

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ, НГУ)**

На правах рукописи

Кононова Алена Александровна

**ПСЕВДОВИРУСНАЯ СИСТЕМА НА ОСНОВЕ ВИРУСА ВЕЗИКУЛЯРНОГО
СТОМАТИТА ДЛЯ ПОИСКА ПРОТИВОВИРУСНЫХ СРЕДСТВ, ДЕЙСТВУЮЩИХ НА
ВИРУСНЫЕ ПОВЕРХНОСТНЫЕ БЕЛКИ**

03.01.03 – молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
д. м. н, член-корр. РАН,
Покровский А.Г

Новосибирск -2020

Оглавление

Оглавление	2
Список сокращений	5
Введение.....	7
1. Использование псевдовирюсов при изучении вирусных инфекций и разработке противовирусных средств (обзор литературы)	11
1.1 Псевдотипирование: естественные вирусные псевдотипы и рекомбинантные псевдовирусные конструкции.....	11
1.1.1 Области применения псевдовирусных систем	14
1.1.1.1 Изучение стадий вирусных инфекций, опосредованных поверхностными белками.	14
1.1.1.2 Серологические исследования с применением псевдовирусов	17
1.1.1.3 Вирусные векторы и рекомбинантные вирусные вакцины	18
1.1.1.4 Поиск противовирусных препаратов	20
1.1.2 Проблемы, связанные с получением и применением псевдовирусов.....	21
1.1.3 Вирусные капсиды, используемые для создания псевдотипов.....	25
1.1.3.1 Рекомбинантные ретровирусы.....	25
1.1.3.2 Рекомбинантные системы на основе вируса везикулярного стоматита	27
1.1.3.3 Другие рекомбинантные системы	32
1.2 Вирусные поверхностные белки и их роль в инфекции	33
1.2.1 Структура и функция вирусных поверхностных белков.....	33
1.2.2 Механизмы действия поверхностных вирусных белков при входе вирусюв в клетку	34
1.2.3 Поверхностные белки вируса гриппа А как фармакологические мишени.....	37
1.2.3.1 Общие сведения о вирусе гриппа	37
1.2.3.2 Гемагглютинин вируса гриппа	39
1.2.3.2.1 Структура и функция гемагглютинина	39
1.2.3.2.2 Ингибиторы начальных стадий инфекции вируса гриппа	42
1.2.3.3 Нейраминидаза и ее ингибиторы.....	43
1.2.3.3.1 Структура и функция нейраминидазы	43

1.2.3.2.2 Ингибиторы нейраминидазы.....	45
1.2.4 Применение псевдовирuсов для моделирования гриппа.....	47
1.2.5 Поверхностные белки филовирuсов	49
1.2.5.1 Общие сведения о филовирuсах	49
1.2.5.2 Структура поверхностного гликопротеина и его роль в начальных стадиях филовирuсной инфекции.....	50
2. Экспериментальная часть.....	59
2.1 Материал и методы.....	59
2.1.1 Плазмиды.....	59
2.1.2 Клеточные линии.....	60
2.1.3 Рекомбинантные ВВС	61
2.1.4 Растворы ингибиторов	61
2.1.5 Трансформация плазмидной ДНК	61
2.1.6 Выделение плазмидной ДНК	62
2.1.7 Получение псевдовирuсов на основе лентивирuсного капсида.....	63
2.1.8 Получение псевдовирuсов на основе pВВС.....	63
2.1.9 Определение трансдуцирующей способности псевдовирuсов	64
2.1.10 Образование синцитиев	65
2.1.11 Подавление псевдовирuсной инфекции VSV-ΔG-H5N1 лизосомотропными агентами	65
2.1.12 Нейтрализация VSV-ΔG-H5N1 антителами.....	65
2.1.13 Ингибирование VSV-ΔG-H5N1 карбоксилатом озельтамивира (ОК)	66
2.1.14 Создание модели многоциклоуой псевдовирuсной инфекции VSV-ΔG-MarV в клеточном монослое	66
2.1.15 Изучение противовирuсной активности производных терпеноидов	66
2.1.16 Определение токсичности исследуемых веществ	67
2.1.17 Исследование зависимости эффективности ингибиторов от момента их добавления к инфицированным псевдовирuсом клеткам (Time-of-addition assay)	67
2.1.18 Статистический анализ результатов	68
2.2 Результаты	68

2.2.1 Трансдуцирующая активность псевдовиральных препаратов.....	68
2.2.2 Определение титров псевдовиральных препаратов с помощью метода образования бляшек.....	71
2.2.3 Оценка заражаемости различных клеточных культур псевдовиралами	72
2.2.4 Трансдуцирующая активность псевдовиралов, экспрессирующих различные типы нейраминидазы.....	73
2.2.5 Гемагглютинин–опосредованный характер проникновения вируса в клетку.....	76
2.2.5.1 Ингибирование псевдовиральной инфекции лизосомотропными агентами	76
2.2.5.2 Нейтрализация псевдовиральной инфекции моноклональными и поликлональными антителами к гемагглютинуину.....	77
2.2.6 Влияние карбоксилата озельтамивира на продукцию псевдовирала и псевдовиральную инфекцию.....	78
2.2.7 Стабильность псевдовиральных препаратов VSV-ΔG-H5N1	79
2.2.8 Изучение фузогенных свойств различных гемагглютининов.....	79
2.2.8.1 Изучение трансдуцирующей активности псевдовиралов, экспрессирующих различные гемагглютинины.....	80
2.2.8.2 Синцитий-образующая способность различных типов гемагглютинина.....	81
2.2.9 Модель многоциклового заражения псевдовиральной инфекцией.....	85
2.2.10 Изучение противовирусной активности оригинальных соединений	86
2.2.11 Изучение противовирусной активности азотсодержащих производных сложных эфиров борнеола	87
3. Обсуждение результатов	92
Заключение	98
Выводы	99
Список цитируемой литературы.....	100
Приложение	116

Список сокращений

catB – катепсин В

catL - катепсин L

CC50 – 50% цитотоксическая концентрация

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

FBS – эмбриональная телячья сыворотка

GP – поверхностный гликопротеин филовирсов

HA – гемагглютинин

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

IC50 - концентрация полумаксимального ингибирования

IS – индекс селективности ингибитора

MARV – вирус Марбург

NA – нейраминидаза

NPC1 - Niemann-Pick, type C1

SC – коэффициент специфичности ингибитора

VSV-ΔG-G – рекомбинантный вирус везикулярного стоматита

VSV-ΔG-G(dsRed) – рекомбинантный вирус везикулярного стоматита с геном красного флюоресцентного белка

TPC – Two-pore channels – двупоровые каналы

ZEBOV – Вирус Эбола вида Заир

АТФ – аденозинтрифосфат

БОЕ – бляшкообразующая единица

ВГВ – вируса гепатита В

ВГС – вируса гепатита С

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВЛМ – вирус лейкемии мышей

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВПВГА – высокопатогенный вирус гриппа А

BCP- вирус саркомы Рауса

ВЧ – вирусоподобные частицы

ДМСО – диметилсульфоксид

ДТТ – дитиотреитол

МИ — множественность инфекции

МПД – муциноподобный домен

ОЛЕ – относительные люминесцентные единицы

ОК – озельтамивира карбоксилат

рВВС – рекомбинантный вирус везикулярного стоматита

ФС – фосфатидилсерин

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ЦПЭ – цитопатический эффект

ЭГТА – этиленгликольтетраацетат

ЭР – эндоплазматический ретикулум

Введение

Диагностические и экспериментальные работы с высокопатогенными вирусами требуют соблюдения целого ряда строгих правил, направленных на обеспечение личной и общественной безопасности и защиту окружающей среды. Для соблюдения этих требований необходима специальная подготовка сотрудников, а также особые материальные и инженерно-технические условия, сформулированные в международных стандартах по биобезопасности и отечественных санитарно-эпидемиологических правилах СП 1.3.3118-13 "Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)", что возможно лишь в немногих лабораториях. Для того чтобы избежать необходимости контакта исследователя с возбудителями особо опасных инфекций, разработаны модели, воспроизводящие отдельные аспекты их физиологии, в том числе, на основе псевдовирусов.

Вирусы Марбург (MARV) и Эбола (EBOV) (семейство филовирусов) являются возбудителями геморрагических лихорадок, вызывают острую тяжелую инфекцию, сопровождающуюся высокой летальностью. В настоящее время нет зарегистрированных противовирусных препаратов для лечения заболеваний, вызванных вирусами Марбург и Эбола.

Вирусы птичьего гриппа, постоянно циркулирующие среди диких водоплавающих птиц, вызывают у домашних птиц тяжелую болезнь с высоким уровнем смертности, причиняя большой экономический ущерб. Кроме того, некоторые типы, в том числе, высокопатогенные штаммы вирусов птичьего гриппа H5N1 и H7N9, оказались способными преодолевать межвидовой барьер, передаваться от человека к человеку и вызывать тяжелую инфекцию у людей с высоким уровнем летальности. Использование вакцин для контроля инфекции требует знания антигенных свойств нового циркулирующего штамма, в противном случае, эффективность вакцинации снижается. Таким образом, антивирусная терапия представляется важным средством лечения и профилактики инфекции вируса гриппа.

В ходе биологического скрининга, в том числе, с использованием специальных химических компьютерных программ, уже найдены некоторые потенциальные низкомолекулярные ингибиторы как филовирусов, так и вирусов гриппа, принадлежащие к различным классам химических соединений. Однако это не отменяет необходимости систематического поиска новых препаратов различных классов действия. Недавние вспышки птичьего гриппа и филовирусной инфекции, возможность передачи возбудителей от человека к человеку и, следовательно, быстрое неконтролируемое распространение инфекции, делают проблему поиска новых эффективных противовирусных средств особенно актуальной.

Вход вируса в клетку – привлекательная точка приложения для противовирусной терапии, так как блокирование инфекции на начальной стадии уменьшает цитопатическое действие на клетку, связанное с репликацией вируса, а также снижается риск приобретения

вирусом лекарственной резистентности. Поскольку начальные стадии инфекции, включающие в себя связывание с рецептором(ами), слияние вирусной и клеточной мембран, с последующим высвобождением вирусного капсида в цитозоль, определяются вирусными поверхностными белками, для поиска противовирусных средств данного класса можно использовать псевдотипированные вирусы – рекомбинантные, биологически безопасные вирусные частицы, имеющие капсид одного вируса и поверхностный белок другого («чужого», часто более патогенного) вируса. Использование таких частиц дает возможность осуществлять поиск специфических субстанций, ингибирующих именно начальные этапы вирусной инфекции, обусловленные «чужим белком». Биологическая безопасность псевдовирюсов определяется тем, что в клетках-мишенях они не образуют вирусного потомства благодаря целенаправленному редактированию вирусного генома. Таким образом, их применение особенно удобно в случае поиска ингибиторов высокопатогенные вирусов, так как работа с псевдовирюсами может осуществляться в лабораториях класса BSL-2 (соответствует лабораториям для работы с патогенами III-IV групп по классификации, используемой в РФ).

Еще одним важным преимуществом использования псевдовирюсов является возможность изучения отдельных стадий вирусной инфекции, обусловленных конкретными белками (в том числе, поверхностными белками, ответственными за начальные стадии инфекции), что бывает важно для четкого определения молекулярной мишени противовирусного соединения.

Целью настоящей работы являлась разработка псевдовирюсной системы на основе рекомбинантного вируса везикулярного стоматита и использование ее для поиска ингибиторов поверхностных белков филовирусов и вируса группы А субтипа H5N1.

В ходе работы необходимо было решить следующие задачи:

- Сконструировать и получить препараты рекомбинантного вируса везикулярного стоматита (pVBC), псевдотипированного поверхностными белками вируса гриппа H5N1, и охарактеризовать их трансдуцирующую активность.
- Изучить инфекционные свойства полученных псевдовирюсов
- Оценить возможность применения полученных псевдовирюсов для изучения ролей поверхностных белков вируса гриппа H5N1 в инфекции и для поиска и описания потенциальных противовирусных средств.
- Разработать модель многоциклоной инфекции pVBC с поверхностным белком GP вируса Марбург, для изучения противовирусных средств, действующих на стадии инфекции, посредством ингибирования функции этого поверхностного белка.

- Изучить противовирусную активность полусинтетических производных природных терпеноидов на модели одноциклового инфекции псевдовирuсов pBBC с поверхностными белками вируса гриппа H5N1 и псевдовирuса с поверхностным белком вируса Марбург.

Научная новизна и практическая значимость полученных результатов. Несмотря на то, что в последнее время наблюдается значительный прогресс в разработке антивирусных средств, активных в отношении высокопатогенных вирусов (к которым относятся, в том числе, вирус гриппа H5N1 и большинство филовирусов), большинство доступных терапевтических соединений обладают рядом недостатков – токсичность, недостаточная селективность, короткая продолжительность действия. Кроме того, вирусы гриппа обладают антигенной изменчивостью, что приводит к постоянному возникновению вариантов вирусов, устойчивых к имеющимся препаратам. Поскольку работа с высокопатогенными вирусами сопряжена с необходимостью соблюдения ряда требований биобезопасности, что доступно лишь ограниченному числу лабораторий, получение адекватной модельной тест – системы позволит более широкому кругу исследователей производить поиск потенциальных противовирусных агентов. В первой части работы впервые описан метод получения псевдовирuсов на основе рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного поверхностными белками вируса гриппа, получен препарат с поверхностным гликопротеином вируса Марбург, изучены их инфекционные свойства. Описанная система позволяет оптимизировать процедуру поиска и изучения эффективных антивирусных препаратов, действующих на стадии инфекции, опосредованные вирусными поверхностными белками, дает возможность оценивать эффективность кандидатных препаратов до начала их тестирования с помощью инфекционных вирусных изолятов, или же изучать механизмы действия веществ с уже выявленной противовирусной активностью. В заключительной части работы с использованием описанной системы была впервые испытана противовирусная активность группы соединений на основе природных терпеноидов. Выявлены соединения, специфически подавляющие инфекцию псевдовирuса с поверхностным гликопротеином вируса Марбург и показано, что эти соединения действуют именно на ранних стадиях псевдовирусной инфекции.

Положения, выносимые на защиту:

- Получены псевдовирусные препараты на основе капсида рекомбинантного BBC, экспрессирующие поверхностные белки вируса гриппа H5N1.
- Показано, что инфекционность полученных псевдовирuсов обусловлена именно поверхностными белками. Трансдуцирующая способность псевдовирuсов, псевдотипированных поверхностными белками вируса гриппа H5N1, зависит от активности нейраминидазы, действующей на стадии продукции псевдовирuса. Предложенная система может быть

использования для поиска и описания потенциальных противовирусных средств, действующих на стадии инфекции, обусловленные гемагглютинином и нейраминидазой вируса гриппа.

- Среди N- содержащих гетероциклических производных борнеола обнаружены соединения, блокирующие начальные стадии инфекции псевдовируса, псевдотипированного поверхностным белком вируса Марбург.

Публикации и апробация результатов. По результатам диссертации опубликовано 3 работы в рецензируемых журналах. Результаты работы представлены на международной конференции IUMS2017 (Сингапур, 2017). Получено патентное свидетельство РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 130 страницах, включает 24 рисунка, 2 таблицы и приложение. Список цитируемой литературы содержит 171 источник.

Личный вклад автора: Основная часть экспериментальной работы и аналитический анализ результатов выполнены лично автором. Выбор генов поверхностных белков вируса гриппа и конструирование плазмид было выполнено к. б. н. Разумовой Ю. В., конструирование псевдовирусов с поверхностными белками вируса гриппа осуществлялось совместно с к. б. н. Чересиз С. В., получение и обработка изображений в методе клетко-клеточного слияния выполнена в лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов НИИЭКМ, совместно с к. м. н. Чечушковым А. В.

1. Использование псевдовирюсов при изучении вирусных инфекций и разработке противовирусных средств (обзор литературы)

1.1 Псевдотипирование: естественные вирусные псевдотипы и рекомбинантные псевдовирусные конструкции

Рядом исследований отмечалось, что в результате сочетанного заражения культуры клеток различными видами вирусюв могут образовываться вирусные частицы, генотип которых не соответствует их серологическому фенотипу, притом, что сам геном не претерпевает никаких изменений [1]. Это происходит вследствие упаковки нуклеиновой кислоты одного вируса в белковый капсид/оболочку другого вируса с образованием химерного вирусного капсида или оболочки. Такой тип негенетического вирусного взаимодействия называется фенотипическим смешиванием, причем его степень может быть разной: капсид/оболочка потомства может содержать смесь белков обоих родительских вирусюв в различном соотношении или полностью состоять из капсидных белков одного вируса. Частным случаем фенотипического смешивания является псевдотипирование - встраивание некоторыми вирусями в свою оболочку гетерологичных вирусных поверхностных белков. Так, в процессе ко-культивации в клетках двух или более типов некоторых оболочечных вирусюв, образуются вирионы, имеющие смешанный серотип и измененный или более широкий (по сравнению с родительским вирусом) клеточный тропизм. Чаще всего это происходит благодаря смешению поверхностных гликопротеинов родительских вирусюв на поверхности образующихся вирионов. Такие гибридные частицы традиционно называют «псевдотипами» [2, 3]. Схожее явление – образование химерных частиц - имеет место и у безоболочечных вирусюв, например, при микст-инфекции различными штаммами энтеровирусюв.

Первый вирусный псевдотип был получен на основе вируса саркомы Рауса (BCP) [4]. Было обнаружено, что из клеток саркомы, зараженных только BCP, инфекционные вирионы не высвобождаются, однако при коинфекции вирусом лейкоза птиц, Раус-ассоциированным вирусом (PAB), происходит высвобождение инфекционного потомства BCP и PAB, которые представляют собой антигенно - неродственные птичьи альфаретровирусы, различимые серологическими методами. Серологический анализ состава вирионов с использованием различных сывороток, а также определение клеточного тропизма путем заражения различных клеточных линий *in vitro*, показали, что частицы содержали геном BCP и поверхностные белки PAB. Подобный феномен был также выявлен при совместном заражении клеток серологически различными штаммами вируса гриппа, вирусями гриппа и болезни Ньюкасла - оболочки у некоторой части потомства содержали вирусные антигены, характерные для обоих из

родительских вирусов. Способность к псевдотипированию - включению в свою мембрану поверхностных белков других (гетерологичных) вирусов была обнаружена у ретровирусов, рабдовирусов (в том числе, вируса везикулярного стоматита (BBC, англ. – VSV, *Vesicular stomatitis virus*)), герпесвирусов и др. [5].

Эти наблюдения в дальнейшем привели к попыткам целенаправленного изменения тропизма вирусов путем псевдотипирования. Псевдотипирование вируса, в наиболее часто используемом значении - это процесс образования вирусов или вирусных векторов с чужеродным вирусным оболочечным белком. Последний определяет инфекционные свойства как исходного (псевдотипирующего) вируса, так и псевдотипированного вируса, модифицируя клеточный тропизм инфекции (спектр инфицируемых типов клеток) и механизм проникновения в клетку.

Псевдотипированные (рекомбинантные) псевдовиральные конструкции используют в ряде областей фундаментальных биологических и биомедицинских исследований, а также и в ряде направлений биотехнологии, где они нашли широкое применение в качестве основы для создания рекомбинантных вакцин и геннотерапевтических векторов. В фундаментальных вирусологических исследованиях их применяют для изучения механизмов отдельных стадий вирусной инфекции, поскольку жизненный цикл рекомбинантных псевдотипированных вирусов, хоть и является сознательно разорванным путем модификаций генома для обеспечения их биологической безопасности, воспроизводит этапы жизненного цикла инфекционного вируса.

Целенаправленные генно-инженерные модификации вирусного генома делают использование псевдотипированных вирусов безопасным, поскольку они сконструированы способными заражать клетки-мишени, но не производить инфекционное вирусное потомство в зараженных клетках, являясь, таким образом, репликационно-некомпетентными, или репликационно - дефектными. Это особенно полезно при работе с псевдотипами особо патогенных вирусов, таких как вирус высокопатогенного птичьего гриппа, коронавирусы, вирусы, вызывающие геморрагические лихорадки и т.д. Кроме того, в геном рекомбинантного псевдовirusа чаще всего встроен ген репортерного белка, например, галактозидазы, люциферазы, флуоресцентного белка, экспрессия которого в клетках-мишенях обеспечивает удобство анализа процессов псевдовиральной инфекции, в том числе, количественное определение трансдуцирующей активности псевдотипа. В связи с вышесказанным, использование псевдотипов вместо инфекционных вирусных изолятов в ряде случаев предоставляет ряд уникальных технических возможностей, делает исследование более доступным с точки зрения безопасности и менее трудозатратным, так как не требует соблюдения специальных условий, необходимых для работы с инфекционными патогенами.

Вирусный геном может быть модифицирован, в частности, путем делеции/инактивации некоторых вирусных генов. Экспрессия продуктов этих «недостающих» генов, необходимых для образования псевдотипированного вириона в клетках-продуцентах, осуществляется *in-trans*, с помощью вспомогательных (хелперных) вирусов или трансфицированных плазмидных векторов. Работа с высокопатогенными вирусами связана с необходимостью соблюдать специальные условия биобезопасности (BSL-3 и BSL-4 международной классификации уровней биобезопасности, что соответствует патогенам I и II групп патогенности в российской классификации), которые включают в себя специально оборудованные помещения и допуск к работе только специально подготовленного персонала. Такие условия недоступны для большинства исследовательских учреждений. Использование репликационно - дефектных псевдотипированных вирусов вместо инфекционных вирусных изолятов позволяет соблюсти стандартные требования биобезопасности, предъявляемые к лабораториям уровня BSL-1 и BSL-2 (в которых разрешается работа с патогенами 3 и 4 групп патогенности по российской классификации, соответственно) при изучении ряда вопросов биологии и патогенеза инфекций особо патогенными вирусами, как это будет описано впоследствии.

В первую очередь, использование псевдотипов позволяет изучать процесс входа вируса в клетку, обусловленный функционированием вирусного поверхностного гликопротеина(ов), «изолированно» от дальнейших этапов вирусной инфекции, связанных с депротеинизацией вирусного капсида, репликацией вирусного генома и экспрессией вирусных генов. Это дает возможность исследовать процессы адгезии вируса на клетках, механизмы взаимодействия поверхностных вирусных белков с их рецепторами и слияние вирусной и клеточной липидных мембран, а также использование вирионом, или псевдотипом с аналогичным поверхностным белком, предпочтительных механизмов и путей внутриклеточного транспорта, до высвобождения капсида в цитоплазму, исключая при этом влияние прочих вирусных белков на процесс инфекции. В практическом отношении, псевдотипированные вирусы позволяют использование экспрессированного на мембране нативного вирусного поверхностного белка в качестве фармакологической мишени для поиска противовирусных соединений класса ингибиторов входа/слияния. Использование при получении псевдовirusного препарата плазмидных экспрессионных векторов для транскомплементации псевдотипирующего поверхностного белка значительно облегчает генетические манипуляции, направленные на изменение его структуры, в частности, путем сайт - направленного мутагенеза [6], и изучение вызванных этим изменений его функциональной активности. Например, такая схема транскомплементации исключительно удобна для изучения существующих и получения новых реассортантов вируса гриппа, появляющихся в результате антигенного шифта и способных вызывать пандемии.

