылёв В.А., Стрешнев Ф.П., **Чистов А.А.** Коршун В.А. Разветвленные производные 5-(перилена-3-илэтинил)урацил уксусной кислоты в качестве противовирусных соединений. XXIX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, ИБХ, 7–10 февраля 2017 г., Сборник тезисов, 146.
12. **Чистов А.А.**, Малков А.А., Стрешнев Ф.П., Коршун В.А. Синтез и противовирусная активность ненуклеозидных производных перилена. XXIX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, ИБХ, 7–10 февраля 2017 г., Сборник тезисов, 185.
13. Speerstra S., **Chistov A.**, Proskurin G., Korshun V., Schang L. Broad-spectrum antiviral molecules with biophysical mechanisms of action. 30th International Conference of Antiviral Research (ICAR). Atlanta, GA, USA, 21–25 May, 2017, Program and Abstracts, 94.
14. Коршун В.А., Проскурин Г.В., Орлов А.А., **Чистов А.А.**, Аралов А.В., Устинов А.В. В поисках противовирусного фармакофора. МОБИ-ХимФарма2017, Севастополь, 28–31 мая 2017 г., Сборник тезисов докладов Третьего Междисциплинарного Симпозиума по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике 2017. М: «Перо», 2017, 31.
15. Orlov A.A., **Chistov A.A.**, Proskurin G.V., Ivanov N.M., Palyulin V.A., Kozlovskaya L.I., Karganova G.G., Osolodkin D.I., Korshun V.A. Structure-activity relationships for rigid amphipathic fusion inhibitors suppressing tick-borne encephalitis virus reproduction. 254th American Chemical Society National Meeting. Washington, DC, USA, 20–24 August, 2017, Onsite program, MEDI 319.
16. Сапожникова К.А., Брылёв В.А., Слесарчук Н.А., **Чистов А.А.**, Орлов А.А., Осолодкин Д.И., Козловская Л.И., Коршун В.А. Производные 5-(перилена-3-илэтинил)урацила проявляют высокую активность против оболочечных вирусов. XXX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, ИБХ, 12–15 февраля 2018 г., Сборник тезисов, 122.
17. **Чистов А.А.**, Иванов Н.М., Кутяков С.В., Орлов А.А., Устинов А.В., Коршун В.А. Производные перилена с удлиненным жестким линкером. V Всероссийская с международным участием конференция по органической химии. Владикавказ, 10–14 сентября 2018 г., Сборник тезисов, 231.
18. **Чистов А.А.**, Кутяков С.В., Михура И.В., Коршун В.А., Устинов А.В. Масштабирование синтеза противовирусного нуклеозида aUY11. V Всероссийская с международным участием конференция по органической химии. Владикавказ, 10–14 сентября 2018 г., Сборник тезисов, 404.
19. Слесарчук Н.А., **Чистов А.А.**, Стрешнев Ф.П., Коршун В.А., Устинов А.В. 5-(Перилена-3-илэтинил)урацил-1-уксусная кислота и ее производные. V Всероссийская с международным участием конференция по органической химии. Владикавказ, 10–14 сентября 2018 г., Сборник тезисов, 466.
20. **Чистов А.А.**, Проскурин Г.В., Слесарчук Н.А., Ширшин Е.А., Рубекина А.А., Сапожникова К.А., Орлов А.А., Брылёв В.А., Коршун В.А., Осолодкин Д.И., Устинов А.В. Противовирусные свойства производных перилена.

МОБИ-ХимФарма2018, Крым, Новый Свет, 23–36 сентября 2018 г., Сборник тезисов докладов Четвёртого Междисциплинарного Симпозиума по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике 2018. М: «Перо», 2018, 43.

21. Сапожникова К.А., Брылёв В.А., Слесарчук Н.А., **Чистов А.А.**, Орлов А.А., Осолодкин Д.И., Козловская Л.И., Устинов А.В., Коршун В.А. Кластеры на основе амидов 5-(перилен-3-илэтинил)-урацил-1-уксусной кислоты для изучения ингибирования репродукции оболочечных вирусов. МОБИ-ХимФарма2018, Крым, Новый Свет, 23–36 сентября 2018 г., Сборник тезисов докладов Четвёртого Междисциплинарного Симпозиума по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике 2018. М: «Перо», 2018, 177.
22. Korshun V.A., **Chistov A.A.**, Slesarchuk N.A., Sapozhnikova K.A., Nikitin T.D., Dokukin Y.S., Brylev V.A., Proskurin G.V., Aralov A.V., Kutyakov S.V., Tsygolnik D.A., Hakobyan A., Karalyan H., Schang L.M., Chekerda E.V., Galochkina A.V., Shtro A.A., Rubekina A.A., Shirshin E.A., Khvatov E.V., Kozlovskaya L.I., Osolodkin D.I., Ustinov A.V. Amphipathic polycyclic aromatics as broad-spectrum antivirals. Markovnikov Congress on Organic Chemistry. Moscow–Kazan, Russia, 21–28 June 2019, Book of abstracts, 166.