Использование псевдотипированных вирусов для «изолированного» анализа функций поверхностных белков, в особенности высокопатогенных вирусов, может служить инструментом для первоначального тестирования противовирусных препаратов, существенно сокращая количество необходимых в дальнейшем экспериментов с использованием инфекционных вирусов, и интенсифицируя исследовательский процесс. Так, во время вспышек заболеваний, вызванных коронавирусом Ближневосточного респираторного синдрома [7, 8] и вирусом Эбола в 2015 году [9, 10, 11], применение псевдовирюсов существенно упростило и ускорило процесс поиска противовирусных препаратов, хотя, к сожалению, пока не привело к созданию клинически используемых препаратов.

В исследовательских работах, в зависимости от области применения, используют разные термины: «псевдотипы», «псевдовирюсы», «псевдо-частицы», «вирусные псевдотипы», «вирусные векторы», «транс-комплементарные вирусы», «репортерные вирусные частицы», «вирусоподобные частицы» и т.д., причем строение и способ получения этих частиц может несколько отличаться от описанного выше.

1.1.1 Области применения псевдовирюсных систем

1.1.1.1 Изучение стадий вирусных инфекций, опосредованных поверхностными белками

Способность вируса проникать внутрь клетки определяется взаимодействием между вирусными поверхностными белками и специфическими мембранными компонентами клетки. Заражение клетки-мишени начинается с адсорбции вирионов на ее поверхности и происходит за счет контакта белков вирусной оболочки с факторами адгезии на поверхности клетки. Это взаимодействие имеет неспецифический характер, способствует концентрации вирионов на клеточной мембране и повышает вероятность связывания вируса с его специфическим мембранным рецептором, и/или запускает захват и транспорт вириона клеткой путем эндоцитоза/пиноцитоза к внутриклеточному рецептору [12]. Взаимодействие рецептора с вирусным поверхностным белком индуцирует конформационные изменения последнего и запускает слияние липидных мембран клетки и вируса (фьюжн) и проникновение вирусного капсида внутрь клетки. Кроме того, даже в отсутствии проникновения вируса в клетку, взаимодействие поверхностного белка вируса с клеточным рецептором может активировать сигнальные каскады, стимулирующие или подавляющие иммунный ответ, секрецию цитокинов или индукцию апоптоза [13].

Большинство вирусов способны заражать только определенные типы клеток определенного круга хозяев. Наличие, а также поверхностная плотность и/или распределение соответствующих клеточных рецепторов на мембране клеток-мишеней является одним из

главных факторов, определяющих тропизм вируса. Изучение ранних стадий вирусной инфекции, механизмов проникновения вируса в клетку и его тропизма необходимо для понимания патогенеза и разработки методов лечения/профилактики вирусных инфекций.

В начале 90х годов для изучения тропизма ретровирусов активно использовали псевдотипы, получаемые в результате фенотипического смешивания при коинфекции клеток двумя вирусами [14]. Параллельно для изучения структуры и функции вирусных поверхностных белков был предложен другой подход – использование рекомбинантных псевдотипов, созданных с помощью транс-комплементации. Первые частицы, полученные таким образом, были сконструированы Page в 1990 году, и представляли собой вирионы ВИЧ-1 с отредактированным геномом и с поверхностными белками Вируса лейкемии мышей (ВЛМ) вместо собственного гликопротеина gp160 ВИЧ. В их геноме последовательность, кодирующая поверхностный белок удалена и заменена на ген гуанин-фосфорибозилтрансферазы, благодаря чему частицы становятся репликационно-дефектными. Псевдотипы получали совместной трансфекцией клеток рекомбинантным ВИЧ-1 и плазмидой, кодирующей ген поверхностного гликопротеина амфотропного ВЛМ. Клетки, трансдуцированные этим псевдовиром, экспрессируют гуанин-фосфорибозилтрансферазу, что позволяет отселектировать их на среде, содержащей микофеноловую кислоту [15]. Позже было показано, что таким способом можно получать частицы, экспрессирующие гликопротеины других ретровирусов [16]. В дальнейшем рекомбинантные ВИЧ-1, экспрессирующие различные варианты поверхностного гликопротеина gp160, широко применяли для сравнения перmissивности различных типов клеток и изучения ранних событий ВИЧ-инфекции. К настоящему времени созданы лентивирусные псевдотипы с поверхностными белками различных классов вирусов, в том числе, высокопатогенных [17]. В середине - конце 90-х годов для целей псевдотипирования вирусными гликопротеинами параллельно с лентивирусным начали использовать рабдовирусный капсид ВВС [18, 19].

Так, псевдотипы с поверхностным гликопротеином GP филовирсов успешно применялись для изучения их входа в клетку. С их помощью были выявлены некоторые различия между GP-опосредованными стадиями инфекции вирусов Марбург и Эбола. Так, например, показано, что ингибирование гликозилирования в клетках-мишенях не влияет на эффективность вход псевдотипа с поверхностным гликопротеином вируса Марбург, но существенно снижает трансдукцию псевдовируса с гликопротеином вируса Эбола, что может означать различия в поверхностных рецепторах, или, правильнее сказать, молекулах адгезии, поскольку истинный рецептор, NPC1, общий для этих родственных вирусов [20]. Отличия вирусов Марбурга и Эбола в необходимости протеолитической активации GP для входа также были выявлены с применением псевдовирсов [21]. Использование лентивирусных псевдотипов способствовало идентификации основного клеточного рецептора филовирсов -

белка Niemann-Pick C1 (NPC1) [22], а также установлению роли двупорового кальциевого канала 2 (two-pore channel 2 (TPC2)) в процессе заражения клеток вирусом Эбола [23]. Это свидетельствует о том, что псевдотипированные вирусы являются удобным инструментом для исследования механизмов входа филовирусов, позволяющим избежать использования инфекционных вирусных препаратов.

Помимо высокопатогенных вирусов, использование псевдовирюсов позволяет изучать ранние стадии инфекции труднокультивируемых вирусных патогенов, например, вируса гепатита С (ВГС) [24, 25] или Т-лимфотропного вируса человека 1 и 2 типов [26], в особенности, если рестрикция вирусной инфекции происходит после входа вируса в клетку.

Использование псевдовирюсов на основе капсидов ВВС и ряда лентивирусов, экспрессирующих поверхностные белки Е1 и Е2 различных субтипов ВГС [24], способствовало выявлению клеточных рецепторов ВГС и определению сложного каскада событий, происходящих при входе вириона ВГС в клетку [27].

Псевдотипы широко используются *in vivo* для изучения распространения вирусной инфекции в организме животного и распределения вирусов в тканях. Например, использование псевдотипов с поверхностными белками нейротропных вирусных патогенов (вирусов бешенства, лимфоцитарного хориоменингита, ВВС и т.д.), позволяет изучать транспорт вирионов, опосредуемый этими гликопротеинами, распространение вируса и течение вирусной инфекции в ЦНС в условиях *in vivo* [28]. Инъекции этих псевдотипов в головной мозг мышей и последующее посмертное исследование экспрессии репортерных генов в тканях ЦНС позволили идентифицировать типы клеток, перmissive к инфекции соответствующими нейротропными патогенами [29].

Псевдовирюсная модель является предпочтительным методом для точного анализа фенотипа белков оболочки вирусов, подверженных быстрому накоплению мутаций *in vivo*. При пассировании таких вирусов в клеточных культурах, происходит их быстрая адаптация, и, следовательно, изменение исходных биологических свойств, поскольку, в отсутствие сдерживающего влияния иммунных реакций хозяина и в клетках перевиваемых культур, отличных от природных клеток-мишеней, меняется давление отбора, действующее на вирусные квазивиды в естественных условиях [30]. Секвенирование и последующий синтез генов поверхностных белков, позволяет получить соответствующие псевдовирюсы и с их помощью оценить инфекционные свойства циркулирующих вариантов вируса. Примером является исследование входа ВИЧ-1. Быстрое накопление мутаций в результате накопления ошибок в процессе обратной транскрипции в гене *env* гликопротеина оболочки приводит к фенотипическим изменениям, таким образом, рецепторная специфичность лабораторно

адаптированных штаммов перестает соответствовать таковой природных изолятов, инфицирующих человека.

Псевдовirusы облегчают изучение молекулярных детерминант патогенности вирусов, в тех случаях, когда предполагается использование методов обратной генетики для манипуляции с поверхностными белками. Особенно актуально их использование в случае вирусов с перекрывающимися рамками считывания, где мутация в последовательности, кодирующей поверхностный белок, может привести к аминокислотной замене в других вирусных белках, таким образом, ограничивая возможность проведения сайт-направленного мутагенеза для изучения свойств функционально значимых участков в молекулах поверхностных белков. Так, например, вирус гепатита В (ВГВ) обладает высокой вариабельностью, а основные вариабельные участки находятся вблизи С-концевой части поверхностного антигена. Кроме того, геном ВГВ содержит частично перекрывающиеся рамки считывания, и, например, внесение изменений в участки, кодирующие поверхностный белок HBsAg, приводит к мутациям в гене вирусной полимеразы. Таким образом, затруднительно определить свойства разнообразных вариантов поверхностных белков изолированно от неизбежно возникающих мутаций в гене полимеразы. Псевдотипы с HBsAg позволяют обойти это ограничение и успешно используются для изучения механизмов входа ВГВ [31, 32].

Необходимо отметить, что поверхностные белки вирусов необходимы не только для прикрепления и проникновения вирионов в клетку. У некоторых вирусов часть белков оболочки обладает также ферментативной активностью, как например, нейраминидаза вируса гриппа, которая имеет решающее значение для высвобождения вновь образовавшихся вирусных частиц с поверхности зараженной клетки. Нейраминидаза специфически отщепляет остаток сиаловой кислоты от полисахаридов клеточной мембраны, тем самым разрушая рецепторы к вирусу на клетках организма-хозяина и не позволяя агрегироваться вирионам на мембране клетки в результате взаимодействия вирусного гемагглютиниона с сиаловой кислотой. Таким образом, псевдотипы с поверхностными белками гриппа позволяют изучать как самые ранние стадии инфекции – прикрепление и проникновение вириона в клетку, обусловленные гемагглютинином, так и самые поздние – высвобождение новых вирионов с поверхности клетки, которое обусловлено функционированием нейраминидазы.

Кроме того, для вирусов, имеющих на своей поверхностной мембране несколько гликопротеинов, конструирование псевдотипов с различными их сочетаниями позволяет определить механизм действия каждого из них.

1.1.1.2 Серологические исследования с применением псевдовirusов

В последнее время псевдовirusы активно применяются в качестве замены инфекционным вирусным изолятам в серологических исследованиях для определения титров

нейтрализующих антител, образующихся у вакцинированных или инфицированных пациентов. Результаты, полученные с использованием псевдовирусов с гемагглютинином H5 высокопатогенного вируса гриппа имеют хорошую корреляцию с традиционными серологическими методами – реакцией микронеutralизации и реакцией торможения гемагглютинации [33]. Для анализа с использованием псевдовирусов необходимо гораздо меньшее количество биологического образца, чем для обычных серологических методов, что объясняется более низкой плотностью гемагглютинина на поверхности псевдовируса по сравнению с вирусом дикого типа, а, следовательно, эпитопы, расположенные в области «стебля» гемагглютинина, стерически более доступны для кросс-реагирующих антител. Кроме того, используя несколько псевдотипов с различными репортными генами, возможно одновременное выявление антител к различным типам вирусов в одном биологическом образце [34].

Однако в каждом случае замена инфекционных вирусов псевдовirusами требует тщательной верификации. Например, было выявлено, что некоторые антитела к поверхностному гликопротеину GP вируса Эбола активны в отношении псевдотипов на основе BBC, имеющих этот гликопротеин, но не активны в отношении живого вируса Эбола [35]. Несоответствие также наблюдалось при сравнении результатов нейтрализации первичных вирусных изолятов и соответствующих псевдотипов ВИЧ-1 [36].

1.1.1.3 Вирусные векторы и рекомбинантные вирусные вакцины

В случае вставки в вирусный геном генов, представляющих терапевтический интерес, псевдотипированные вирусы могут применяться в качестве вирусных векторов – инструментов для доставки генетического материала в клетки – мишени (такой процесс называется трансдукцией), в том числе в терапевтических целях: для замещения нарушенной или восстановления недостаточной (отсутствующей) функции при моногенных заболеваниях, привнесения новой дополнительной функции (например, с целью борьбы с опухолевой клеткой), или для предупреждения заболевания – при использовании псевдотипов в качестве вакцин. Псевдотипирование вирусных векторов способно расширить спектр его клеточных мишеней, например, псевдотипирование поверхностным гликопротеидом G BBC обеспечивает эффективную трансдукцию почти все клеточных типов, или наоборот, ограничить его специфическими клетками, являющимися объектами экспериментального или терапевтического интереса. В то же время гетерологичные вирусные белки могут повышать трансдукционную активность вирусного вектора за счет увеличения его стабильности и/или изменения взаимодействия с иммунной системой хозяина [37, 38].

Выбор вирусного вектора для клинического использования зависит от его безопасности, стабильности, эффективности экспрессии трансгена. В настоящее время наиболее активно

изучены вирусные векторные системы на основе вируса простого герпеса, аденовирусов, аденоассоциированного вируса, ретровирусов (γ -ретровирусы и лентивирусы), поксвирусов и бакуловирусов. Будучи производными от вирусов дикого типа, вирусные векторы наследуют их специфические свойства, в том числе, нежелательные, которые необходимо учитывать при выборе вектора в зависимости от целей его использования. Геннотерапевтические векторные системы различаются по типу генома и его способности к интеграции в клеточный геном, а также по способности к доставке генов в делящиеся или неделящиеся клетки, длительности экспрессии трансгена, генотоксичности, способности вызывать воспалительный или адаптивный иммунный ответ у хозяина, а также и исходному наличию иммунитета к данному вирусу [39]. Например, для аденоассоциированных вирусов и ретровирусов характерна перманентная интеграция генома в геном клеток хозяина, таким образом, введенная генетическая информация будет дублироваться при каждом делении клетки, и передаваться каждой дочерней клетке вместе с геномом хозяина. Поэтому, несмотря на то, что вирусные частицы имеют лишь один цикл инфекции, при небольшой начальной дозе вируса, будет наблюдаться длительный терапевтический эффект. Отличие лентивирусных от прочих ретровирусных векторов, заключается в их способности трансдуцировать неделящиеся клетки, поскольку они могут транспортировать геном в форме преинтеграционного комплекса с несколькими необходимыми вирусными белками через ядерную мембрану. Кроме того, интеграция гамма-ретровирусов, в отличие от лентивирусов, происходит преимущественно вблизи промоторов, что увеличивает риск активации протоонкогенов [40, 41].

К настоящему времени проводится более 1000 клинических испытаний с использованием вирусных векторов в качестве средства доставки для генной терапии. Часть из этих испытаний успешно завершились внедрением таких продуктов в клиническую практику. В 2012 году Европе одобрено применение препарата GlyberaR, представляющего собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус для лечения хиломикронемии - редкого заболевания, связанного с дефицитом липопротеинлипазы [42], а в 2016 году был зарегистрирован препарат Strimvelis - лентивирусный вектор для лечения тяжелого комбинированного иммунодефицита (ТКИД), связанного с дефицитом фермента аденозиндезаминазы, участвующего в пуриновом обмене [43]. В январе 2018 года FDA был одобрен препарат Luxturna на основе аденоассоциированного вирусного вектора для лечения дистрофии сетчатки, связанной с мутацией гена RPE65 [44].

Вирусные векторы, доставляющие трансгены в нейроны посредством ретроградного аксонального транспорта, позволяют изучение клеточного состава, анатомии и механизмов функционирования нейронных сетей ЦНС. Этот подход также может обеспечить доставку целевого гена в заданный участок мозга, расположенный на относительно далеком расстоянии

от места инъекции вектора, то есть без необходимости обеспечения инвазивного доступа к этому участку. Создана векторная система на основе ВИЧ-1 псевдотипированного различными комбинациями поверхностного гликопротеина вируса бешенства и ВВС, обеспечивающая эффективную доставку генов в головной мозг грызунов и низших приматов путем ретроградного транспорта. Такая система может рассматриваться как потенциальный метод доставки геннотерапевтических препаратов в ЦНС [45].

Наконец, существует вариант адресной доставки лентивирусных векторов с помощью лиганд- или иммуноглобулин-нацеленного псевдотипирования. В этом случае, липидная мембрана вектора содержит два типа молекул – лиганд или иммуноглобулин, селективно связывающиеся со специфическим рецептором или антигеном на поверхности клетки, и фузогенный поверхностный белок вирусного происхождения. Последние получают с помощью методов генной инженерии из вирусных поверхностных белков слияния таким образом, что они теряют способность узнавать соответствующие им клеточные рецепторы, но сохраняют способность к слиянию вирусной и клеточной мембран. Эта концепция псевдотипирования была успешно применена для трансдукции CD20+ лимфоидных В-клеток человека. Лентивирусный вектор, псевдотипированный фузогенной молекулой на основе поверхностного белка вируса Синдбис и антителом к CD20, и несущий противоопухолевый трансген, был способен не только трансдуцировать В-клетки, но и подавлять рост ксенотрансплантированной В-клеточной опухоли у иммунодефицитных мышей [46]. В другой работе с использованием этого подхода в качестве лиганда использовалась молекула фактора роста стволовых клеток (SCF), ковалентно связанная с модифицированным гемагглютинином F вируса кори, которая нацеливала лентивирусную трансдукцию на гематопозитические стволовые клетки [47].

Еще одним применением псевдотипированных рекомбинантных вирусов является их использование в качестве вакцин. Это связано с тем, что поверхностные белки вирусов являются ключевыми антигенными детерминантами для нейтрализующих антител. Таким образом, псевдотипы, экспрессирующие на своей поверхности белки патогенного вируса могут быть безопасной альтернативой живым аттенуированным вакцинам. Вакцины против вируса гриппа, Хантаан, лихорадки западного Нила, и др. показали свою эффективность у животных [48]. На основе рекомбинантного ВВС создана вакцина против вируса Эбола, которая в настоящее время прошла третью фазу клинических испытаний [[NCT02503202](#)].

1.1.1.4 Поиск противовирусных препаратов

Псевдовirusы сегодня с успехом используются для поиска новых методов лечения вирусных инфекций, в том числе, для оценки эффективности новых химических соединений и моноклональных антител. Применение псевдовirusов, в связи с отсутствием необходимости соблюдать специальные условия биобезопасности, позволяет проводить эффективный

массовый скрининг потенциальных противовирусных препаратов и отбор наиболее эффективных веществ, которые в дальнейшем будут испытываться на инфекционных вирусных изолятах.

Еще одним важным преимуществом использования псевдовирuses является возможность более четкого определения молекулярной мишени противовирусного соединения, так как в такой системе будут эффективны только те, которые действуют на отдельных стадиях вирусной инфекции, обусловленных конкретными вирусными белками.

Псевдовирuses сегодня широко используются, например, для поиска антивирусных препаратов против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) [49, 50, 51], а во время последней вспышки лихорадки Эбола системы на основе псевдотипированных вирусов применялись для высокопроизводительного скрининга потенциальных противовирусных препаратов - ингибиторов входа филовирuses [52, 10].

Таким образом, псевдотипированные рекомбинантные вирусы являются удобным инструментом для решения некоторых фундаментальных вопросов вирусологии, а также практических медицинских задач. Однако, как любой метод, он имеет ограниченную область применения и свои недостатки. Необходимо помнить, что, как и любой метод, используемый в условиях *in vitro*, данный подход имеет определенные ограничения при тестировании так называемых про-лекарств, которые должны пройти метаболическую трансформацию для реализации терапевтической функции. Для этого необходим тщательный подбор клеточных линий, в которых возможно метаболическое превращение про-лекарства в лекарство.

1.1.2 Проблемы, связанные с получением и применением псевдовирuses

Опыт конструирования различных вирусных псевдотипов указывает на то, что существуют предпосылки и необходимые условия для конструирования трансдукционно - активных псевдотипов, несоблюдение которых может ограничивать их получение и использование.

Прежде чем принять решение об использовании псевдовирuses в качестве средства исследования, необходимо убедиться, что те преимущества, которые исследователь при этом получает, перекроют сопряжённые с данным методом трудности. В том числе, необходимо оценить, будет ли достаточной точность воспроизведения изучаемого аспекта вирусной биологии в псевдовирuses-клеточной системе для решения поставленной задачи.

Окончательная сборка вирионов и их облачение в липидную мембрану - сложный процесс, требующий координированного взаимодействия нескольких вирусных белков между собой и с клеточными структурами. Приобретение вирусами липидной оболочки вместе с встроенными в нее поверхностными гликопротеинами может происходить двумя способами: 1) в результате взаимодействия агрегатов вирусных капсидных и нуклеокапсидных белков с

липидной мембраной клетки, одновременно с процессом отпочковывания вириона; или же 2) в результате взаимодействия предварительно собранного в цитоплазме вирусного капсида с трансмембранными вирусными гликопротеинами [53].

Успешное псевдотипирование определяется рядом биологических и технических факторов, а неоптимальное псевдотипирование выражается в низком инфекционном (трансдуцирующем) титре псевдовirusного препарата. Существует ряд аспектов вирусной биологии, которые следует учитывать при попытке получения новых псевдотипов. Важно иметь в виду, что не существует унифицированного экспериментального подхода для получения различных псевдотипов. «Первая» неудачная попытка получить псевдотип на основе конкретного вирусного капсида не означает принципиальную невозможность его получения. Например, нередко редактирование последовательности гена поверхностного белка ведет к изменениям его структуры, незначительным в отношении его функциональной активности, но значительно повышающими его способность псевдотипировать вирусный капсид.

Рядом исследований показано, что для некоторых вирусов на эффективность образования псевдотипов влияет длина цитоплазматического домена поверхностного белка: его делеция обеспечивает эффективное образование псевдотипированного вириона [54]. Так, делеция цитоплазматического хвоста поверхностного гликопротеина gp160 ВИЧ не меняет его рецепторной специфичности и спектра клеток-мишеней, но обеспечивает успешное псевдотипирование ретровирусного капсида MLV и рабдовирусного капсида VSV, невозможное в случае нативного gp160 [55]. Вероятно, это происходит благодаря уменьшению внутриклеточного накопления и повышению экспрессии гликопротеина на плазматической мембране, что повышает эффективность сборки поверхностного белка и отпочковывающегося от нее лентивирусного капсида или в результате преодоления стерических ограничений, налагаемые длинным цитоплазматическим концом при «насаживании» на капсид.

Кроме того, замена цитоплазматического домена псевдотипирующего гликопротеина на аналогичный домен поверхностного белка ВИЧ, VSV, ВЛМ, также способна повышать эффективность образования ретровирусных псевдотипов. Впрочем, некоторые вирусные гликопротеины не способны псевдотипировать капсид ВЛМ, даже несмотря на модификации цитоплазматического хвоста [56]. Также необходимо учитывать, что изменение цитоплазматического домена, теоретически, способно приводить к непредсказуемым изменениям нативной структуры и функции гликопротеина.

Одной из причин неудачного псевдотипирования вирусного капсида поверхностными белками гетерологичного вируса может являться несоответствие компартментов накопления синтезированного псевдотипирующего поверхностного белка и сборки капсида. Например, получение лентивирусов, псевдотипированных поверхностным белком вируса Денге возможно

только после модификации гена поверхностного белка флавивируса. Попытка «напрямую» получить такой псевдотип не приносит положительного результата в связи с тем, что сборка лентивирусных частиц и встраивание в их оболочку поверхностного гликопротеина происходит на плазматической мембране клетки, преимущественно, в областях микродоменов клеточной мембраны, называемых липидными рафтами, а сборка вириона флавивируса, вызывающего лихорадку Денге, (включая и его поверхностный белок) происходит в структурах эндоплазматической сети с последующим созреванием формирующихся вирусных частиц в везикулах, транспортируемых к плазматической мембране. Из этого следует, что шанс флавивирусного поверхностного белка PrM/E быть встроенным в лентивирусную частицу непосредственно на поверхностной мембране достаточно низок. Замена его трансмембранного домена на трансмембранный и цитоплазматический домены гликопротеина G ВВС, обеспечивает его транспорт на поверхностную мембрану, что делает возможным образование псевдотипов [57]. Аналогичный подход был применен, для получения лентивируса, псевдотипированного поверхностным белком F вируса Сендай: было показано, что замена цитоплазматического конца белка F на цитоплазматический конец gp160 ВИЧ усиливает эффективность его встройки в псевдолентивирусные частицы [58]. Однако подобный подход работает не всегда - некоторые белки не включаются в псевдотип даже несмотря на их ко-локализацию с псевдотипируемым капсидом. Другими словами, ко-локализация структурных компонентов псевдовirusа (капсида и гетерологического поверхностного белка) в одном клеточном компартменте является необходимым, но не достаточным условием для образования псевдотипов.

Кроме того, на эффективность образования псевдовirusов существенное влияние оказывает уровень экспрессии поверхностного белка. Например, уровень экспрессии поверхностного белка S короновируса ТОРС (Тяжелый острый респираторный синдром) в клетках линии 293Т, наиболее часто применяемых в качестве клеток-продуцентов псевдовirusов, очень низкий, но кодонная оптимизация гена S резко повышает его экспрессию в клетках-продуцентах и, соответственно, выход псевдотипов [8]. Необходимо отметить, что для псевдотипирования наряду с выделенными вирусными последовательностями дикого типа, широко используются искусственно синтезированные гены поверхностных белков [59, 60, 61] и оптимизация первичной нуклеотидной последовательности ДНК часто входит в пакет услуг фирмы по синтезу заказанного гена.

Помимо кодонной оптимизации последовательности гена, существуют другие варианты воздействия на уровень экспрессии гликопротеина на мембране. Примером является получение ретровirusных псевдотипов с белками вируса гепатита В (ВГВ). Хотя трансляции большого поверхностного антигена ВГВ в клетках-продуцентах псевдовirusов достаточно для получения

трансдукционно-активных ВЛМ-псевдотипов, сочетанная трансляция в них малого поверхностного антигена увеличивает экспрессию большого поверхностного антигена на клеточной мембране, и, таким образом, увеличивает трансдуцирующий титр образующихся псевдотипов [62]. Однако, другое исследование, в ходе которого сравнивали эффективность образования ВВС-псевдотипов с малым и большим поверхностным антигеном ВГВ, демонстрирует противоположный результат [31].

Многим вирусам для успешной инфекции необходима активация поверхностных белков протеазами клетки хозяина, соответственно, важнейшим фактором, способствующим приобретению некоторыми псевдотипами способности трансдуцировать определенные типы клеток–мишеней, является необходимость дополнительного использования протеаз. Например, различным типам вируса гриппа человека необходимо расщепление гемагглютинина протеазами хозяина для приобретения способности к слиянию вирусной мембраны с мембраной клетки–мишени [63]. То же самое касается расщепление протеазами F белка-предшественника парамиксовирусов и гликопротеина-предшественника ВИЧ gp160 [64, 65]. Коронавирусам клеточные протеазы необходимы как для расщепления поверхностного белка в процессе входа, так и для облегчения выхода вирусной частицы из клетки-хозяина [66]. Указанная проблема решается несколькими способами. Во многих исследованиях используют метод ко-трансфекции плазмид для экспрессии гена протеазы вместе с другими плазмидами, необходимыми для производства псевдотипов. Для вируса гриппа, например, наиболее часто используемые протеазы TMPRSS2, TMPRSS4 и HAT, доставляемые отдельными плазмидами [67, 68]. Альтернативным подходом является активация поверхностных белков путем добавления очищенной протеазы в культуральную среду или очищенный препарат псевдотипа. Так, добавление экзогенного TPCK – трипсина способствует активизации коронавирусов человека и вирусов гриппа [69]. Впрочем, последний способ, однако ставит дополнительную задачу - деактивация протеазы перед добавлением псевдотипированного вирусного препарата к клеткам – мишеням.

Необходимо учитывать, что эффективность включения псевдотипирующего гликопротеина в мембрану может отличаться от таковой аутентичного вируса [70], поэтому инфекционность псевдотипа может быть сопоставлена с инфекционностью живого вируса лишь только качественно, но не количественно.

Описанные факты демонстрируют, что, несмотря на широкое применение рекомбинантных псевдотипированных вирусов, сегодняшний уровень знаний о предпосылках и условиях успешного псевдотипирования пока еще недостаточен для теоретического предсказания трансдукционных качеств определенного (нового) псевдотипа, и зачастую конструирование вирусных псевдотипов является чисто эмпирической областью.

1.1.3 Вирусные капсиды, используемые для создания псевдотипов

В качестве основы для получения псевдотипов могут быть использованы капсиды различных вирусов – ретровирусов, бакуловирусов, рабдовирусов, герпесвирусов, поксвирусов и т.д. Наиболее часто используются системы на основе ретровирусов, в том числе гамма-ретровируса ВЛМ и лентивирусов.

1.1.3.1 Рекомбинантные ретровирусы

Первые псевдолентивирусы на основе ВИЧ-1, созданные в начале 1990-х годов, получали путем ко-трансфекции клеток-продуцентов двумя плазмидами - векторной, содержащей полный геном лентивируса с инактивированной рамкой считывания гена поверхностного гликопротеина Env, и плазмидой, экспрессирующей ген поверхностного белка Env ВИЧ-1 [15]. Такие частицы проходят только один цикл инфекции, так как в клетку-мишень не попадает ген *env*, необходимый для формирования полноценной инфекционной вирусной частицы.

Благодаря способности интегрировать свой геном в клетки-хозяина, ретровирусы изначально рассматривали в качестве векторов для генной терапии, особенно подходящих в ситуациях, когда необходима длительная экспрессия трансгена. Поскольку ВИЧ является патогенным для человека, вопрос о безопасности использования векторов на его основе стоит особенно остро. Несмотря на репликационную некомпетентность, биологическая безопасность первых рекомбинантных лентивирусов была несовершенной - одного рекомбинационного события между кассетой провируса и кассетой Env было бы достаточно для восстановления структуры репликационно - компетентного лентивируса. С момента появления, система псевдолентивирусов претерпела многократные модификации - функциональное разделение вирусных детерминант на отдельные экспрессионные единицы, удаление генов вспомогательных белков и модификация промоторных последовательностей пакующей кассеты - направленные на минимизацию риска возникновения в организме репликационно-компетентных вирионов в результате рекомбинационных событий между гомологическими вирусными последовательностями. На основании этих изменений принято выделять четыре поколения псевдовидов ВИЧ.

Широкое применение нашла трехплазмидная экспрессионная система, в которой цис- и транс-детерминанты функционально разделены на две отдельные экспрессионные единицы, расположенные на разных плазмидах (Рисунок 1). Векторная/трансдуцируемая, содержит кассету репортерного гена и *cis*-элементы - регуляторные последовательности нуклеиновой кислоты, необходимые для ее упаковки в векторную частицу (в клетках-продуцентах), для обратной транскрипции, ядерного импорта и интеграции в геном клетки-мишени векторного трансгена. Вторая, упаковочная/хелперная плазмида обеспечивает экспрессию необходимых

вирусных структурных белков (Gag и Pol), *in trans*. Третья плазмида кодирует гетерологичный поверхностный белок (Env) для образования псевдотипированных частиц. Гены структурных белков могут экспрессироваться в клетках - продуцентах кратковременно, посредством транзиторной трансфекции кодирующей их хелперной плазмиды, либо постоянно, будучи интегрированными в геном так называемых клеток-продуцентов упаковочной линии в результате стабильной трансфекции этой же плазмиды. Так как экспрессионные кассеты *gag/pol* и *env* лишены упаковочной последовательности, следовательно, мРНК, кодирующая вирусные структурные белки, не сможет упаковаться в лентивирусные частицы.

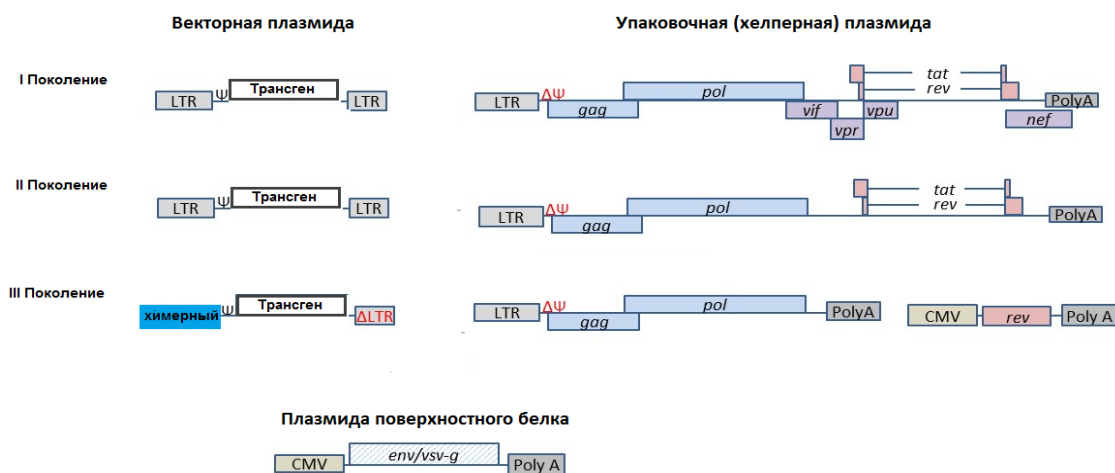


Рисунок. 1 Эволюция экспрессионных кассет для получения лентивекторов.

В дальнейшем, на отдельную плазмиду была вынесена последовательность гена *rev*, продуктом которого является регуляторный белок REV/Regulator of expression of viral proteins, обеспечивающий экспорт неполностью сплайсированных молекул вирусной мРНК (например, транскрипта *gag-pol*) из ядра. Это было сделано для того, чтобы сделать экспрессию Rev независимой от экспрессии гена вирусного гликопротеина ВИЧ-1 gp160, что связано с перекрыванием рамок считывания генов *rev* и *env* в вирусном геноме ВИЧ-1. Возможность *env*-независимой гиперэкспрессии белка Rev значительно повышает эффективную экспрессию других вирусных транскриптов и, соответственно, трансдуцирующий титр образующегося лентивирусного псевдотипа [71].

В настоящее время широко используется псевдолентивирусная система, в которой псевдовиральные частицы получают методом трансфекции клеток-продуцентов векторами мультиплазмидной системы из 4–5 плазмид: одна для векторного генома, вторая для Gag-Pol, третья для Rev, еще одна или две для белка(ов) оболочки, или для коэкспрессии меченного вирусного белка, как GAG-GFP или VPR-GFP, основным преимуществом которой является безопасность, благодаря минимальному риску образования репликационно-компетентного вируса.

Двух и трехплазмидная система, структурно схожая с лентивирусной системой, существует для гамма-ретровируса ВЛМ. ВЛМ не патогенен для людей и имеет меньше вспомогательных белков по сравнению с ВИЧ. Она была лидирующей векторной системой до появления второго и третьего поколений лентивирусной системы, ее использовали для получения первых геннотерапевтических векторов для трансдукции гематопозитических стволовых клеток костного мозга человека [72, 40].

1.1.3.2 Рекомбинантные системы на основе вируса везикулярного стоматита

Альтернативой псевдолентивирусной системе, к тому же обладающей определенными преимуществами перед первой при изучении вирусных поверхностных белков, может являться псевдовирусная система на основе ВВС.

Вирус везикулярного стоматита (ВВС, англ. Vesicular stomatitis virus, VSV) – это оболочечный вирус семейства *Rhaboviridae* рода *Vesiculovirus*. У крупного рогатого скота, непарнокопытных и свиней вирус вызывает болезнь, по клиническим проявлениям схожую с ящуром, протекающую с разной степени тяжести – от легкой до смертельной, в то время как случаи симптоматической инфекции человека ВВС редки, а если случаются, то протекают в мягкой форме. Работа с ним может производиться в лабораториях уровня биологической безопасности BSL-2. ВВС был моделью для изучения многих аспектов жизненного цикла РНК-содержащих вирусов, а также для изучения процессов молекулярной эволюции вирусов. Благодаря безопасности для человека, а также способности продуцировать высокий титр при культивировании в перевиваемых клеточных культурах, ВВС рассматривается в качестве кандидата для создания противовирусных вакцин. Наиболее успешным примером является живая аттенуированная вакцина против вируса Эбола, представляющая собой рекомбинантный ВВС, в геноме которого ген собственного поверхностного белка G заменен на ген поверхностного гликопротеина вируса Эбола типа Заир, и показавшая высокий профилактический эффект.

Кроме того, поскольку ВВС обладает тропизмом к опухолевым клеткам, на его основе были созданы онколитические платформы, которые, как предполагается, могут стать потенциальными средствами для борьбы против рака, так как целенаправленно уничтожают только опухолевые клетки, здоровые оставляя интактными [73]. Онкоселективность ВВС объясняется чрезвычайной чувствительностью к противовирусному действию интерферонов I типа: опухолевые клетки имеют дефектный ответ на индукцию интерфероном, что допускает репликацию вируса и ведет к лизису трансформированной клетки, в то время как в клетках нормальных запуск интерферонового сигналинга сдерживает размножение вируса на самых ранних стадиях [74]. Для усовершенствования безопасности, онкоселективности и

онкотоксичности, с помощью методов обратной генетики были созданы различные рекомбинантные вирусы на основе ВВС, разрабатываются различные методы его доставки в организм для минимизации его элиминации из организма. Так, созданы рекомбинантные ВВС (pВВС), несущие на своей поверхности антитела против рецепторов, экспрессирующихся на опухолевых клетках, что, таким образом еще более повышает их онкоселективность. Многие исследования показали успешность использования ВВС для борьбы с опухолями различных типов на животных моделях, особенно в сочетании с радиотерапией, химиотерапией или в комбинации с другими онколитическими вирусами. В настоящее время начата первая фаза клинических испытаний рекомбинантного ВВС для борьбы с устойчивыми к лечению другими средствами солидными опухолями и гемобластозами [NCT01628640, NCT03017820].

Известны два серотипа ВВС: Нью-Джерси и Индиана, они имеют схожие свойства, однако в молекулярно-биологических исследованиях первый используется гораздо чаще.

Зрелый вирион имеет форму пули с закруглённым концом и уплощенным дном, около 180 (100-430) нм длиной и 80 (45-100) нм шириной. Геном ВВС, представленный одноцепочечной несегментированной РНК отрицательной полярности ((-)РНК), кодирует 5 главных белков: гликопротеин (G), матриксный белок (M), нуклеопротеин (N), большую субъединицу полимеразы L (от англ. Large), фосфопротеин (P) [75]. Белок N заключает всю геномную РНК в нуклеокапсид, устойчивый к действию РНКаз. В цитоплазме, до ассоциации с РНК, происходящей во время сборки вириона, нуклеопротеин (N) связан с фосфопротеином Р и, таким образом, поддерживается в растворимом состоянии. Репликация вируса происходит в цитоплазме. Большая субъединица (L) и фосфопротеин (P) формируют РНК-зависимую РНК-полимеразу. В течение жизненного цикла вируса она проявляет две различные активности – транскрипционную и репликативную, причем они осуществляются различными полимеразными комплексами: L-(P)₃- транскриптаза и N-P-L – репликаза. Полимеразные комплексы упаковываются в образующийся вирион, т. к. на первом этапе репликации необходима транскрипция (-)РНК в мРНК, а инфицированные клетки не имеют соответствующего фермента для осуществления этого процесса. Матриксный белок М играет важную роль в процессе сборки и отпочковывания вирусных частиц. Интересно, что именно он несет ответственность за цитопатический эффект, связанный с инфекцией ВВС, так как даже экспрессия одного матриксного протеина вызывает характерное для ЦПЭ округление клеток [76].

Поверхностный гликопротеин G отвечает за связывание с поверхностью клетки-мишени, вход вириона в клетку путем эндоцитоза и слияние вирусной и клеточной мембран. Долгое время считалось, что фосфатидилсерин является клеточным рецептором ВВС [77], однако, недавно было показано, что рецептор липопротеинов низкой плотности (ЛПНП-рецептор) и

другие представители рецепторов этого семейства, включая LRP1, LRP3, LRP4, LRP6 и сортилин служат рецепторами для BBC [78]. BBC обладает широким клеточным тропизмом – способен заражать почти все типы клеток человека, а поверхностный гликопротеин G часто используется для псевдотипирования других векторов. Вход BBC в клетку является pH-зависимым процессом, оптимальный уровень pH для слияния вирусной и клеточной мембран должен быть около 6.0, хотя этот процесс может происходить и при других значениях.

Сборка вирусных частиц в инфицированных клетках происходит на плазматической мембране. При отпочковывании BBC приобретает оболочку, состоящую из липидного бислоя клеточной мембраны и тримеров гликопротеина G. Важным свойством BBC является то, что его вирионы не селективны в отношении поверхностного белка, который включается в их оболочку. В отсутствие гликопротеина G могут образовываться «лысые» неинфекционные частицы, хотя и с меньшей эффективностью. Такие частицы могут псевдотипироваться поверхностными белками других вирусов, если те экспрессируются на поверхности клетки. Это свойство сделало возможным создание рекомбинантного BBC (VSV-ΔG-G), в геноме которого ген, кодирующий собственный гликопротеин G, замещен репортерным геном, кодирующим флюоресцентный белок или люцифразу (Рисунок 2).

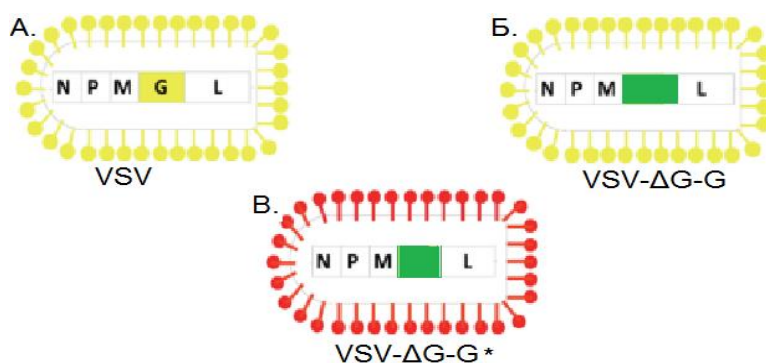


Рисунок 2. Схематичное изображение вирионов BBC дикого типа (А), рBBC, кодирующего репортерный ген (обозначен зеленым цветом, Б) и псевдотипированного рBBC (В). Желтым цветом обозначен гликопротеин G BBC, красным цветом – гетерологичный белок (G*).

Получение псевдовирюсов BBC происходит в результате сочетанной трансфекции клеток-продуцентов плазмидами экспрессии вирусных поверхностных белков и инфекции рекомбинантным BBC. Ее применение описано для поверхностных белков вирусов гепатита В и С, Марбурга, Эболы, венесуэльского энцефаломиелита лошадей, Т-лимфотропного вируса человека 1 и 2 типов и многих других [79].

Сам VSV-ΔG-G также получают в клеточных культурах, процесс состоит из нескольких последовательных стадий (Рисунок 3). Клетки почки детенышей хомячков линии ВНК (baby hamster kidney) заражают рекомбинантным вирусом осповакцины, экспрессирующей РНК-

полимеразу бактериофага T7 (vvT7) и затем трансфицируют пятью плазмидами: плазмидой, экспрессирующей антигенную (т.е. положительной полярности, (+-sense)) РНК ВВС, в которой ген гликопротеина G заменен на ген-репортер (pVSVΔG) и четырьмя добавочными плазмидами, кодирующими белки N (pN.exp), Р (pP.exp), G (pG.exp), и L (pL.exp), каждый находится под контролем промотора T7 (Рисунок 3, I). Благодаря этой процедуре образуется VSV-ΔG-G, но низкого титра, и, далее, с целью повышения трансдуцирующего титра, полученный вирус добавляют клеткам, предварительно трансфицированным плазмидой, экспрессирующей поверхностный гликопротеин G под контролем сильного промотора (Рисунок 3, II). Затем полученный вирусный препарат очищают и определяют трансдуцирующий титр методом бляшкообразования в клеточном монослое, экспрессирующем гликопротеин G, поскольку образование бляшек возможно только при многоциклового репликации вируса (Рисунок 3, III-IV). При заражении полученным VSV-ΔG-G клеток, экспрессирующих на мембране поверхностные гликопротеины (или комплекс гликопротеинов) гетерологичного вируса (G*), образуются псевдовirusы VSV-ΔG-G*. Инфекционность таких частиц - псевдовirusов определяется уже поверхностными белками гетерологичного вируса, и ограничивается лишь одним циклом инфекции, что обеспечивает биологическую безопасность этой системы [80].