23. Слесарчук Н.А., Никитин Т.Д., Сапожникова К.А., Брылёв В.А., Устинов А.В., **Чистов А.А.** 3-Метил-5-(перилен-3-илэтинил)урацил-1-уксусная кислота и ее амиды. Всероссийская мультikonференция с международным участием «Биотехнология – медицине будущего», Новосибирск, 29 июня–2 июля 2019 г., Материалы конференции. Новосибирск: «Офсет-ТМ», 2019, 228.
24. Проскурин Г.В., Слесарчук Н.А., Никитин Т.Д., **Чистов А.А.**, Сапожникова К.А., Хватов Е.В., Орлов А.А., Черда Е.В., Галочкина А.В., Штро А.А., Брылёв В.А., Коршун В.А., Аралов А.В., Осолодкин Д.И., Устинов А.В. Противовирусные препараты широкого спектра действия. МОБИ-ХимФарма2019, Крым, Судак, 15–18 сентября 2019 г., Сборник тезисов докладов Юбилейной V Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии». М: «Перо», 2019, 48.
25. Сапожникова К.А., Никитин Т.Д., Слесарчук Н.А., **Чистов А.А.**, Брылёв В.А., Коршун В.А., Устинов А.В. Синтез производных 3-метил-5-(перилен-3-илэтинил)урацила с помощью клик-реакции. МОБИ-ХимФарма2019, Крым, Судак, 15–18 сентября 2019 г., Сборник тезисов докладов Юбилейной V Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии». М: «Перо», 2019, 219.
26. Слесарчук Н.А., Никитин Т.Д., **Чистов А.А.**, Брылёв В.А., Сапожникова К.А., Коршун В.А., Устинов А.В. Модификация фармакофорного скаффолда: амиды 3-метил-5-(перилен-3-илэтинил)урацил-1-уксусной кислоты. МОБИ-ХимФарма2019, Крым, Судак, 15–18 сентября 2019 г., Сборник тезисов докладов Юбилейной V Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии». М: «Перо», 2019, 226.
27. Михновец И.Э., **Чистов А.А.**, Мариевская К.А., Красильников М.С., Мрасов А.М., Синичич А.А., Никитин Т.Д., Рубекина А.А., Коршун В.А., Ширшин Е.А., Козловская Л.И., Штро А.А., Эйер Л., Алферова В.А., Устинов А.В. Универсальный дизайн фотосенсибилизаторов – ингибиторов проникновения суперкапсидных вирионов в клетку. Всероссийская конференция «Синтетическая биология и биофармацевтика», 24–28 июля 2022 г., Новосибирск, Россия. Материалы конференции, 204.
28. Коршун В.А., Михновец И.Э., Чумаков С.П., **Чистов А.А.**, Красильников М.С., Мариевская К.А., Уварова В.И., Осолодкин Д.И., Козловская Л.И., Алферова В.А., Устинов А.В. Фотосенсибилизаторы как противовирусные препараты широкого спектра. МОБИ-ХимФарма2023, Санкт-Петербург, 24–27 апреля 2023 г., Сборник тезисов докладов Восьмой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии». М: «Перо», 2023, 63.
29. Мариевская К.А., Красильников М.С., Чумаков С.П., Гвоздев Д.А., Житлов М.Ю., Михновец И.Э., Никитин Т.Д., **Чистов А.А.**, Коршун В.А., Алферова В.А., Устинов А.В. Амфипатические фотогенераторы синглетного кислорода ингибируют репродукцию оболочечных вирусов. X Съезд Российского фотобиологического общества, Конференция «Современные проблемы фотобиологии» пос. Шепси Краснодарского края, 10–17 сентября 2023 г., Материалы конференции. Пушино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023, 143–144.
30. Коршун В.А., Красильников М.С., Денисов В.С., Михновец И.Э., Чумаков С.П., Гвоздев Д.А., Панина И.С., Житлов М.Ю., Мазур Р.В., Никитин Т.Д., Синичич А.А., **Чистов А.А.**, Тюрин А.П., Алферова В.А., Устинов А.В. Противовирусная активность органических флуорофоров. LUMOS-2024, Всероссийская конференция по люминесценции, Москва, 23–26 апреля 2024 г. Сборник тезисов. М: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2024, 78.
31. Коршун В.А., Красильников М.С., Денисов В.С., Мазур Р.В., Никитин Т.Д., Орехов Я.Д., **Чистов А.А.**, Николаенко Я.И., Ориничева П.С., Гольденберг Е.А., Чумаков С.П., Панина И.С., Гвоздев Д.А., Алферова В.А., Устинов А.В. Мембраноактивные фотогенераторы синглетного кислорода как парадигма для противовирусных препаратов широкого спектра. МОБИ-ХимФарма2025, Санкт-Петербург, 22–24 апреля 2025 г., Сборник тезисов докладов Десятой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии». СПб: ООО «Сборка», 2025, 58.