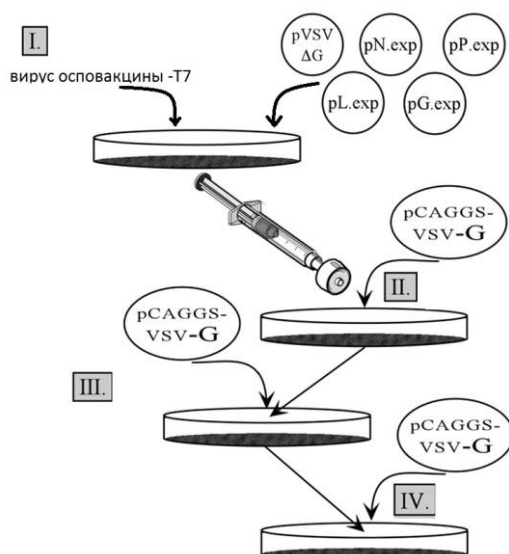


Рисунок 3. Получение VSV-ΔG-G и его амплификация. I. Получение VSV-ΔG-G из плазмид. II - IV. Амплификация VSV-ΔG-G и определение трансдуцирующего титра. Адаптировано из [80].

Псевдотипированные ВВС имеют существенные преимущества по сравнению с псевдолентивирусной системой. Во-первых, работа с этой системой является менее трудоемкой, так как требует использования вместо 4-5 плазмид (в псевдолентивирусной системе новых поколений) только плазмиду(ы), кодирующей(их) поверхностные белки. Во-вторых, ВВС имеют более высокий трансдуцирующий титр по сравнению с псевдолентивирусами, и в силу

особенностей репликационного цикла ВВС и лентивирусов, количественное определение продукта репортерного гена в случае ВВС возможно проводить гораздо раньше (быстрее), чем у псевдолентивируса: через 7–16 ч после инфекции ВВС по сравнению с 48-часовым промежутком для псевдолентивирусов. Псевдотипированные ВВС являются более термостабильными и дольше хранятся при 4⁰С, а также выдерживают многократные циклы замораживания-оттаивания [81]. Наконец, еще одно преимущество модели VSV-ΔG псевдовirusа, особенно важное для изучения вируса гриппа, связано с возможностью построения на основе таких псевдовirusов многоциклового модели распространения вирусной инфекции в клеточном монослое. Инфекция VSV-ΔG способна проходить через множество циклов, пока на поверхности клетки будут экспрессироваться поверхностные белки, например, поверхностные белки гетерологичного virusа, доставленные *in-trans* методом трансфекции (Рисунок 4).

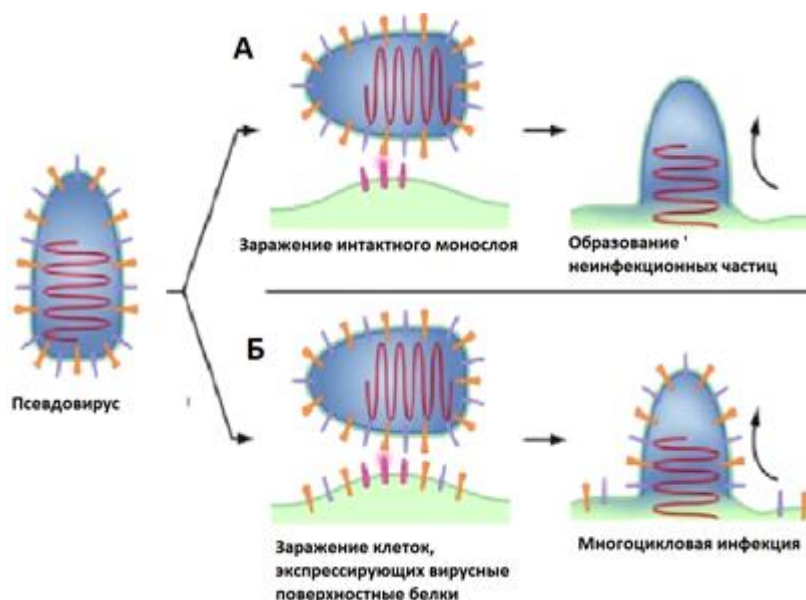


Рисунок 4. Возможность моделирования одноциклового и многоциклового инфекции VSV-ΔG.

А. Заражение интактных клеток (не экспрессирующих вирусные поверхностные белки на своей поверхности). Отпочковывающиеся от поверхности зараженных клеток вирионы не имеют поверхностных белков и являются неинфекционными. Один цикл инфекции. Б. Заражение клеток, экспрессирующих вирусные поверхностные белки. Образующиеся псевдовirusы имеют поверхностные белки и способны к реинфекции клеток-мишеней – второй и последующие циклы инфекции.

Псевдолентивирусная система ограничивается лишь одним поколением псевдовirusов, поскольку в инфицированных ими клетках отсутствуют вирусные белки, необходимые для образования вирусного потомства. Многоцикловая модель дает возможность изучения кумулятивного действия ингибиторов, а также, в случае наличия нескольких поверхностных

белков, действующих на различных стадиях вирусного жизненного цикла (как в случае вируса гриппа), позволяет изучать их различные комбинации.

1.1.1.3 Другие рекомбинантные системы

Для изучения отдельных стадий жизненного цикла вирусов, поиска противовирусных веществ и для оценки нейтрализующей способности антител, используются вирусоподобные частицы (ВЧ), получаемые с помощью методов обратной генетики. При заражении клеток-мишеней, они также проходят часть жизненного цикла вируса от входа до репликации, но не способны образовывать потомство в связи с отсутствием необходимых структурных компонентов в их геноме.

Субгеномные вирусные репликоны, несущие последовательности, контролирующие важнейшие функции вируса – репликацию, упаковку (иногда – проникновение в ядро), а также репортерные гены, упаковываются в ВЧ с помощью структурных белков, доставляемых *in trans*.

В отличие от псевдотипированных вирусов, ВЧ имеют на своей поверхности те же поверхностные белки, следовательно, лишены недостатков, характерных для вышеописанных псевдотипированных систем: несоответствия морфологии капсидов псевдотипированных вирусов и псевдотипирующего вируса, которое может приводить к несоответствию механизмов входа псевдотипа и исходного вируса в клетки-мишени, а также необходимости дополнительных модификаций поверхностных белков (которое может потребоваться при использовании псевдотипированных чужеродными белками лентивирусов), потенциально способных приводить к изменению их функции.

Описаны различные варианты получения флавивирусных (вируса Японского энцефалита, лихорадки Денге, Западного Нила), филовирусных, коронавирусах, ортомиксовирусных ВЧ [82, 83, 84, 85]. Были получены ВЧ высокопатогенного вируса гриппа, у которого ген гемагглютинина заменен на ген зеленого флюоресцентного белка. Образование вирусного потомства возможно только в клетках, экспрессирующих гемагглютинин, поэтому такие вирусные частицы могут использоваться в лабораториях (BSL-2) [86].

Отдельным направлением для количественного учета трансдуцирующей активности псевдовирuсов является использование меченных флюоресцентными или иными маркерными белками структурных вирусных белков. Так, на основе лентивириона были впервые сделаны конструкции Vpr-BLAM, представляющие собой частицы, состоящие из поверхностного гликопротеина вируса и белка Vpr, соединенных с репортерным белком – бета-лактамазой. Такие частицы получены с белками вируса гриппа, ВИЧ, филовирусов. После слияния мембраны клетки и ВЧ посредством поверхностного белка, комплекс Vpr - бета-лактамаза высвобождается в цитозоль. Если клетки-мишени предварительно «нагружены» флюоресцентным субстратом, который, разрезаясь бета-лактамазой, меняет спектр эмиссии с

зелёного на голубой, то появляется возможность детектировать успешный вход псевдотипа ВИЧ в клетку с помощью проточной цитометрии, микроскопии, либо, наиболее часто, флуориметрии в планшетном формате непосредственно после высвобождения Vpr-бета-лактамазы, то есть, после раздевания капсида (через 4-12 часов, в зависимости от вируса), исключая роль последующих событий [87].

Для изучения функций вирусных поверхностных белков слияния может быть использован метод клеточного слияния, благодаря экспрессии этих белков на поверхности клеточных мембран. Так, с его помощью можно определить функциональную значимость мутаций, эффективность субстанций, блокирующих белок слияния или клеточный рецептор, а так же выяснить, экспрессируется ли белок слияния на поверхностной мембране. Однако этот метод не точно и не в полной мере воспроизводит события, происходящие при проникновении вируса в клетки и слиянии вирусной и клеточной мембран. Например, он не подходит для выявления клеточных факторов, активирующих вирусные белки слияния, событий, происходящих внутри клетки до слияния вирусной и клеточной мембран, и, следовательно, не подходит, в том числе, для изучения вирусных белков слияния, использующих внутриклеточные рецепторы.

Липосомы с заключенными в их мембраны поверхностными вирусными белками также позволяют изолированно исследовать белки слияния без влияния клеточных факторов [88]. Однако морфологические свойства липосом, а также состав и, следовательно, физико-химические свойства липосомальной мембраны, могут существенно отличаться от вирусной и клеточной мембран, что может искажать результаты.

Таким образом, каждый из имеющихся методов изучения вирусных поверхностных белков имеет свои преимущества и недостатки, и должен применяться исходя из того, какие задачи необходимо решить, какие из изучаемых факторов наиболее важны, а какими можно пренебречь.

1.2 Вирусные поверхностные белки и их роль в инфекции

1.2.1 Структура и функция вирусных поверхностных белков

Вирусные поверхностные белки выполняют несколько задач в жизненном цикле вирусов. В первую очередь, они ответственны за связывание с рецептором на поверхности клетки - мишени, и, в случае оболочечных вирусов, за запуск слияния мембран. На поверхности вириона поверхностные белки представлены в виде гликопротеинов. Рецептор-связывающий белок и белок слияния чаще всего синтезируются в виде полипептида – предшественника, на поверхности вириона они могут присутствовать в виде различных субъединиц одного гликопротеина, или в виде двух различных молекул (как например, у герпесвирусов [89]). То

есть, количество различных гликопротеинов, присутствующих в вирусной мембране, у разных вирусов варьирует.

Поверхностные гликопротеины функционируют не только в начале вирусного цикла, но и на его последних стадиях. Так, некоторые вирусы имеют нейраминидазу, которая, расщепляя остатки клеточных сиаловых кислот, способствует отсоединению вириона от поверхности клетки и дальнейшему распространению вирусной инфекции. Нейраминидаза может присутствовать в виде отдельной молекулы, как например, у ортомиксовирусов, так и в составе молекулы, выполняющей, кроме того, рецептор-связывающую функцию. Так, например, у некоторых парамиксовирусов, гемагглютинин, связывающийся с клеточными сиаловыми кислотами, и нейраминидаза, расщепляющая их, находятся в разных субъединицах одной молекулы, называемой гемагглютинин-нейраминидаза (HN), слияние же мембран запускает отдельных белок (F) [90]. Помимо поверхностных гликопротеинов, некоторые вирусы имеют особые мембранные белки, действующие как ионные каналы [91].

Далее рассмотрим процессы, обеспечиваемые функционированием вирусных поверхностных белков во время входа вирусов в клетку, важнейшего процесса, без которого невозможно проникновение капсида оболочечного вируса внутрь клетки - мишени.

1.2.2 Механизмы действия поверхностных вирусных белков при входе вирусов в клетку

Существует два основных пути входа оболочечных вирусов в клетку: в первом случае вход вириона происходит в результате слияния вирусной мембраны и плазматической мембраны клетки непосредственно на поверхности клетки, во втором - после попадания вириона в эндосому, где под воздействием кислого pH происходит активация вирусного поверхностного белка, ведущая к слиянию вирусной мембраны с эндосомальной мембраной, или, как, например, в случае филовирсов, после слияния эндосомы и лизосомы - с лизосомальной мембраной [92].

Слияние мембран вируса и клетки-мишени подразумевает тесное сближение двух липидных бислоев с изменением кривизны каждого из них и, наконец, их объединения с образованием поры, через которую вирусный капсид проникает в цитоплазму. И хотя, в целом, это энергетически выгодный процесс, для слияния двух липидных мембран необходимо преодоление сил электростатического отталкивания, возникающих между одинаково заряженными липидными головками при их сближении. Энергия для преодоления этого барьера образуется в результате конформационного перехода вирусных гликопротеинов (также называемых белками слияния), встроенных в вирусную мембрану, из метастабильного, высокоэнергетического состояния (пре-фьюжн формы), в более устойчивую, низкоэнергетическую конформацию. Образование метастабильной формы белка слияния

вируса происходит во время сборки вириона или во время последующего процесса его созревания. В некоторых случаях поверхностные белки синтезируются в форме неактивных предшественников, для созревания которых необходимо протеолитическое расщепление. В других случаях белок слияния синтезируется вместе с белком-шапероном, обеспечивающим фолдинг в метастабильную форму [93, 94].

Конформационные изменения, ведущие к активации поверхностного белка происходят под воздействием внешних факторов, чаще всего, в результате связывания с лигандом – с рецептором и/или ко-рецептором или, для pH – зависимых вирусов, с протонами в эндосоме, и приводят к обнажению гидрофобного сегмента пептида слияния (или "петли слияния"), который взаимодействует с мембраной клетки. Пептид слияния внедряется в мембрану клетки, и образует пре-шпилечную промежуточную конформацию (интермедиат), соединяющий две мембраны и изменяющий их кривизну. Это приводит к сближению мембран и смешиванию их наружных слоев, т.е. полуслиянию (англ. hemifusion). Приобретение конечной конформации поверхностного белка ведет к образованию поры слияния и дальнейшему ее расширению. Это наиболее энергоемкий этап слияния мембран, в который может быть вовлечено сразу несколько комплексов белков слияния, каждый из которых представляет из себя гликопротеиновый шпик на поверхности вириона [95, 96]. В конечной (пост-фузионной, англ. post-fusion) стабильной конформации большинство вирусных белков слияния имеют структуру шпильки - тримера, в которой сближаются петля слияния и трансмембранный домен (Рисунок 5).

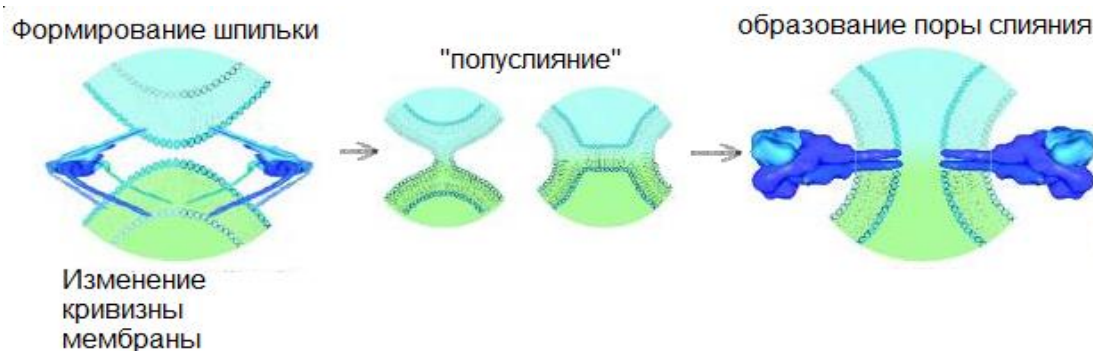


Рисунок 5. Схематичное изображение процесса слияния вирусной и клеточной мембран. Адаптировано из [95]

В зависимости от структуры и механизмов функционирования, вирусные белки слияния принято условно разделять на три класса (Рисунок 6).

Белки слияния I класса являются наиболее изученными, и включают gp41 ВИЧ, гемагглютинин вируса гриппа, GP филовирсов (GP2 субединица), белок S коронавирусов и др. Несмотря на некоторые различия внутри этого класса, они состоят преимущественно из α -спиралей и погруженного внутрь пептидного кора гидрофобного пептида слияния,

расположенного на N-конце молекулы. Белки данного класса образуют гомотримеры, расположенные перпендикулярно вирусной мембране (Рисунок 6, А).

Белки слияния II класса, к которому относят поверхностный белок альфавирусов и гликопротеин Е представителей рода флавивирусов, состоят, в основном, из β -листов и в пре-фьюжн конформации образуют лежащие параллельно мембране вириона гетеродимеры со вспомогательным белком – шапероном. Для активации им необходимо разрезание гетеродимерного вспомогательного белка клеточными протеазами (Рисунок 6, Б).

III класс белков слияния объединяет гликопротеины рабдовирусов, герпесвирусов и бакуловирусов и сочетает свойства белков I и II классов, так как они содержат ядро, образованное α -спиралями, с центральным доменом, состоящим из β -листов, содержащих одну или несколько петель слияния [93, 97] (Рисунок 6, В).

Некоторые исследователи отдельно выделяют четвертый класс белков слияния, кодируемых оболочечными реовирусами. Они не присутствуют на поверхности вириона, но являются обязательными для полноценного жизненного цикла вируса, экспрессируясь на поверхности зараженных клеток и индуцируя их слияние [98].

Хотя в пред- и/или пост-фузионных состояниях поверхностные белки отличаются огромным разнообразием, они запускают слияние мембран по общим принципам.

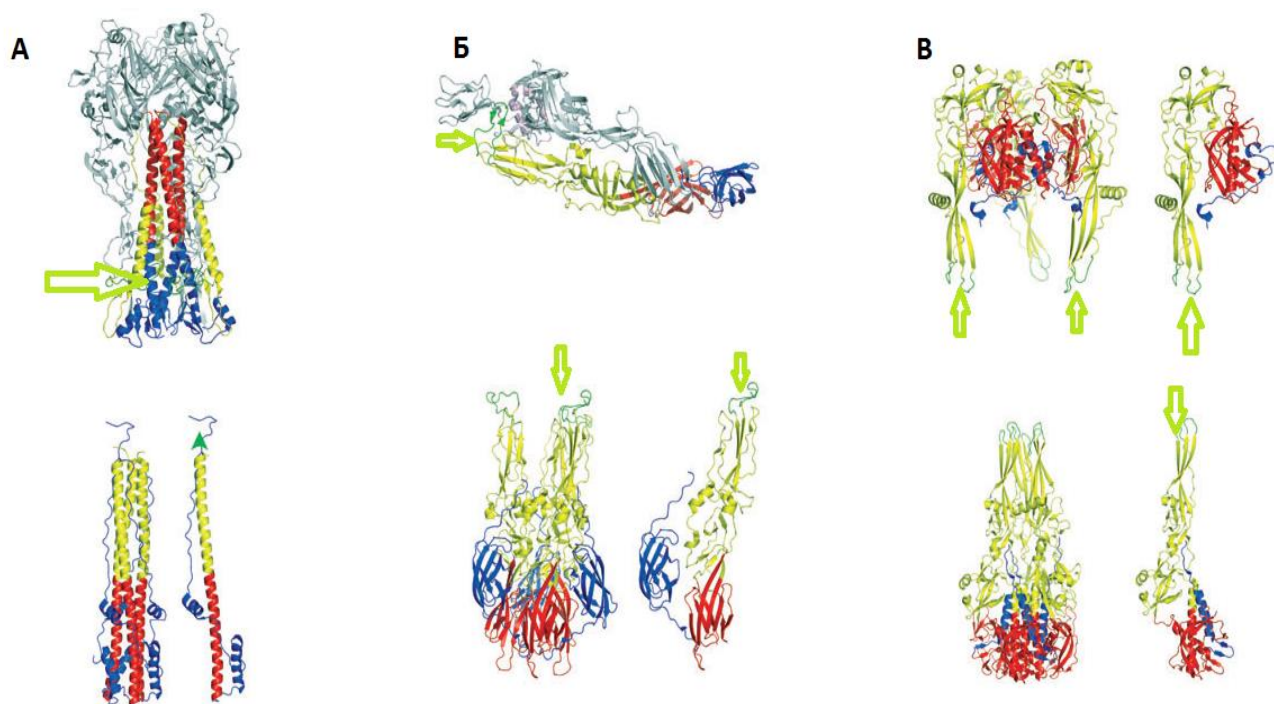


Рисунок 6. Примеры структуры вирусных белков слияния в конформациях до слияния (пре-фьюжн, сверху) и после слияния (пост-фьюжн, снизу). А. Гемагглютинин вируса гриппа (класс I). Б. Белок Е альфавирусов (класс II). В. Белок G вируса везикулярного стоматита (класс III). Пептид / петля слияния обозначены зеленым цветом. Мембраны на рисунке не изображены, предполагается, что для белков в пре-фьюжн конформации она находится внизу, а для постфьюжн – сверху. Адаптировано из [97]

Поскольку данная работа посвящена конструированию псевдовирусов, псевдотипированных поверхностными белками вируса гриппа и вируса Марбург, необходимо понимание структуры и особенностей функционирования этого типа поверхностных белков.

1.2.3 Поверхностные белки вируса гриппа А как фармакологические мишени

1.2.3.1 Общие сведения о вирусе гриппа

Вирусы гриппа – это РНК-вирусы семейства Ортомиксовирусы, включающего в себя три типа: А, В и С. Вирус типа А поражает людей, свиней, лошадей, морских млекопитающих и птиц. Типы В и С были выделены только от человека. Вирус гриппа А ежегодно вызывает сезонные эпидемии гриппа среди людей. Кроме того, периодически и с неуставленным до сих пор интервалом, этот вирус вызывает пандемии. Вирус гриппа типа В вызывает спорадические вспышки респираторных инфекций, особенно, среди детей. Вирус гриппа С обычно вызывает бессимптомное или очень легкое респираторное заболевание. Виреоны гриппа имеют сферическую или нитевидную форму. Геном вирусов гриппа А представлен одноцепочечной РНК отрицательной полярности, имеющей 8 сегментов, кодирующих 11 белков (НА, NA, NP, M1, M2, NS1, NEP, PA, PB1, PB1-F2, PB2) [99]. В липидный бислой вирусной оболочки встроены поверхностные гликопротеины гемагглютинин и нейраминидаза, выступающие из мембраны в виде шипов, а также тетрамеры M2-белков, представляющих собой ионные каналы. На один белок M2 приходится около 100 молекул гемагглютинина. Под липидным бислоем лежит матриксный белок M1, основной структурный протеин, который окружает капсид вириона. Внутри вирусного капсида лежит 8 рибонуклеидных комплексов (vRNP), каждый из которых состоит из молекул РНК (vRNA), соединенных с нуклеопротеином (NP), и 3 субъединиц РНК-полимеразного комплекса, две из которых (PB2 и PB1) образуют - «основную полимеразу» и один (PA) - «кислую полимеразу» Также внутри вириона имеются неструктурный белок (NS1), белок ядерного экспорта (NEP), связанный с M1 белком и PB1-F2 (PB1-F2 экспрессируется многими, но не всеми штаммами вируса гриппа А и отсутствует у вирусов гриппа В), и, по-видимому, представляет собой белок, обладающий проапоптотическими свойствами [100].

Поверхностные белки вируса гриппа – гемагглютинин и нейраминидаза - определяют его основные инфекционные свойства, такие как вирулентность и тропизм. Связываясь со своим клеточным рецептором, остатком сиаловой кислоты на поверхности клетки-мишени, гемагглютинин осуществляет вход вируса в клетку посредством слияния вирусной и клеточной мембран в эндосоме. Нейраминидаза ответственна за высвобождение вирусного потомства с поверхности инфицированной клетки посредством отрезания остатков сиаловых кислот на

поверхности клетки и предотвращения взаимной адгезии вновь образовавшихся вирусов, что обеспечивает распространение инфекции [101, 102].

Вирус гриппа А имеет множество субтипов, классификация которых основана на антигенных различиях поверхностных гликопротеинов – гемагглютинина (HA) и нейраминидазы (NA). В настоящее время известно 17 типов HA - эпидемическое значение для людей имеют типы H1, H2 и H3, единичные случаи инфекций вызывают типы H5, H7 и H9, а также 10 типов NA, из которых среди людей циркулируют вирусы с нейраминидазами типов N1, N2 и N9.

Циркуляция всех субтипов вируса гриппа поддерживается среди водоплавающих птиц. Они служат постоянным источником распространения и гигантским резервуаром для генетических изменений вируса. По результатам филогенетического анализа стало известно, что варианты вируса гриппа А, циркулирующие среди млекопитающих, произошли от вирусов, циркулирующих среди птиц. Антигенная вариабельность вируса гриппа обусловлена двумя процессами – антигенным шифтом и дрейфом. В связи с относительно низкой точностью вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы, возникают постепенные незначительные изменения в структуре поверхностных антигенов HA и NA, обусловленные появлением точечных мутаций в этих генах, которые ведут к антигенному дрейфу. Как правило, такие изменения происходят и регистрируются каждый год. Второй, гораздо менее частый тип антигенной изменчивости, представляет собой полную замену одного подтипа гемагглютинина или нейраминидазы на другой, и происходит при одновременном заражении клеток двумя (или несколькими) штаммами вируса, возможно, от разных хозяев. В результате реассортации геномных сегментов возникающий вирус имеет элементы обоих родительских вирусов. Этот процесс происходит нерегулярно и может приводить к возникновению пандемий. Антигенный шифт свойственен только гриппу А, в то время как антигенный дрейф происходит во всех типах вируса гриппа, включая А, В и С.

В связи с появлением новых мутантных и реассортантных вирусов гриппа возрастает угроза возникновения эпидемий и пандемий. Пандемии характеризуются высокой заболеваемостью и смертностью, и сопровождаются тяжелыми социально – экономическими последствиями. В XX веке было три таких пандемии. Самая известная произошла в 1918-1919 гг. («испанка») - она была вызвана вирусом субтипа H1N1 и унесла более 20 млн. жизней по всему миру. «Азиатский» грипп (1957-1958 гг.), вызванный вирусом A/H2N2, был впервые зарегистрирован в Центральном Китае, общая летальность в мире составила 1-2 млн. человек. «Гонконгский» грипп, вызванный вирусом A/H3N2 (1968-1969 гг.), впервые был выделен в Гонконге. В середине марта 2009, ВОЗ сообщила о новой пандемии, вызванной вирусом H1N1 изолята A/California/04/2009 (пандемия «свиного» гриппа A/H1N1, «мексиканский грипп»).

Хотя заболевание протекало довольно мягко, ВОЗ высказывала опасения, связанные с генетической новизной штамма и его потенциальной способностью к дальнейшей реассортации, и, вследствие этого, возможностью возникновения более агрессивных вариантов инфекции.

Известно, что вирусы птичьего гриппа с гемагглютинидами типов H5, H7 и H9 способны вызывать вспышки инфекции в человеческой популяции. Особенно печально известен подтип высокопатогенного вируса птичьего гриппа H5N1, впервые заявивший о себе в 1997г. в Гонконге, а позже, в 2004г., вызвавший большую вспышку заболеваемости среди домашних птиц, а затем и среди людей на значительной территории Азии. В настоящее время число подтвержденных ВОЗ случаев заболевания составляет 628 человек, из которых 374 закончились смертью. В марте 2013 в восточном Китае была зарегистрирована вспышка нового подтипа вируса гриппа A/H7N9, который был менее патогенным для птиц, но за двухмесячный период распространения привел к 131 подтвержденному случаю у людей, среди которых 36 были смертельными [103, 104].

В настоящее время для лечения и профилактики гриппа используется несколько препаратов. До 2018 года были зарегистрированы ингибиторы вируса гриппа только двух классов: ингибиторы M2-каналов – ремантадин и амантадин (в настоящее время не рекомендованные к использованию в связи с распространением штаммов вируса, резистентных к их действию) и ингибиторы вирусной нейраминидазы: осельтамивир, занамивир, зарегистрированные в 1999 году, перамивир – в 2014 году и ланинамивир, одобренный к применению в Японии в 2010 году. В октябре 2018 года был одобрен к применению препарат нового класса действия – балоксавир марбоксил (торговое название - Ксофлюза) – ингибитор эндонуклеазы, кодируемой PA субъединицей вирусного полимеразного комплекса. Показано, что балоксавир марбоксил существенно снижает вирусную нагрузку уже после однократной дозы (хотя существенно не сокращает длительность клинических проявлений болезни). Однако, уже в ходе 2-й фазы клинических испытаний, как до, так и после начала применения препарата, были обнаружены вирусы, резистентные к его действию. Пока не ясно, влияют ли мутации, ответственные за нечувствительность к ксофлюзе, на вирулентность вируса [105].

1.2.3.2 Гемагглютинин вируса гриппа

1.2.3.2.1 Структура и функция гемагглютинина

Как уже указывалось ранее, вирусный гемагглютинин (HA) отвечает за связывание с клеточными рецепторами на поверхности клетки – мишени. Можно утверждать, что именно гемагглютинин определяет круг хозяев для вируса. Также он играет важную роль в возникновении иммунного ответа, так как в структуре HA располагаются основные антигенные

детерминанты, индуцирующие образование нейтрализующих антител. В его структуре различают три домена: цитоплазматический, трансмембранный и эктодомен. Большая часть молекулы (примерно около 90% длины, N-концевая область) располагается на внешней стороне мембраны (эктодомен). Небольшая часть молекулы (С-конец) расположена под липидным бислоем и взаимодействует с нуклеокапсидом (цитоплазматический домен). Трансмембранный домен пронизывает липидный бислой - оболочку вируса. Эктодомен ответственен за рецепторную и фузогенную функции, а также принимает участие во взаимодействии с антителами при нейтрализации вируса.

Гемагглютинин, встроенный в клеточную или вирусную мембрану, представляет собой тример, каждый мономер которого состоит из двух полипептидов, HA1 и HA2, связанных дисульфидными связями. В инфицированных клетках синтезируется предшественник HA (HA0), который затем гликозилируется в ЭР инфицированной клетки и тримеризуется с помощью белков - шаперонов. HA1 и HA2 образуются путем протеолитического расщепления HA0 клеточными протеазами инфицированного организма носителя. Протеолиз может происходить как внутриклеточно, в процессе транспорта по направлению к плазматической мембране, так и внеклеточно, на плазматической мембране. Протеолитическая активация HA необходима белку для приобретения свойства фузогенности, и без нее вирус не способен инфицировать клетки-мишени. Для большинства вариантов гемагглютинина, сайт расщепления содержит единственный аргининовый остаток (т. е. является одноосновным), и гемагглютинин - предшественник разрезается специфическими внеклеточными протеазами. Тем не менее, сайт расщепления некоторых гемагглютининов «птичьих» вирусов гриппа (H5 и H7) длиннее, имеет несколько основных остатков (аргинина или лизина) и называется многоосновным сайтом расщепления. Присутствие такого сайта напрямую коррелирует с повышением патогенности вируса, так как он может расщепляться семейством повсеместно экспрессирующихся внутриклеточных протеаз, действующих непосредственно после выхода гемагглютинина из ЭР. Таким образом, создаются условия для более эффективного распространения вирусной инфекции. В противоположность этому, одноосновные сайты расщепления HA низкопатогенных вирусов могут подвергаться только внеклеточному протеолизу специфическими сериновыми протеазами. Эти ферменты секретируются только в легочном эпителии птиц и человека, а также в ЖКТ птиц. Такое ограничение приводит к анатомически локализованной и более мягко протекающей инфекции. Таким образом, эффективность протеолиза зависит не только от типа вируса, но и от протеолитического аппарата хозяина [106]. Недавно было показано, что пептидные ингибиторы протеаз блокируют репликацию вируса, препятствуя протеолизу HA и приобретению им фузогенных свойств [107].

Адсорбция вируса на поверхности клетки происходит в результате взаимодействия рецептор-связывающего сайта гемагглютенина с остатками сиаловых кислот, присутствующих на поверхностных гликопротеинах или гликолипидах клетки. Сиаловые кислоты, N-ацетилпроизводные нейраминовой кислоты, принадлежат семейству аминокислотных сахаров, связанных с различными углеводами (чаще галактозой) посредством α -2,3 (SA α -2,3Gal) или α -2,6 (SA α -2,6Gal) гликозидной связи. Тип связи имеет важное значение, так как от этого зависит тропизм вируса. Вирус птичьего гриппа использует в качестве рецептора сиаловые кислоты, прикрепленные посредством альфа-(2,3) связи, которые преобладают в желудочно-кишечном тракте птиц. Вирусы гриппа, инфицирующие человека, используют преимущественно сиаловые кислоты со связью альфа-(2,6), которые превалируют в верхних отделах респираторного тракта человека. Тем не менее, наличие альфа-(2,3)-сиаловых кислот в кубическом эпителии бронхов и альвеолоцитах II типа человека обеспечивает возможность межвидовой передачи вируса птичьего гриппа. Известно, что определенные аминокислотные замены в рецептор-связывающем сайте приводят у различных типов HA к изменению рецепторной специфичности (от SA α -2,3Gal к SA α -2,6Gal и наоборот) [108].

После того, как вирус прикрепляется к поверхности клетки-хозяина, начинается транспорт вирусной частицы внутрь клетки посредством эндоцитоза, причем вирус гриппа использует как клатрин-зависимый, так и клатрин-независимый механизмы эндоцитоза.

Гемагглютинин по форме напоминает гриб, шляпка его состоит преимущественно из субъединицы HA1, ножка - из эктодомена субъединицы HA2, обхватываемая N- и C-концевыми сегментами HA1 (Рисунок 7).

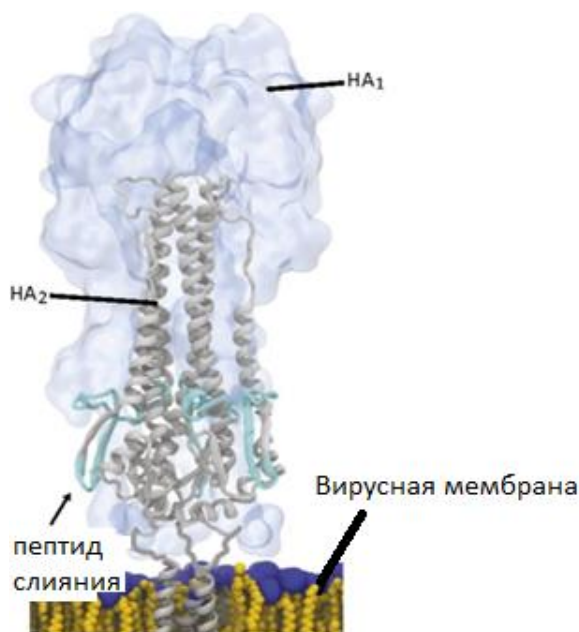


Рисунок 7. Структура гемагглютенина вируса гриппа. HA1 - рецептор-связывающий домен, HA2 – домен, содержащий пептид слияния [109].

Первые 23 аминокислотных остатка N-конца HA2 субъединицы функционируют как белок слияния. Благодаря положительно заряженным N-концевым аминогруппам, белок слияния оказывается спрятанным в отрицательно заряженной полости субъединицы HA1. Закисление содержимого эндосом индуцирует перегруппировку HA1, что ведет к высвобождению пептида слияния субъединицы HA2 из кармана. Низкие значения pH индуцируют изменение конформации HA2, в результате происходит слияние вирусной оболочки и мембраны эндосомы.

1.2.3.2.2 Ингибиторы начальных стадий инфекции вируса гриппа

Гемагглютинин является привлекательной мишенью для разработки нового класса ингибиторов, причем HA2 субъединица, более консервативная, чем HA1, скорее всего, для этих целей является более подходящей. Уже известны вещества, направленные на блокирование рецептор-связывающего сайта HA1 [110]. Так, был найден 20-аминокислотный пептид, специфически связывающийся с HA и действующий как блокатор входа (EntryBlocker, EB), а позже и более короткий пептид P1 (CNDFRSKTC) со схожими свойствами. Кроме того, получены моноклональные антитела, связывающиеся с консервативными эпитопами на «шляпке» HA и препятствующие присоединению вириона к клетке. Помимо моноклональных антител для блокирования рецептор-связывающего сайта HA могут использоваться растворимые (т.е. не связанные с клеточной мембраной) сиаловые кислоты. *In vivo* оба типа 2,3- и -2,6-) растворимых сиаловых кислот находятся в секрете, вырабатываемом эпителиальными клетками дыхательных путей, таким образом, препятствуя связыванию вирионов с сиаловыми кислотами на поверхности клеток [111]. Другой механизм блокирования рецептор-связывающей функции HA характерен для флудазы (Fludase (DAS181)). Флудаза – рекомбинантный фермент, состоящий из бактериальной сиалидазы, выделенной из актинобактерии *Actinomyces viscosus*, связанной с лигандом рецептора эпидермального фактора роста, необходимого для эффективной доставки к эпителиальным клеткам. Действуя подобно вирусной нейраминидазе, DAS181 отщепляет сиаловые кислоты с поверхности клетки, т. о. лишая вирусные частицы возможности адсорбироваться на клеточной поверхности. Также в качестве ингибиторов активности гемагглютинина могут быть блокаторы сайтов гликозилирования (в том числе, антитела к углеводам), нейтрализующие антитела к высококонсервативным сайтам, стабилизаторы HA2 субъединицы при низких pH и дестабилизаторы при высоких pH, а также антитела, распознающие консервативные сайты на «ножке» HA и блокирующие слияние мембран [112].

Ингибирование клеточных факторов, участвующих в эндоцитозе также может подавлять вирусную инфекцию. После интернализации вирион оказывается в ранних эндосомах, где

поддерживается слабокислый уровень pH (около 6.0). Затем, в процессе транспорта происходит их созревание в т.н. поздние эндосомы, в которых, благодаря действию H^+ - АТФазы, происходит дальнейшее закисление среды. Оптимальные значения pH для запуска слияния гемагглютинином вируса гриппа вирусной и клеточной мембран лежат в диапазоне 5.0 - 5.5 и несколько отличаются между собой для гемагглютининов разных изолятов вируса гриппа. АТФаза может быть селективно ингибирована антибиотиками бафиломицином A1 и конкамицином А. Лизосомотропные агенты, такие как хлорохин и хлорид аммония, также ингибируют вход вируса гриппа в клетку путем повышения значения эндосомального pH.

Есть данные, свидетельствующие о том, что прикрепление вируса к клеточной поверхности приводит к формированию специфических липидных доменов (рафтов), которые служат в качестве сигнальных платформ для активации рецепторов с тирозинкиназной активностью (RTK). Присоединение вириона активирует рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), который запускает эндоцитоз и захват вириона клеткой. Схожий эффект обнаружен при активации киназы c-Met [113]. Соответственно, ингибиторы тирозинкиназ снижают эффективность инфекции. Модуляторы пути синтеза холестерина и/или сфингомиелина (основных компонентов рафтов), меняя эффективность формирования липидных рафтов, обогащенных этими двумя липидами, возможно, также могут влиять на инфекцию гриппа.

Инфекция вирусом гриппа приводит к активации в клетке множества сигнальных ответов. Некоторые из них вирус использует в собственных целях для увеличения эффективности инфекции, и эти факторы также могут быть потенциальными мишенями для ингибиторов. Среди них наибольшего внимания заслуживают Raf/MEK/ERK-киназный каскад и сигнальный путь NF-κB, блокирование которых в клеточных линиях приводило к эффективному ингибированию вирусной инфекции [114].

1.2.3.3 Нейраминидаза и ее ингибиторы

1.2.3.3.1 Структура и функция нейраминидазы

Нейраминидаза (N-ацетил-нейраминил-гидролаза) играет важную роль в высвобождении вирусного потомства из клетки-хозяина в процессе отпочковывания вируса, расщепляя связь между терминальным остатком сиаловой (N-ацетилнейраминовой) кислоты и следующим моносахаридным остатком. В настоящее время функции нейраминидазы не ограничивают лишь ее участием в заключительных этапах вирусной инфекции [115]. Предполагают, что она может быть задействована и на начальных стадиях инфекции, удаляя рецепторы на ресничках и гликокаликсе, которые могут препятствовать доступу вирусных частиц к функционирующим рецепторам на клетках-мишенях и, давая возможность вирусу продвигаться через муциновый

слой на поверхности респираторного эпителия [116]. В экспериментах на клетках линий MDCK (клетки почки собаки, Madin Darby canine kidney) и A549 (аденокарцинома легкого человека) было показано, что сиалидазная активность нейраминидазы способствует гемагглютинин - опосредованному входу вируса в клетку, но в тоже время, ее избыток может быть помехой такому усиливающему действию [117].

Таким образом, гемагглютинин и нейраминидаза играют противоположные роли с точки зрения взаимодействия с сиаловыми кислотами. Их баланс, по всей видимости, важен для эффективной инфекции вирусом клеток-мишеней [118].

NA вируса гриппа представляет собой тетрамер, состоящий из 4 идентичных полипептидов, каждый из которых содержит около 470 аминокислотных остатков, образующих 4 домена: N-концевой цитоплазматический, гидрофобный трансмембранный, гипервариабельный стеблевой и высококонсервативный каталитический домен. Цитоплазматический домен – это короткая последовательность из 6 аминокислот (MNPNQK) исключительно высоко консервативная для всех субтипов гриппа А, мутации в нем приводят к уменьшению эффективности почкования и изменению морфологии вириона. Последовательность трансмембранного домена варьирует между субтипами, но, тем не менее, спираль, сформированная аминокислотами 7 - 29 трансмембранного домена общая для всех субтипов. Трансмембранная последовательность имеет сигнальную функцию, направляя NA через ЭР после трансляции, и якорную функцию, удерживая белок в мембране. Стеблевой домен находится между трансмембранным и глобулярным «головным» доменом и имеет вариабельную длину. Предполагается, что благодаря наличию остатков цистеина, он участвует в образовании тетрамера за счет формирования дисульфидных связей между субъединицами. Каталитический домен имеет форму шестилопастного пропеллера, каждая лопасть собрана из 4 антипараллельных бета-складок, стабилизированных дисульфидными связями и соединённых петлями различной длины (Рисунок 8). Активный сайт является высококонсервативным, и при связывании с субстратом его конформация изменяется незначительно. Он построен из заряженных аминокислот (8 активных и 11 каркасных), которые связывают остатки сиаловых кислот. Между нейраминидазами различных субтипов имеются сходства и различия, поэтому, исходя из первичных нуклеотидных последовательностей их генов, их условно делят на семейства: первая группа содержит N1, N4, N5 и N8, вторая -NA2, NA3, NA6, NA7 и NA9. Новые подтипы NA (N10 и N11), недавно выделенные из летучих мышей, по-видимому, мало связаны с известными девятью подтипами и не проявляют выраженной сиалидазной активности, поэтому, возможно, оправдано выделение их в отдельную группу. Интересно, что в структуре белков первой группы вблизи активного центра имеется дополнительная полость («карман-150»), которая может быть использована как мишень для новых ингибиторов [119].

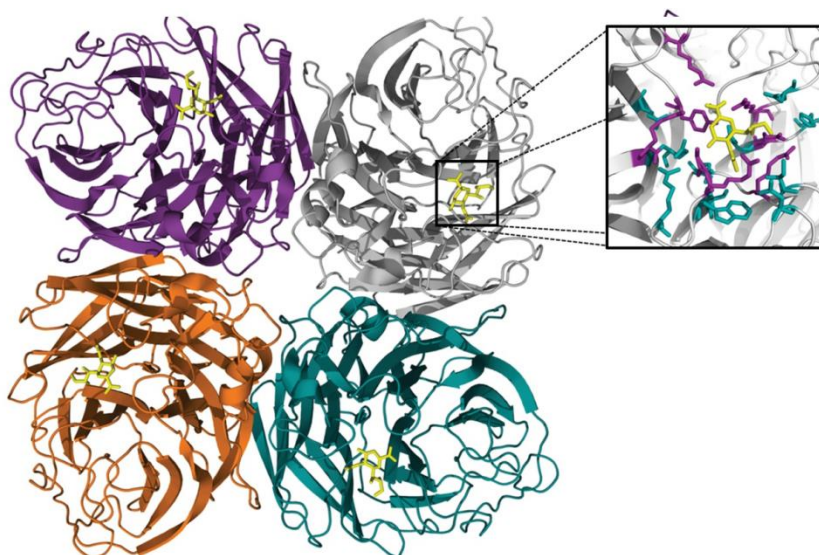


Рисунок 8. Структура каталитического домена нейраминидазы. Каталитический домен имеет форму шестилопастного пропеллера, каждая лопасть собрана из 4 антипараллельных бета-складок. Сиаловая кислота обозначена желтым цветом [101].

Как и НА, разные NA имеют различную аффинность к α -2,3- или α -2,6-сиаловым кислотам, чаще всего, впрочем, более эффективно расщепляя первые. Считается, что в процессе эволюции, NA следовала за НА, меняла свою специфичность от «птичьих» рецепторов (α -2,3-) к «человеческим» (α -2,6), хотя эти изменения и не были очень значительными. Нейраминидазы N1 человеческих вирусов в 5 раз активнее расщепляют 3'-связи, чем 6'-связи, в то время как нейраминидазы вирусов птиц и свиней активнее в 20 и 50 раз, соответственно [120].

В отсутствие нейраминидазы вирусы гриппа могут проходить почти полный цикл инфекции, но вирусное потомство остается связанным с поверхностью инфицированной клетки, собираясь в агрегаты, которые препятствуют распространению инфекции.

Однако в последние годы были обнаружены вирусы с малой или отсутствующей нейраминидазной активностью. Утрата сиалидазной активности может быть компенсирована мутациями НА, ведущими к снижению способности НА связываться с рецепторами. Этот механизм имел место у некоторых вирусов, резистентных к ингибиторам нейраминидазы. *In vivo* экспрессия бактериальной нейраминидазы в результате бактериальной ко-инфекции, теоретически, может содействовать распространению таких вирусов [121].

1.2.3.2.2 Ингибиторы нейраминидазы

Ингибиторы нейраминидазы – это наиболее используемые сегодня противовирусные препараты, применяемые для профилактики и лечения инфекций вирусов гриппа А и В. Они являются аналогами 2,3-дидегидропроизводного N-ацетилнейраминовой кислоты, обладают более высокой аффинностью к активному центру, чем естественный субстрат, сиаловая кислота, таким образом, действуя как конкурентные ингибиторы [122]. В настоящее время в

мире используется четыре представителя этого класса препаратов – озельтамивир (Тамифлю), занамивир (Реленза), перамивир (Рапиваб) и ланинамивир (Инавир) (Рисунок 9). Последние два разрешены к использованию только в некоторых азиатских странах.

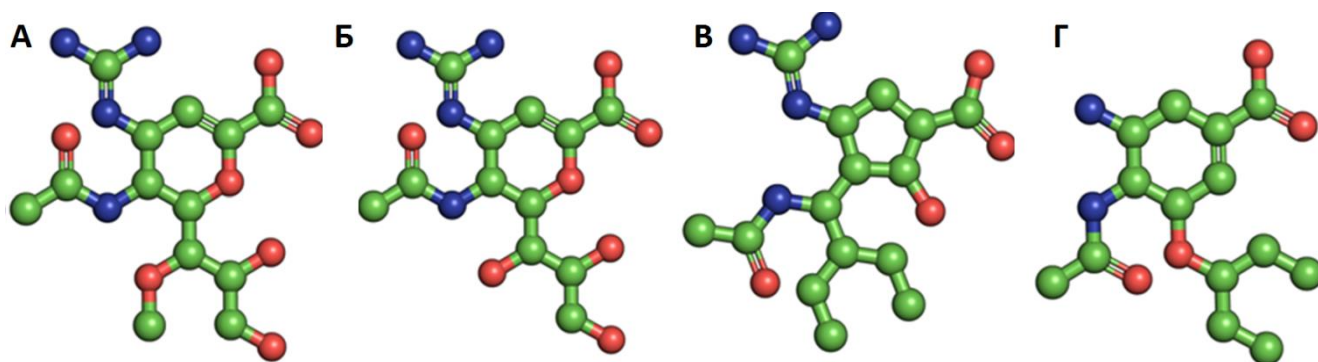


Рисунок 9. Химическая структура озельтамивира карбосилата (А), занамивира (Б), перамивира (В) и ланинамивира (Г). Зеленым цветом обозначены атомы углерода, красным – кислорода, синим – азота, атомы водорода не показаны [122].

Первый разработанный ингибитор нейраминидазы, занамивир, был лицензирован в 1999 году. Он используется для лечения и профилактики инфекции. Из-за низкой всасываемости, занамивир доставляется в организм больного в виде ингаляционной формы, что ограничивает его применение у некоторых категорий пациентов.

Озельтамивир фосфат (Тамифлю) – пролекарство, которое при пероральном приеме подвергается гидролизу и превращается в активную форму – озельтамивира карбоксилат. Он был разработан на основе структуры занамивира путем добавления к аналогу сиаловой кислоты громоздкой боковой цепи, что позволило принимать данное лекарство перорально. Озельтамивир утвержден для профилактики и лечения неосложненных случаев острого заболевания при наличии симптомов не более, чем в течение двух суток. Внутривенная форма проходит клинические испытания.

Перамивир (Рапиваб, другие названия - Рапиакта, Перамифлу) – более новое средство класса ингибиторов NA, представленное только внутривенной формой. Клинические испытания в Японии показали, что эффект от однократного применения перамивира сравним или даже превосходит эффект двукратного применения озельтамивира при менее выраженных побочных эффектах [123]. С другой стороны, промежуточный анализ в 3 фазе клинических испытаний в США показал незначительное различие по сравнению с плацебо, что остановило использование данного препарата в этой стране.

Ланинамивир и его производное, пролекарство, ланинамивир октаноат (Инавир) – длительно действующий ингибитор нейраминидазы, рекомендованный к использованию в Японии с 2010 года для лечения гриппа и с 2013 года для профилактики. Как и озельтамивир,

он является пролекарством, но превращается в активную форму в легких. Ланинамивир эффективен в отношении широкого спектра вирусов гриппа А (содержащих нейраминидазы типов N1–N9) и В, в том числе, и некоторых штаммов, резистентных к озельтамивиру и занамивиру.

Резистентность к ингибиторам нейраминидазы возникает из-за изменения конформации активного центра, что снижает способность ингибитора связываться с ним. Считается, что идеальный ингибитор должен быть схож с натуральным субстратом, насколько это возможно, различия необходимы лишь для абсорбции и задержки лекарства в организме. Это может объяснять более частое возникновение резистентности к озельтамивиру, чем к занамивиру. Кроме того, описано, что для двух групп нейраминидаз механизмы приобретения резистентности различны [124].

К сожалению, резистентные к имеющимся препаратам варианты вируса, хотя и существенно реже, обнаруживаются не только у лиц, применявших данные препараты в процессе лечения и профилактики, но также и у пациентов, не получавших препараты этого класса, в связи со спонтанно появляющимися мутациями.

Таким образом, поверхностные белки вируса гриппа – гемагглютинин и нейраминидаза - являются главными антигенными детерминантами и важными фармакологическими мишенями для противовирусных средств. Псевдотипы, экспрессирующие на своей поверхности эти белки, активно применяются в исследованиях, направленных на изучение их свойств.

1.2.4 Применение псевдовирюсов для моделирования гриппа

Для моделирования инфекции вируса гриппа широко используется псевдолентивирусная система, в которой псевдовирюсные частицы получают методом трансфекции клеток - продуцентов векторами мультиплазмидной системы (3–5 плазмид) [125]. Псевдовирюсы на основе другого ретровируса – ВЛМ, используются реже, хотя отличаются от лентивирусных не существенно.

подавляющее большинство исследований с применением таких псевдовирюсов направлено на изучение гемагглютинина, поэтому чаще всего на поверхности псевдотипов экспрессируются только гемагглютинины, без нейраминидазы. Для того чтобы преодолеть необходимость экспрессии нейраминидазы при получении псевдовирюсов (для эффективного отпочковывания частиц от клеток-продуцентов), применяют экзогенную рекомбинантную бактериальную нейраминидазу, которой обрабатывают клетки – продуценты спустя некоторое время после трансфекции плазмидами, используемыми для получения псевдовирюсов.

Описано получение и применение псевдотипов с гемагглютиниными различных штаммов вируса гриппа, но чаще всего для псевдотипирования используются гемагглютинины H1, H3, и H5 субтипов [126].

Возможность образования ВВС, псевдотипированных поверхностными белками вируса гриппа была обнаружена случайно, при совместной инфекции клеток-мишеней ВВС и вирусом гриппа H1N1. Получавшиеся псевдовirusы имели мозаичную оболочку, так как на поверхности присутствовали как собственные гликопротеиды G ВВС, так и HA и NA гриппа [127].

Затем, в результате вставки генов HA и NA в геном ВВС, целенаправленно был получен ВВС с поверхностными белками гриппа. Однако они также несли смесь гликопротеинов ВВС и гриппа на своей поверхности, что, теоретически, давало возможность рассматривать такие частицы как потенциальные вакцины, но не позволяло использовать их для изучения свойств поверхностных белков вируса гриппа [128].

В дальнейших исследованиях был получен рВВС, в котором ген G-гликопротеина заменен на гены HA и NA, благодаря чему такие частицы имели на своей поверхности только HA или NA (или их комбинацию) вируса гриппа [129]. Наличие гена зеленого флюоресцентного белка позволяло количественно оценить эффективность проникновения данных частиц внутрь клетки. Было показано, что эффективность инфекции псевдотипов, экспрессирующих гемагглютинин и нейраминидазу высокопатогенного вируса птичьего гриппа не зависит от наличия в мембране белка M2, способствующего, по некоторым данным, предотвращать преждевременные конформационные изменения гемагглютинина. Кроме того, были получены псевдотипы рВВС - H5N1 с мутантным белком M, способные реплицироваться только в клетках с дефектным интерфероновым ответом. Поскольку описанные псевдотипы не ограничиваются одним циклом инфекции, данная модификация, теоретически, усиливает безопасность их использования [130].

Альтернативным подходом к получению схожих псевдовirusов является ко-экспрессия репликационно – неполноценного капсида ВВС (с инактивированным геном G-белка) и плазмидных векторов, кодирующих поверхностные белки вируса гриппа (только гемагглютинин или нейраминидазу или оба белка совместно). Преимущество предлагаемого способа заключается в том, что он позволяет более свободно комбинировать различные варианты гемагглютинина и нейраминидазы. Так, имея в распоряжении капсид рВВС, для формирования псевдотипа с новым поверхностным белком, необходима только плазида, кодирующая ген этого белка, и не требуется модификация генома рВВС (как в случае, описанном выше). Поскольку инфекционность вирусов гриппа определяется балансом функциональных активностей гемагглютинина и нейраминидазы, их синергизм и/или антагонизм, проявляется не в единичном акте продукции (отпочковывания от клетки – продуцента) и инфекции (связывания с клеткой – мишенью, проникновения и трансдукции вирусного генома), а в многократных циклах реинфекции. Как уже было сказано в обзоре литературы, предложенная система на основе рВВС допускает моделирование эксперимента в

формате многоциклового инфицирования – в нескольких последовательных циклах отпочковывания – заражения. Это может позволить более корректно выявлять влияние комбинаций различных типов поверхностных белков на инфекционные свойства вирусов гриппа. Многоцикловая модель инфекции может также быть полезна при изучении кумулятивного эффекта ингибиторов двойного действия или комбинаций ингибиторов, а также для оценки действия нейтрализующих антител, способных связывать и гемагглютинин, и нейраминидазу.

Данный подход активно используется для псевдотипирования поверхностными белками различных вирусов, но для вируса гриппа описан впервые.

1.2.5 Поверхностные белки филовирюсов

1.2.5.1 Общие сведения о филовирюсах

Вирусы Марбург и Эбола, относятся к семейству филовирюсов (от лат. *filum* — нить), в связи с их способностью иметь различную форму – червеобразную, спиралевидную. Это оболочечные вирусы, инфекция которыми людей и нечеловекообразных приматов вызывает тяжелую геморрагическую лихорадку с высоким уровнем летальности. Филовирюсы вызывали вспышки заболеваний в Центральной Африке, крупнейшая вспышка геморрагической лихорадки Марбург зарегистрирована в Анголе в 2004-2005 годах, крупнейшая зарегистрированная вспышка лихорадки Эбола произошла в 2014 году в Западной Африке. Инфекция вирусами Марбург и Эбола имеет схожие клинические проявления, вирионы сходны по своей морфологии, однако, имеются отличия в их антигенной структуре. Инфицирование людей происходит при контакте с биологическими жидкостями носителя вируса. В настоящее время нет зарегистрированного патогенетического средства лечения филовирюсных лихорадок, однако имеется ряд кандидатных препаратов, показавших антифиловирюсную активность *in vitro* и *in vivo* на животных моделях [131].

Род *Marburgvirus* представлен единственным видом – *Marburg marburgvirus* (*Marburgvirus* - MARV). Род *Ebolavirus* содержит пять видов: *Zaire ebolavirus* (ZEBOV), который считается типовым, *Sudan ebolavirus* (SUDV), *Tai Forest ebolavirus* (TAFV), *Bundibugyo ebolavirus* (BDBV), а также непатогенный для человека *Reston ebolavirus* (RESTV). В 2002 году был обнаружен новый филовирюс, Вирус Лловиу, из монотипного рода *Cuevavirus*, вызывающий пневмонию у летучих мышей, но являющийся непатогенным для людей [132].

Патогенез филовирюсной инфекции складывается как из прямого повреждения тканей при вирусной репликации, так и из активации моноклеарной фагоцитарной системы, сопровождающейся высвобождением провоспалительных цитокинов, эндотелиальной дисфункцией и коагулопатией. Филовирюсы обладают широким спектром клеточного и органного тропизма, могут инфицировать различные типы клеток. Основной мишенью для

филовирусов являются клетки моноцитарно-макрофагального ряда в селезенке, печени и лимфатических узлах, в то время как лимфоциты устойчивы к филовирусной инфекции [19].

Геном филовирусов представлен одноцепочечной РНК отрицательной полярности, содержащей 7 генов, кодирующих 7 структурных белков: нуклеопротеин (NP), вирусные протеины VP35, VP40, VP30, VP24, РНК-зависимую РНК полимеразу (L), поверхностный гликопротеин (GP/sGP) и один неструктурный белок. Геномная РНК упакована в нуклеокапсидный комплекс, состоящий из белков NP, транскрипционного ко-фактора VP30 и ко-фактора полимеразы VP35, соединенных с L, а также матриксных белков VP40 и VP24.

1.2.5.2 Структура поверхностного гликопротеина и его роль в начальных стадиях филовирусной инфекции

Единственный поверхностный гликопротеин GP филовирусов относится к первому классу вирусных белков слияния и отвечает как за связывание с клеткой-мишенью, так и за слияние вирусной и клеточной мембран. На поверхности вириона GP представлен в пре-фьюжн форме в виде тримера гетеродимерных субъединиц, состоящих из эктодомена GP1 и трансмембранного домена GP2.

Полноразмерный мембранный гликопротеин GP вируса Эбола, в отличие от гликопротеина GP вируса Марбург, кодируется геном GP не напрямую, а в результате сдвига рамки считывания при трансляции транскрипта GP. Кроме трансмембранного гликопротеина, ген GP вируса Эбола кодирует две растворимые формы поверхностного гликопротеина GP: sGP, ssGP, а также Δ -пептид. Их точные функции неизвестны, но предполагается, что они принимают участие в уклонении от иммунного ответа, поскольку являются основными антигенными детерминантами для образования антител во время вирусной инфекции.

Зрелый гликопротеин GP имеет форму кубка, состоящего из тримера гетеродимеров GP1 и GP2, связанных дисульфидной связью, где GP2 – основание, GP1 – чаша. GP синтезируется в виде предшественника, GP0, в процессе транспорта на поверхностную мембрану, который в аппарате Гольджи подвергается протеолитическому расщеплению клеточными фуриновыми протеазами с образованием GP1 – рецептор-связывающей субъединицы и GP2 – субъединицы слияния. GP1 имеет 4 субдомена: основной, контактирующий с эктодоменом GP2, рецептор-связывающий домен, сильно гликозилированный муциноподобный домен (МПД) и гликановый кэп. Строение МПД несколько отличается у представителей различных филовирусных родов, тем не менее, считается, что гликозилирование выполняет общую роль – маскирует эктодомен GP от действия нейтрализующих антител, а также участвует в связывании вирионов с углеводсвязывающими рецепторами на клетке. Интересно, что делеция МПД усиливает процессинг и экспрессию GP на поверхности, усиливая эффективность входа филовирусов в клетку [133]. GP2 содержит трансмембранный домен, короткий

цитоплазматический хвост и внутреннюю петлю слияния, окруженную двумя гептадными повторами (HRR1 и HRR2). Домен слияния представляет собой нестабильную пре-фьюжн конформацию GP2, которая трансформируется под действием кислого pH и запускает слияние. Взаимодействие гликанового кэпа GP1 с гидрофобными остатками GP2, необходимыми для инициации мембранного слияния, предотвращает преждевременную активацию GP2 и поддерживает его в пре-фьюжн конформации.

Филовирусные GP обладают консервативностью в N- и C-концевых регионах (>70% идентичности между вирусом ZEBOV и вирусом Марбург штамма Musoke), но более переменные в срединных регионах. Аминокислотные последовательности GP вирусов Марбург и Эбола имеют 31% идентичности [134].

Поверхностный гликопротеин GP запускает вход вируса в клетку, который включает три этапа: прикрепление к клетке - мишени, поглощение вириона клеткой и слияние вирусной и клеточной мембран.

До сих пор не идентифицированы ключевые клеточные факторы, необходимые для прикрепления филовирусов к клеткам-мишеням. Вероятнее всего, эту функцию может выполнять большое число поверхностных структур клетки. Предполагается, что филовирусы связываются с поверхностью клеток посредством двух типов взаимодействий: связывания GP1 с углевод-связывающими рецепторами и связывания липидов вирусной мембраны с фосфатидилсериновыми рецепторами внешней мембраны клеток.

Так, N- и O-связанные гликаны МПД и гликанового кэпа GP1 взаимодействуют с углевод-связывающими рецепторами на клетке: лектинами типа C (DC-SIGN, L-SIGN, LSECtin, ASGPR1, hMGL и, вероятнее всего, другими) и глюкозаминогликанами. Однако, для инициации проникновения вириона в клетку, связывания GP с этими поверхностными факторами не достаточно. Кроме того, клетки, не экспрессирующие эти молекулы на своей мембране, остаются перmissive к филовирусной инфекции. Таким образом, лектины типа C, вероятнее всего, способствуют прикреплению филовирусов к поверхности клетки, но не служат рецепторами, запускающими интернализацию вируса. Связывание GP с глюкозаминогликанами также усиливает филовирусную инфекцию, а добавление к перmissive клеткам экзогенных глюкозаминогликанов, включая гепарин и хондроитин, блокирует инфекцию на очень ранних стадиях. Такой же эффект наблюдается при нокдауне экзостозина-1, необходимого для синтеза гепаринсульфата [134].

В качестве филовирусного рецептора был предложен TIM-1 (Т-клеточный иммуноглобулин муцин домена-1), экспрессирующийся на многих эпителиальных клетках, тучных клетках, В-лимфоцитах и активированных CD4 + Т – лимфоцитах, усиливает филовирусную инфекцию. Эктодомен TIM-1 содержит N-концевую

иммуноглобулиноподобную переменную часть (IgV), имеющую карман для связывания с фосфатидилсерином, присутствующим у вирусов во внешнем листе липидного бислоя. Таким образом, взаимодействие TIM-1 и филовиральной мембраны происходит GR – независимым образом: IgV напрямую связывается с ФС внешней мембраны филовирусов, что ведет к интернализации вириона. Такой механизм известен для альфавирусов, бакуловирусов, различных флавивирусов и аренавирусов [135].

Тирозинкиназные рецепторы Tyro3, Axl и Mer, образующие семейство TAM (Tyro3, Axl и Mer) также рассматривались в качестве рецепторов для филовирусов. Однако N-конец TAM-рецепторов связывается с липидами вирусной оболочки не напрямую, а посредством сывороточных белков Gas6 (блокирующий рост специфический белок 6) и протеином S (для Tyro3, Mer, но не Axl), имеющими гамма-карбоксилированные глутаминовые домены, связывающиеся с ФС вирусной оболочки. Кроме того, активация рецепторов TAM лигандами (Gas6 и протеином S), ведет к снижению интерферонового ответа и тем самым усиливает репликацию вируса. Таким образом, TAM-зависимое усиление вирусной инфекции происходит двумя различными механизмами: путем прямого связывания вирионов и индукции их интернализации, а также посредством подавления интерферонового ответа. Точные механизмы, с помощью которых молекулы семейств TAM и TIM усиливают филовиральную инфекцию, а так же их роль *in vivo* еще предстоит установить. Ранее было описано, что клеточные рецепторы семейств TIM и TAM связываются с ФС на поверхности апоптотических телец и запускают их фагоцитоз. Процесс ФС-зависимого связывания и интернализации вирусов назван апоптотической мимикрией и характерен для большого числа оболочечных вирусов [136].

Таким образом, ни одна из описанных молекул не является истинным филовиральным рецептором. По всей видимости, для присоединения филовирусов к клетке требуется взаимодействие с рядом клеточных молекул.

Для филовирусов описан еще один механизм, способствующий проникновению вириона в клетку. Он напоминает феномен антителозависимого усиления инфекции, при котором связанные с филовиральным антителом взаимодействуют с Fc-рецепторами и рецепторами C1q компонент комплемента на фагоцитирующих клетках. Его роль в патогенезе филовиральной инфекции требует дальнейшего изучения.

Изменение структуры мембраны, ведущее к эндоцитозу – энергозатратный процесс, вовлекает множество клеточных белков и специфических липидных микродоменов. С использованием псевдовиральных частиц, псевдотипированных поверхностным гликопротеином вируса Эбола, было показано, что GR ведет к активации фосфоинозитид-3-киназы и PI3K пути, а также фосфолипазы C. Так, например, ингибирование фосфолипазы C приводит к подавлению Axl-зависимого входа псевдовирусов с гликопротеином вируса Эбола.

После связывания с клеточной поверхностью, происходит интернализация вириона в клетку путем эндоцитоза и дальнейший транспорт эндосомы через цитоплазму. Многочисленные исследования, направленные на выявление точных механизмов проникновения филовиров в клетку, показали противоречивые результаты. Изначально ведущая роль отдавалась клатрин-зависимому и кавеолин-зависимому эндоцитозу. В настоящее время считается, что филовиральные частицы интернализуются преимущественно посредством макропиноцитоза, однако механизмы могут варьировать в зависимости от клеточной линии и размера вирусной частицы. По сравнению с образующимися в процессе клатрин- и кавеолин-зависимого эндоцитоза везикулами, макропиносомы имеют больший размер (до 1 мкм), что позволяет вмещать крупные филовиральные частицы. При этом даже внутри одной клеточной популяции GP-опосредованный вход может происходить различными путями, включая кавеолин- и клатрин-зависимый эндоцитоз и макропиноцитоз [137, 138].

Транспорт филовиров происходит внутри эндосомы с кислым pH. Фармакологические агенты, препятствующие закислению содержимого эндосом, такие как бафиломицин A1, хлорохин, хлорид аммония, блокируют филовиральную инфекцию. И, хотя точное место высвобождения филовирального капсида в цитоплазму еще предстоит определить, известно, что вирионы обнаруживаются в поздних эндосомах и эндолизосомах. Из этого следует, что функционирование клеточных факторов, организующих эндоцитозный путь, необходимо для продуктивной филовиральной инфекции, а их ингибирование, соответственно, ведет к подавлению инфекции.

Кальций, являясь важнейший медиатором многих клеточных функций, включая везикулярный транспорт, играет важную роль в продуктивной инфекции многих вирусов. Было выявлено, что некоторые блокаторы кальциевых каналов (БКК) L-типа ингибируют инфекцию MarVGP- и EboGP-псевдотипов. Причем активны только те из них, которые блокируют также двупоровые каналы (TRPC1 и 2), находящиеся в эндосомах/лизосомах и транспортирующие ионы натрия и кальция. Роль TRPC состоит в регулировании везикулярного транспорта, в том числе, в эндосомально-лизосомальной системе. Взаимодействуя с регуляторами созревания эндосом Rab5 и Rab7, TRPC способствуют движению филовиральных частиц по эндоцитозному пути. Гаплоидный генетический скрининг выявил, что факторами входа являются также белки комплекса HOPS, находящегося на эндосомальной мембране и влияющего на созревание эндосом и обеспечивающего их слияние с лизосомами [22]. Предполагается, что слияние эндосом, запускаемое HOPS, способствует переносу вирионов в компартменты, где запускается процесс слияния вирусной и клеточной мембран, и/или предоставляет факторы слияния в эти компартменты.

Внутри эндосомы происходит активация GP в результате его протеолитического расщепления pH-зависимыми клеточными протеазами катепсинами В (catB) и/или L (catL). Считается, что катепсины удаляют часть МПД и гликанового кэпа GP1, и, таким образом, демаскируют рецептор-связывающий сайт GP1, облегчая его взаимодействие с истинным рецептором филовирального гликопротеина, NPC1, и, кроме того, способствует последовательной дестабилизации пре-фьюжн формы GP. Этот процесс несколько отличается у различных филовирусов. Так, у EBOV, BDBV и TAFV catB удаляет большую часть GP1 (МПД и гликановый кэп), в то время как для активации GP SUDV, RESTV, MARV и LLOV, catB не является необходимым. Кроме того, зависимость вирусной инфекции от активности катепсинов, по-видимому, отличается в разных типах клеток. Так, активность катепсина L не обязательна при инфицировании вирусом Эбола дендритных клеток, полученных из мононуклеарных клеток периферической крови, а является лишь добавочной к действию катепсина В, при этом для инфицирования клеток линии Vero необходима активность обоих катепсинов [139]. Тем не менее, остается много нерешенных вопросов относительно протеолиза филовирального GP в клетках-мишенях. Работы, показывающие необходимость катепсинов в процессинге филовирального GP проведены с использованием псевдовирусов, в то время как результаты экспериментов с живыми вирусами оспаривают их роль в продуктивной филовиральной инфекции. Так, мыши, нокаутные по генам катепсинов В и L, оказались чувствительными к инфекции вирусом Эбола [134]. Это дает основание предполагать, что помимо катепсинов в протеолизе филовирального GP участвуют и другие клеточные цистеиновые протеазы.

Рядом независимых исследований показано, что для успешной филовиральной инфекции необходим белок Niemann-PickC1 (NPC-1) – политопный (т. е. пронизывающий мембрану несколько раз) мембранный белок, находящийся на мембране поздних эндо-/лизосом. NPC-1 совместно с NPC-2 осуществляет транспорт свободного холестерина, находящегося в этих компартментах, в цитоплазму. Возникновение мутаций в гене NPC-1, ведущих к дисфункции этого белка, вызывает тяжелое нейродегенеративное заболевание - болезнь Ниманна-Пика типа С (англ. NPC, Niemann-Pick disease type C), при котором происходит накопление свободного холестерина и сфинголипидов в лизосомах и поздних эндосомах с образованием характерного клеточного фенотипа.

Взаимодействуя с рецептор-связывающим сайтом процессированного GP1, NPC-1 действует как мембранный клеточный рецептор, необходимый для GP2-зависимого слияния вирусной и эндосомальной мембран. Клетки, дефицитные по белку NPC1, в том числе, первичные фибробласты, полученные от пациентов с болезнью Нимана-Пика типа С, резистентны к филовиральной инфекции, а гиперэкспрессия NPC-1, напротив, усиливает

инфекцию. В то же самое время установлено, что функция NPC-1 как филовирального рецептора, никак не связана с NPC-1-зависимым транспортом липидов. Несмотря на то, что фибробласты, дефицитные по белку NPC-2, имеют такой же фенотип, как и клетки, дефицитные по белку NPC-1, они остаются чувствительными к филовиральной инфекции. Кроме того, культивирование NPC-1 – дефицитных клеток в среде, обедненной липопротеинами, не делает их восприимчивыми к GP-зависимой филовиральной инфекции, т.е. резистентность не связана с дефектами транспорта холестерина как такового [22, 140].

Роль NPC-1 в филовиральной инфекции была подтверждена *in vivo* на мышинной модели с использованием штаммов вируса Эбола и Марбург, адаптированных к мышам. Как и ожидалось, нокаутные *Npc1*^{-/-} мыши резистентны к филовиральной инфекции. Интересно, что даже гетерозиготные *Npc1*^{+/-} мыши, не страдающие болезнью Нимана-Пика типа С, оказались устойчивы к вирусам Эбола и Марбург. Хотя точные молекулярные механизмы этого явления еще предстоит выяснить, вероятнее всего, это свидетельствует о необходимости высокого уровня экспрессии NPC1 в клетках-мишенях, ключевых для патогенеза филовиральной инфекции. Как истинный рецептор, NPC-1 определяет видовой вирусный тропизм: экспрессия NPC-1 в клетках видов животных, непермиссивных к филовиральной инфекции, делает возможным их заражение филовирусами. Низкомолекулярные вещества, предотвращающие связывание вирусного гликопротеина с NPC1, ингибируют филовиральную инфекцию [141].

Было показано, что для продуктивной филовиральной инфекции не требуется полноразмерный белок NPC-1. Второй люминальный домен (домен С) NPC-1 является необходимым и достаточным компонентом, напрямую специфично связывающимся с процессированным филовиральным GP. Была разрешена кристаллическая структура комплекса GP с NPC-1 [142], благодаря чему было показано, что белок NPC-1 использует две выступающие петли второго люминального домена (домена С), состоящие преимущественно из остатков ароматических аминокислот, которые связываются с гидрофобной каверной на головке процессированного GP. Интересно, что эти же две петли домена С ответственны за связывание NPC-1 с NPC2 в процессе транспорта холестерина [143]. Это может свидетельствовать о том, что распознавание клеточной молекулой NPC-1 филовирального GP является разновидностью молекулярной мимикрии.

Использование филовирусами внутриклеточного рецептора также, возможно, служит в качестве средства ускользания от нейтрализующих антител. Как уже было сказано, избавление от гликанового кэпа, экранирующего GP от действия антител, происходит внутри эндосомы, в связи с чем антитела, нацеленные на высококонсервативный рецептор-связывающий сайт процессированного GP, не имеют к нему доступа. Однако, учитывая эту особенность, были получены биспецифические антитела, которые связываются с С-доменом NPC1 и рецептор-

связывающим сайтом GP, блокируя их взаимодействие. Их доставка внутрь компартмента, содержащего NPC1, осуществляется на поверхности самого вириона. В исследовании, проводимом на мышах, такие биспецифические антитела показали активность в отношении EBOV и SUDV и представляют перспективное направление в разработке антифиловирусных средств широкого спектра действия.

По аналогии с другими белками слияния I класса, образовавшийся в эндосоме интермедиат - GP, связанный с NPC1 – претерпевает ряд конформационных изменений, приводящих, в конечном итоге, к слиянию вирусной и клеточной мембран и высвобождению капсида в цитоплазму, где продолжается вирусный жизненный цикл.

Во время последней вспышки лихорадки Эбола были изучены многочисленные терапевтические препараты, включая нуклеозидные и нуклеотидные аналоги (BCX4430, бринцидофовир, фавипиравир и GS-5734), препараты на основе нуклеиновых кислот (ТКМ – Ebola и AVI-7537), плазма реконвалесцентов, моноклональные антитела, а также были исследованы новые возможности использования уже известных препаратов (репозиционирование лекарств) [131].

Аналоги нуклеотидов и нуклеозидов проявляют противовирусный эффект путем терминации репликации или транскрипции, а также прямого ингибирования вирусных полимераз и киназ. BCX4430 (Галидесвир) – синтетический аналог аденозина, ингибирует репликацию РНК-содержащих вирусов различных семейств. *In vivo*, на низших приматах BCX4430 показал 100% эффективность в отношении вирусов Марбург и вируса Эбола. Первая фаза клинических испытаний показала безопасность применения BCX4430 при внутримышечном введении. Ремдесвир (GS-5734) тоже является аналогом аденозина, являясь пролекарством, внутри клетки превращающимся в активную форму – трифосфат и быстро накапливающимся в клетках моноцитарного ряда. GS-5734 показал активность *in vitro*, а также *in vivo*, в исследованиях на низших приматах, в отношении различных штаммов вирусов Эбола и Марбург, Зарегистрировано два случая успешного применения ремдесвира в качестве терапии отчаяния у инфицированных вирусом Эбола пациентов. В настоящее время проходит 2 фазу клинических испытаний. Бринцидофовир (CMX001) представляет собой липидный конъюгат ациклического аналога цитозина – цидофовира, ингибирующего ДНК- полимеразу и активного в отношении широкого спектра ДНК –вирусов. Бринцидофовир прошел 2 и 3 фазу клинических испытаний для лечения циромегаловирусной и аденовирусной инфекций. Интересно, что антифиловирусов активность бринцидофовира обусловлена, по всей видимости, липидной частью молекулы [144]. После того, как была выявлена ингибирующая активность бринцидофовира в отношении филовирсов *in vitro*, он был испытан во время эпидемии в 2014 году на четырех пациентах, инфицированных вирусом Эбола. Клинические испытания

бринцидофовира в качестве средства для лечения лихорадки Эбола должны были начаться в январе 2015, однако, так и не были начаты. Фавипиравир (Т-705 или Авиган) – препарат из группы пиразинамидов, изначально разработанный как средство против вируса гриппа. Т-705 активен в отношении широкого спектра РНК-вирусов, включая буньявирусы, аренавирусы, флавивирусы, норовирусы, алфивирусы, пикорнавирусы и парамиксовирусы. Внутри клетки Т-705 превращается в Т-705-рибофуранозил-5 –трифосфат и селективно ингибирует РНК-зависимую РНК-полимеразу. Показана эффективность фавипиравира в отношении инфекции вирусом Эбола у мышей при применении через 1 час, а также через 6 дней после инфекции. Однако он оказался неэффективен при применении на 8 день после инфекции, на который приходится пик виремии. Клинические испытания Т-705 для терапии инфекции вирусом Эбола были начаты в декабре 2014 года, предварительные результаты показали снижение уровня смертности у больных с низкой и средней вирусной нагрузкой. Также был описан случай эффективного применения фавипиравира у больного, страдающего постинфекционным увеитом после перенесенной острой инфекции. Однако дизайн исследования и эффективность применения фавипиравира у людей остается спорной.

В исследованиях на низших приматах обнадеживающие результаты показала антисмысловая терапия - морфолиновые олигомеры, AVI-7537 и AVI-6002, блокирующие трансляцию VP24 и VP24/VP35, соответственно, и малые интерферирующие РНК –ТКМ-100802 (ТКМ-Ebola) и ее производное ТКМ-130803, представляющие собой комбинацию малых интерферирующих РНК, и, соответственно, имеющие несколько вирусных мишеней - L, VP35, и VP24). ТКМ-Ebola, AVI-6002 и AVI-7537 прошли первую фазу клинических испытаний. Однако ТКМ-Ebola показал свою неэффективность во второй фазе. Информации о дальнейшем исследовании AVI-6002 и AVI-7537 нет.

До 2014 года для лечения лихорадки Эбола использовались сыворотки реконвалесцентов. Позже начали применяться смеси моноклональных антител. ZMapp представляет собой смесь гуманизированных антител ZMAb и MB-003, полученных в трансгенном растении *Nicotiana tabacum*. Применение ZMapp у обезьян после инфицирования смертельной дозой вируса Эбола оказалось эффективным даже при начале терапии уже после появления клинических проявлений вирусной инфекции. Описан случай излечения заболевания после применения ZMapp у двух медицинских работников, заразившихся вирусом Эбола в Либерии во время вспышки в 2014 году. Однако, помимо применения ZMapp, обоим пациентам проводили агрессивную инфузионную терапию и переливание цельной крови, в том числе, полученной от реконвалесцентов, поэтому вопрос, был ли ZMapp ключевым фактором исцеления, остается открытым и несмотря на то, что применение ZMapp снижало смертность на 40%, результаты не считаются статистически значимыми.

Относительно недавно интерес исследователей был обращен в сторону поиска ингибиторов клеточных факторов, необходимых для филовиральной инфекции, в том числе, молекул адгезии – лектинов, TIM-1, а также катепсинов, TPC2, NPC1.

В дополнение к скринингу библиотек новых соединений и оптимизации соединения-лидера, некоторый успех имеет стратегия перепрофилирования лекарственных средств. Поиск веществ, имеющих антифиловиральную активность, ведется среди зарегистрированных лекарственных препаратов, применяемых для лечения других заболеваний. К ингибиторам филовиральной инфекции относятся антибиотики (эритромицин, азитромицин), противомалярийные средства (хлорохин, амодиахин), блокаторы ионных каналов (бепридил, нимодипин, дилтиазем, верапамил, амлодипин), антидепрессанты (флуоксетин, сертралин, дезипрамин, имипрамин, амитриптилин), антимикотики (нистатин), противоопухолевые средства (торемифен, кломифен) и др. (азидотимидин, колхицин, ципрогептадин, прохлорперазин и аминазин, пенбутолол, гепарин, бафиломицин A1, бензтропин).

Актуальность проблемы поиска новых препаратов для лечения инфекций высокопатогенными вирусами, в том числе, ингибиторов входа вируса гриппа и филовирусов определяется рядом причин, в том числе, возможностью передачи возбудителя от человека к человеку, отсутствием специфического лечения и профилактики, а также регулярно происходящими вспышками филовиральных инфекций и инфекций «новыми», ранее нехарактерными для людей субтипами вируса гриппа А. Таким образом, псевдовirus являются удобной заменой живым вирусам при изучении функций поверхностных вирусных белков, а также инструментом для первоначального скрининга библиотек противовирусных веществ, ингибирующих стадии инфекции, опосредованных данными белками.

2. Экспериментальная часть

2.1 Материал и методы

2.1.1 Плазмиды

Для экспрессии поверхностных белков вируса гриппа в эукариотических клетках были использованы плазмиды, кодирующие гены двух вариантов гемагглютинаина H5, трех вариантов H1 (отличающихся рецепторной специфичностью) и трех вариантов нейраминидазы N1. Плазмида pсDNA3-H5-Egypt подтипа H5 (далее – «H5(Egypt)») экспрессирует ген гемагглютинаина H5 изолята вируса гриппа A/Egypt/N04395/2009(H5N1). Ген гемагглютинаина (идентификационный номер GenBankCY041941) был синтезирован фирмой GenScript, следует за консенсусной последовательностью Козака GCCGCC, был субклонирован в вектор pсDNA3. Плазмида pCAGGS-H5-Kan (далее – «H5(Thailand)»), экспрессирующая ген HA вируса «птичьего» гриппа высокопатогенного штамма A/Thailand/KAN-1/2004(H5N1), была получена путем переклонирования гена HA из плазмиды pHW2000, предоставленной доктором E. Hoffman (UTMB, Техас, США).

Плазмиды, кодирующие три варианта гемагглютинаина подтипа H1: гены гемагглютинаина двух штаммов вируса гриппа - A/South Carolina/1/1918 и A/New York/1/18 (идентификационный номер в Genebank AF117241.1 и AF116576, соответственно, отличающиеся одной аминокислотной заменой в позиции 225 (D225G)), выделенных от людей, умерших во время пандемии «Испанки» [145], а также последовательность гена HA, который отличается одной аминокислотной заменой в позиции 190 от HA штамма A/New York/1/18 (D190E) [146]. Все три гена были синтезированы фирмой Eurogen. В целях обеспечения равной экспрессии генов изучаемых белков они клонировались в один и тот же экспрессионный вектор pCAGGS, имеющий сильную промоторную область CAG, с использованием одинаковой стратегии клонирования. Плазмидные конструкции с разными генами H1 отличаются сайтами рестрикции в участках встройки этих генов (KpnI для A/South Carolina/1/1918, KpnI + NotI для A/New York/1/18, NotI + BglII для A/New York/1/18 (D190E)), что позволяет легко отличить их друг от друга. Плазмида pCI-Neo-N1(California), экспрессирующая нейраминидазу пандемического штамма вируса гриппа A/California/27/2009/H1N1, была предоставлена доктором B. Labrosse (INSERMU941, Франция). Плазмида pCAGGS-N1(Hamburg), экспрессирующая нейраминидазу вируса гриппа изолята A/Hamburg/05/2009/H1N1, предоставлена доктором М. Матросовичем (Институт вирусологии, Марбург, Германия).

Плазмиды pCAGGS-N1(Kan), экспрессирующая нейраминидазу вируса гриппа изолята A/Thailand/1(KAN-1)/2004/H5N1 и pCAGGS-N1-Rus, экспрессирующая ген NA пандемического штамма A/Russia/01/2009(H1N1), были получены путем переклонирования гена NA из

соответствующих плазмид рНW2000-N1, предоставленных доктором E. Hoffman.

Плазмида рсDNA3-MarVGP, экспрессирующая ген поверхностного гликопротеина вируса Марбург штамма Musoke, клонированный в вектор рсDNA3, и плазмида рLP-VSVG, экспрессирующая ген поверхностного гликопротеина G BBC были предоставлены профессором Дэйви Р. А. (Texas Biomedical Research Institute, США).

Плазмида TMPRSS2, кодирующая ген трансмембранной сериновой протеазы 2 (TMPRSS2) была любезно предоставлена доктором М. Матрасовичем.

Плазмида реGFP-N1, экспрессирующая зеленый флуоресцентный белок (GFP) (Clontech, США), использовалась как маркер эффективности трансфекции.

2.1.2 Клеточные линии

В работе использовались клетки линии HEK293, 293 FT, Vero, U87-MG, MT-4, CEM, RAW 234.7, ANA-1, U937 и THP-1.

HEK293 – это линия эмбриональных клеток почки человека (Human Embryonic Kidney cells), immortalized с помощью трансформации ДНК аденовируса 5 типа. Конститутивная экспрессия гена E1A аденовируса, продукт которого способен активировать транскрипцию с некоторых вирусных промоторов, обеспечивает, высокий уровень экспрессии соответствующих плазмидных векторов. Линия клеток 293 FT, созданная путем стабильной генетической модификации исходной клеточной линии HEK 293 плазмидным вектором, кодирующим Т антиген вируса SV40. Конститутивная экспрессия большого Т антигена вируса SV40 при культивировании таких клеток в присутствии антибиотика генетицина (G418) способствует эпизодической репликации плазмидных векторов, содержащих область начала репликации из генома вируса SV40.

Линия Vero — это линия клеток почечного эпителия африканской зеленой мартышки *Chlorocebusaethiops*. CEM – клетки Т-лимфобластной лейкемии человека. RAW 234.7 – мышьяная макрофагальная клеточная линия, полученная из опухоли, индуцированной вирусом мышьяной лейкемии Абельсона (A-MuLV). ANA-1 – клетки миеломоноцитарной линии, полученные из костного мозга мыши, immortalized с помощью инфекции рекомбинантным ретровирусом J2. U937 – клеточная линия гистиоцитарной лимфомы человека. THP-1 – клетки острой моноцитарной лейкемии человека. U87-MG – клетки глиобластомы человека.

Клетки линии U87-MG, Vero и HEK 293 культивировались на среде DMEM с добавлением 10% FBS (Thermo Scientific, США), смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина в концентрациях 100 Ед/мл и 100мкг/мл соответственно, 6 ммоль/л L-глутамин (Биолот, Россия) во влажной атмосфере при 37°C в атмосфере с 5% содержанием CO₂ (в CO₂ -

инкубаторе). Клетки 293FT (Invitrogen, США), культивировались при тех же условиях в той же среде с добавлением генетина (G418) в концентрации 500 мкг/мл.

Клетки линий MT-4, CEM, RAW 234.7, ANA-1, U937 и THP-1 культивировались в среде RPMI с добавлением 10% FBS и смеси антибиотиков и L-глутамина в тех же концентрациях.

2.1.3 Рекомбинантные BBC

Рекомбинантный BBC (VSV-ΔG-G) был любезно предоставлен профессором Дэйви Р. А. (Texas Biomedical Research Institute, США). Он представляет собой репликационно дефектный BBC: в его геноме удален ген поверхностного гликопротеина G и на его место вставлен репортерный ген (ген люциферазы светлячка (luc) или ген красного флюоресцентного белка (dsRed)), использующийся для количественной оценки трансдуцирующей активности pBBC. При заражении клеток экспрессирующих поверхностный гликопротеин G, вирусом VSV-ΔG-G, происходит амплификация вируса (принцип тот же, что и при получении псевдотипов, описано ниже).

2.1.4 Растворы ингибиторов

Озельтамивира карбоксилат (ОК) был синтезирован из фосфата озельтамивира в НИОХ им. Н. Н. Ворожцова СО РАН. Стоковый раствор ингибитора концентрацией 100мМ в DMSO разводили до нужной рабочей концентрации клеточной средой.

Оригинальные ингибиторы. Библиотека оригинальных полусинтетических веществ, производных (+)-камфоры, дегидроабиэтиламина, пара-мента-1,8-диен-5,6-диола, (-)-изопулегола, деоксихолиевой кислоты, (+)-усниновой кислоты, аминоадамантана, азаадамантана и (-) борнеола, была получена из НИОХ им. Н. Н. Ворожцова СО РАН. Библиотека производных борнеола включала в себя 2 ряда N-содержащих борниловых эфиров, отличающихся длиной алифатической цепи (одна CH₂- и две CH₂- группы) между атомом азота и эфирной группой.

2.1.5 Трансформация плазмидной ДНК

Для наработки плазмидной ДНК использовали клетки *E.Coli* штамма *Top10* (Invitrogen). Колонии бактерий, содержащих целевую плазмиду, получали при помощи трансформации клеток методом электропорации с использованием прибора GenePulserXcell™ ElectroporationSystem (Bio-Rad, США). Для проведения электропорации использовался предустановленный в памяти прибора протокол: экспоненциально затухающая форма импульса, напряжение 1.8 kV, зазор ячейки шириной 0.1 см, длительность импульса около 5мс. Элетрокомпетентные клетки приготавливались согласно инструкции к прибору и хранились при -70°C. Аликвоты по 40 мкл элетрокомпетентных клеток размораживались на ледяной бане около 5мин, затем к ним добавляли 0,5-1 мкг препарата плазмиды. После этого полученную

смесь инкубировали на льду в течение 5 минут и переносили в 1мм щель кюветы, предварительно охлажденной на ледяной бане. После электропорации кювету сразу промывали однократно 1 мл холодной LB-среды (10 г/л хлорида натрия, 10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта) без антибиотика, переносили трансформированные клетки *E.Coli* в 15 мл пробирки и помещали в термостатированный орбитальный шейкер (37°C, 100 об/мин) на 45 мин. Часть культуры (около 20 мкл) высевали на чашки с агаризованной LB-средой, содержащей антибиотик (ампициллин в концентрации 100мг/мл для плазмид, кодирующих гены поверхностных белков или канамицин 50 мкг/мл для pGFP-N1, остальной объем культуры концентрировали центрифугированием в течении 5 мин при 4000 об/мин и также высевали на чашки Петри. Чашки помещали в термостат на 16-20 ч при температуре 37°C.

2.1.6 Выделение плазмидной ДНК

Выделение ДНК проводилось из ночных культур в форматах mini-prep (из 1-5 мл культуры) и maxi-prep (из 50-100 мл культуры) с помощью наборов, согласно протоколу производителя, представляющему собой модифицированный метод щелочного лизиса с последующей сорбцией плазмидной ДНК на колонках, состоящих из диоксида кремния. Для этого нужный объем ростовой среды LB, содержащей антибиотик ампициллин в концентрации 100 мкг/мл или канамицин в концентрации 50 мкг/мл, инокулировали единичной колонией *E.Coli* и культивировали в термостатированном (37°C) орбитальном шейкере в течение 16- 20 ч на скорости 220-250 об/мин. Для подтверждения молекулярной структуры трансформированных плазмид использовали рестрикцию ферментами компании Fermentas (Латвия) или ферментами компании СибЭнзим (Россия) с последующим анализом рестрикционных фрагментов методом электрофореза в 1% агарозном геле. Выделение ДНК в мини-формате производили набором для выделения плазмидной ДНК (BioSilica, Россия). Для выделения ДНК в формате maxi-prep остаток культуры (100мкл), служившей для выделения mini-prep, помещали в 100 мл среды LB с антибиотиком и выращивали в термостатированном (37° C) орбитальном шейкере при температуре и скорости вращения 200-220 об/мин до необходимой оптической плотности при 600 нм ($3-4 \cdot 10^9$ кл/мл) около 16 – 20 ч. Контроль оптической плотности культуры производили при помощи спектрофотометра SmartSpec™ Plus (Bio-Rad, США) в 1 мл пробы. Для выделения ДНК в формате maxi-prep использовался коммерческий набор Midi/Maxi Prep Kit (Qiagen, Германия). Определение концентрации ДНК в полученном препарате производилось при помощи спектрофотометра NanoPhotometer™ P-Class P330 (Implen, Германия). Плазмиды хранили в свободной от нуклеаз воде при – 20°C.

2.1.7 Получение псевдовирюсов на основе лентивирусного капсида

Псевдовирюсы на основе лентивирусного капсида были получены ко-трансфекцией плазмид: плазмиды поверхностного белка G (pMD2.G) или другого поверхностного белка, упаковочной psPAX2 и репортерной pLegoG2 или pHIV-Luciferase (Addgene repository plasmid # 12259, 12260, 12254 и 21375, соответственно) из расчета 5/10/15 мкг на 60-мм чашку. Через 12 часов после трансфекции среду с трансфекантом меняли на свежую, сбор псевдовирюсов производился через 48 часов после трансфекции методом люминометрии (при использовании pHIV-Luciferase) или проточной цитометрии (при использовании pLegoG2).

2.1.8 Получение псевдовирюсов на основе pVBS

Псевдовирюсы с поверхностными белками вируса гриппа H5N1 получали путем трансфекции плазмид, кодирующих соответствующие поверхностные белки вируса гриппа – HA5 и NA1, с последующей инфекцией трансфицированного монослоя клеток рекомбинантным вирусом везикулярного стоматита (rVSV-ΔG-G). Клетки 293FT плотностью 70–80%, рассаженные накануне, трансфицировались кальций-фосфатным методом с использованием HEPES буфера (pH = 7.05). За 1 час до трансфекции клеточная среда заменялась на свежую среду без генетина. Количество трансфицируемых плазмид, кодирующих NA и HA, равнялось 5 мкг каждой из расчета на 60 мм чашку. Для контроля эффективности трансфекции к смеси плазмид, экспрессирующих поверхностные белки, добавляли 0,4 мкг плазмиды reGFP-N1, эффективность трансфекции оценивалась визуально через 12 часов по количеству светящихся зеленым цветом клеток при флуоресцентной микроскопии. На следующий день клетки отмывались от остатков трансфектанта и заражались 20 мкл VSV-ΔG-G (что соответствует около 2×10^8 относительных люминисцентных единиц (ОЛЕ)) или, в некоторых случаях, о чем будет сказано отдельно, 100 мкл VSV-ΔG-dsRed-G (что соответствует эффективности инфекции около 80%) через 24 часа после трансфекции. Спустя 4 ч после добавления вируса клетки дважды отмывались теплой средой и далее культивировались в свежей ростовой среде без генетина. Сбор вируса VSV-ΔG-H5N1 производился через 24 часа после инфекции. Псевдовирюсные препараты очищали от клеточных остатков низкоскоростным центрифугированием при 3000 об/мин в течение 2 минут с последующим фильтрованием через 0.45 мкм фильтр. Аликвоты псевдовирюсного препарата хранили при -70°C. В качестве отрицательного контроля использовали псевдовирюсы, не несущие на своей поверхности никакие поверхностные белки. Такие псевдовирюсы получали при трансфекции клеток-продуцентов плазмидой bGal, экспрессирующей ген бета-лактамазы beta-Gal и не кодирующей никакого поверхностного белка, с последующей инфекцией клеточного монослоя таким же количеством VSV-ΔG-G, как при получении псевдотипированных вирусов.

Для получения псевдовирюсов в присутствии ингибитора озельтамивира карбоксилата (см. ниже), клетки 293 FT в 12 – луночном планшете трансфицировали кальций – фосфатным методом плазмидами pcDNA3-H5-Egypt и pCAGGS-N1(Hamburg) по 1 мкг на лунку, через 12 часов отмывали от трансфектанта и заражали 2 мкл VSV-ΔG-G. Спустя 3 часа в опытных лунках среду с вирусом заменяли на среду, содержащую ингибитор в концентрации 500 нМ, а в контрольных лунках на среду без ингибитора. На следующий день отбирали среду, содержащую псевдовирюс.

При получении псевдовирюсов VSV-ΔG-H1N1 клетки дополнительно ко-трансфицировались плазмидой, экспрессирующей протеазу TMPRSS2 (1/4 количества плазмиды H1) для протеолитической активации гемагглютининов H1.

Псевдовирюсы, экспрессирующие поверхностный гликопротеин вируса Марбург (VSV-ΔG-MarV) получали аналогичным образом, количество трансфицируемой плазмиды pcDNA3-MarVGP равнялось 5 мкг из расчета на 60 мм чашку.

2.1.9 Определение трансдуцирующей способности псевдовирюсов

Для определения трансдуцирующей способности псевдовирюсов использовали клетки-мишени линии HEK293, рассаженные в 96 – луночный планшет, плотностью монослоя 80–90%. Клетки заражали различным количеством вирусного препарата в тройных повторях (с последующим центрифугированием/осаждением псевдовирюса при 3000 об./мин и температуре 4°C в течение 60 мин или без него).

А) Псевдовирюсы, кодирующие ген люциферазы. Измерение люциферазного сигнала производили через 24 ч после инфекции: к инфицированным клеткам после отбора среды добавляли по 20 мкл лизирующего буфера (0,5% Тритон-X100 в 50 мМ Трис-HCl (pH 7.4), 15 мМ MgSO₄, 4 мМ ЭГТА, 1 мкМ ДТТ) затем 65 мкл люциферазного буфера (25 мМ глицил-глицин, 15 мМ MgSO₄, 4 мМ ЭГТА, 100 мМ фосфата калия, 200 мМ АТФ, 1 мкМ ДТТ) и 35 мкл 200мМ люциферина в 25мМ глицил-глициновом буфере. Люминометрия осуществлялась на приборе GloMax plate reader (Promega). Трансдуцирующей способностью псевдовирюса, псевдотипированного поверхностными белками, считали разность сигналов люциферазы, полученных при инфекции одинаковыми количествами псевдотипированного вируса и отрицательного контроля (непсевдотипированного капсида).

Б) Псевдовирюсы, кодирующие ген красного флуоресцентного белка. Трансдуцирующую активность псевдовирюсов, кодирующих красный флуоресцентный белок dsRed, определяли качественно, с помощью флуоресцентного микроскопа, и количественно (% dsRed-экспрессирующих клеток), методом проточной цитометрии с помощью прибора FACS Canto II («Becton Dickinson», США) через два дня после инфекции. Для проточной цитометрии клетки предварительно фиксировали 0.5% раствором формальдегида в ФСБ.

В) Модифицированный метод образования бляшек. Клетки линии Vero, рассаженные в 12-луночный планшет, плотностью монослоя 90%, трансфицировали 0,05 мкг плазмиды plp-VSVG, содержащей ген поверхностного гликопротеина G BBC. На следующий день трансфицированные клетки инкубировали с псевдовиром в серии десятикратных разведений в течение часа, при постоянном покачивании на ротационной платформе со скоростью 100 об/мин при температуре 37°C, затем заливали 0,9% раствором агарозы. Подсчет образовавшихся бляшек проводили на следующий день. «Титр» частиц в полученном псевдовиральном препарате, выраженную в бляшкообразующих единицах (БОЕ) на мл, рассчитывали по формуле:

«Титр» = сумма средних арифметических количества бляшек в каждом разведении / объем заражающей дозы x сумму разведений псевдовирального материала

2.1.10 Образование синцитиев

Клетки 293FT ко-трансфицировались плазмидами, экспрессирующими гены гемагглютининов, с плазмидой reGFP-N1, экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок. В случае гемагглютининов H1, клетки дополнительно ко-трансфицировались плазмидой, экспрессирующей протеазу TMPRSS2 для их протеолитической активации. Через 2 дня после трансфекции образование синцитиев в монослоях индуцировалось кислым фосфатным буфером (pH~5.0) в течение 5 минут с последующей инкубацией в ростовой среде в течение часа при 37°C. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, трансфицированные плазмидой reGFP-N1 без поверхностных белков. Флуоресцентная микроскопия образующихся синцитиев производилась на микроскопе ZeissAxioObserver D1 (200x). Нормализация интенсивностей флуоресценции с удалением подпороговых значений флуоресценции (шум) и сегментированием изображений проводилось с помощью алгоритмов Watershedding и ParticleAnalysis программного пакета ImageJ.

2.1.11 Подавление псевдовиральной инфекции VSV-ΔG-H5N1 лизосомотропными агентами

Стоковые (концентрация 1M) растворы ингибиторов (хлорохина и хлорида аммония) в деионизированной воде в дальнейшем разводили в ростовой среде DMEM до нужной рабочей концентрации и добавляли к клеткам-мишеням за 30 минут до инфекции псевдовиром VSV-ΔG-H5N1 (5×10^7 БОЕ). Через 4 ч клеточную среду заменяли на новую, не содержащую ингибиторов и вирусов.

2.1.12 Нейтрализация VSV-ΔG-H5N1 антителами

Для проведения нейтрализации псевдовируса использовали серию последовательных десятикратных разведений антител. Псевдовиром VSV-ΔG-H5N1 (4×10^7 БОЕ) инкубировали с

моноклональными антителами 6F3 против гемагглютинаина H5 вирусного изолята A/duck/Novosibirsk/56/05 (предоставлены докт. биол. Наук Куш А.А., Институт вирусологии им. Ивановского, Москва) и поликлональной сывороткой хорька против изолята вируса гриппа H5N1 A/Gs/Krasnoozerskoye/627/05 (предоставлены д. б. н. А. М. Шестопаловым, НИИЭКМ) в течение 30 минут при комнатной температуре и при постоянном покачивании на ротационной платформе. Затем псевдовиром со связанными антителами добавляли к клеткам-мишеням. Нейтрализацию псевдовиром VSV-ΔG-G, т. е. «псевдотипированного» гомологичным поверхностным гликопротеином G проводили в аналогичных условиях, при тех же концентрациях антител, и использовали в качестве контроля неспецифического ингибирования антителами.

2.1.13 Ингибирование VSV-ΔG-H5N1 карбоксилатом озельтамивира (ОК)

Проводили исследование активности ингибитора нейраминидазы ОК на двух стадиях инфекционного цикла - при продукции псевдовирусов и при заражении ими клеток - мишеней. Для определения влияния ОК на продукцию псевдовирусов, препарат получали по следующей методике. ОК в концентрации 500 нМ добавляли к клеткам-продуцентам VSV-ΔG- H5N1, непосредственно после отмывки VSV-ΔG-G, а трансдуцирующие титры полученных препаратов определяли методом люминометрии на следующий день после инфекции клеток-мишеней.

Для оценки действия ОК на ранние стадии инфекции, к клеткам-мишеням добавляли псевдовиром в среде с 10 нМ, 100 нМ, 500 нМ и 1000 нМ содержанием ингибитора, а в контрольные лунки добавляли псевдовиром в среде без ОК.

2.1.14 Создание модели многоциклового псевдовиромной инфекции VSV-ΔG-MarV в клеточном монослое

Клетки линии Vero, рассажённые накануне по 60 тыс. клеток на лунку 48-луночного планшета трансфицировали 0,2 мкг плазмиды pCDNA3-MarVGP или 0,03 мкг плазмиды pIpVSV-G, или 0,2 мкг плазмиды bGal, не кодирующей вирусные поверхностные белки. Затем трансфицированные клетки заражали, VSV-ΔG-MarV с репортерным геном красного флуоресцентного белка dsRed или, соответственно, VSV-ΔG-G в дозе 1×10^5 БОЕ. Клетки Vero, не экспрессирующие поверхностные белки, тоже заражали VSV-ΔG-G в той же дозе.

2.1.15 Изучение противовирусной активности производных терпеноидов

Стоковые растворы исследуемых веществ приготавливались в ДМСО в концентрации 100 мг/мл. Клетки-мишени, рассажённые за день до инфекции в 96-луночный планшет по 10^5 клеток на лунку, заражались VSV-ΔG-MarV, VSV-ΔG-H5N1 или VSV-ΔG-G ($2,5 \times 10^7$ БОЕ) в присутствии ингибиторов в концентрациях от 1 до 250 мкг/мл. Трансдуцированный

люциферазный сигнал измеряли через 24 ч после инфекции. Все измерения проводились в трипликатах. Для каждого вещества была определена полуингибирующая концентрация (IC₅₀).

2.1.16 Определение токсичности исследуемых веществ

Токсичность ингибиторов оценивали колориметрическим МТТ-тестом с использованием набора MTT Cell Proliferation Kit I (Sigma) согласно инструкции производителя. Способность клеток восстанавливать желтый тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазоол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ) в кристаллы пурпурно-синего формазана, отражает метаболическую активность (жизнеспособность) клеток. Клетки, посаженные накануне в 96-луночный планшет, инкубировались с веществами в течение 48 часов, затем к клеткам добавлялся МТТ-реагент (до конечной концентрации 0.5 мг/мл). После 4 часов инкубации при +37°C, образовавшиеся формазановые кристаллы растворялись добавлением 10% додецилсульфата натрия в 0,01М соляной кислоте. Оптическая плотность образцов измерялась на следующий день с помощью микропланшетного фотометра Sunrise (Tecan) при длине волны 570 нм (референсная длина 630 нм). За 100 % принималась оптическая плотность клеток, не обработанных ингибиторами.

2.1.17 Исследование зависимости эффективности ингибиторов от момента их добавления к инфицированным псевдовиром клеткам (Time-of-addition assay)

Клетки линии НЕК 293 были посажены накануне в 96-луночный планшет, по 50 тыс клеток/лунку. Псевдовир VSV-ΔG-MarV добавляли к клеточному монослою (на льду), центрифугировали при 4°C на скорости 3000 об/мин в течение 60 минут. Затем среду, содержащую псевдовirus, меняли на свежую (охлажденную), предварительно дважды промыв клетки холодным ФСБ. «Инициация входа» псевдовиральных частиц в клетки осуществлялась путем изменения температуры до 37°C. В разное время: за 60 минут до, непосредственно до «инициации входа», а также через 5, 15 30, 60, 90 минут, 6, 12 часов после «инициации входа» псевдовirusов, к клеткам добавляли исследуемые ингибиторы – наиболее активные производные борнеола в концентрации 15 мкМ. В качестве контроля использовалась инфекция псевдовirusами в присутствии раствора ДМСО в соответствующей концентрации.

В качестве референсных веществ были выбраны ингибиторы заведомо известных стадий филовирусной инфекции: гепарин натрия в концентрации 10 мкг/мл ("Фармстандарт-Биолек"), ингибитор NPC-1 –зависимого входа имипрамин в концентрации 12,5 мкМ («EGIS») и ингибитор репликации РНК-зависимой РНК-полимеразы рибавирин в концентрации 40,9 мкМ («Озон»). Эффективность трансдукции псевдовirusов оценивали через 24 часа методом люминометрии.

2.1.18 Статистический анализ результатов

Для статистического анализа данных, построения графиков и диаграмм использовались пакеты программ SigmaPlot 12.5 (Demo version) и Microsoft Excel 2010. Для данных, соответствующих критериям нормального распределения, использовался t-критерий Стьюдента, для остальных использовался U-критерий Манна-Уитни, при $p < 0.05$ различия считали достоверными. В таблицах и на рисунках значения представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

2.2 Результаты

2.2.1 Трансдуцирующая активность псевдовиральных препаратов

Были получены псевдолентивирусы с репортерным геном люциферазы (использовалась трехплазмидная система, pHIV-Luciferase в качестве репортерной плазмиды) и с репортерным геном зеленого флуоресцентного белка (репортерная плазида pLegoG2). В качестве псевдотипирующих поверхностных белков, были выбраны гликопротеин G BBC, благодаря его способности обеспечивать заражение многих клеточных линий, а также вируса гриппа. Были сконструированы псевдовirusы, экспрессирующие на своей поверхности гемагглютинин H5 вируса гриппа изолята A/Egypt/N04395/2009 в комбинации с нейраминидазой N1 изолятов A/Thailand/(KAN-1)/2004/H5N1 или A/Hamburg/05/2009/H1N1.

Параллельно были получены псевдотипы на основе капсида pBBC с теми же поверхностными белками вируса гриппа. Поскольку при трансдукции клеток одинаковым количеством псевдолентивирусов и псевдовirusов pBBC, последние показали большую эффективность, для производства псевдотипов с другими поверхностными белками была выбрана система на основе pBBC. В таблице 1 представлены порядки трансдукционной активности псевдовirusов с различными капсидами в относительных люминесцентных единицах (ОЛЕ).

Таблица 1. Сравнительная эффективность трансдукции клеток-мишеней псевдовirusами на основе капсида лентивируса и капсида pBBC.

Псевдотипирующие белки (G*)	Лентивирусный капсид, ОЛЕ	pBBC, ОЛЕ
G (BBC)	3×10^5	$1,5 \times 10^6$
H5 (A/Egypt/N04395/2009/H5N1) + N1 (A/Thailand/(KAN-1)/2004/H5N1)	5×10^4	2×10^6
H5 (A/Egypt/N04395/2009/H5N1) + N1 A/Hamburg/05/2009/H1N1	2×10^4	3×10^5

Клетки линии HEK293 заражали 50 мкл псевдовирального препарата VSV-ΔG-G*с репортерным геном люциферазы и оценивали трансдуцирующую активность через 48 часов после заражения. Трансдуцирующая активность выражена в относительных люминесцентных единицах (ОЛЕ).

В настоящее время для количественной оценки эффективности вирусной (или псевдовиральной) инфекции используются различные репортерные белки - разнообразные

флюоресцентные белки, бета-галактозидаза, люцифераза, и т.д., которые экспрессируются при заражении клеток.

Выбор репортерного гена зависит от доступности реактивов и лабораторного оборудования, позволяющих детектировать его экспрессию, в то же время каждый репортер (и метод детекции) имеют свои преимущества и недостатки для решения той или иной задачи. Так, например, использование планшетных ридеров (люминометров и флюориметров) позволяет осуществлять высокопроизводительный скрининг противовирусных средств с использованием в качестве репортера как люциферазы, так и флюоресцентных белков, хотя первый метод обладает большей чувствительностью и, соответственно, позволяет использовать псевдовirusы с более низким трансдуцирующим титром. С другой стороны, использование флюоресцентных белков позволяет определять абсолютное количество зараженных клеток, вычислять «множественность инфекции» (МИ, *англ. MOI, multiplicity of infection*), т.е. отношение числа заражающих единиц (т.е., в данном случае, псевдовирусных частиц) к количеству клеток-мишеней, наблюдать за распространением инфекции в клеточном монослое.

В данной работе используются рВВС с геном люциферазы светлячка, встроенным в геном и рВВС с геном красного флюоресцентного белка dsRed.

Возможность создания псевдовирусов на основе капсида ВВС с гетерологичными вирусными поверхностными белками осуществляется благодаря гликопротеин-G – независимой сборке и отпочковывания вирусных частиц ВВС. Однако, рВВС, псевдотипированный поверхностными белками разных вирусов, образуются с неодинаковой эффективностью. Для оценки действия противовирусных средств необходимо, чтобы отношение значений трансдуцирующих титров в положительном контроле (в отсутствие ингибитора) к отрицательному контролю (представляющему собой люминесцентный сигнал в клетках-мишенях в отсутствие специфической трансдукции клеток-мишеней) было высоким. Кроме того, для возможности использования псевдовирусов для количественного анализа действия противовирусных средств, важно установить диапазон доз псевдовирусного препарата, в котором сохраняется линейность люминесцентного сигнала. Для определения диапазона линейности люминесцентного сигнала клетки-мишени заражали различными дозами псевдовирусов ($0,5 - 10 \times 10^7$ БОЕ), несущих на своей поверхности гетерологичные вирусные белки и теми же количествами препарата (по объему), используемого в качестве отрицательного контроля.

Люминесцентный сигнал, детектируемый при заражении клеток-мишеней псевдовирусом с поверхностными белками вируса гриппа, превышал отрицательный контроль (люминесцентный сигнал, детектируемый при заражении клеток-мишеней псевдовирусом без поверхностного белка) от 3 до 1500 раз в зависимости от дозы псевдовируса, что

свидетельствует о высокой трансдуцирующей активности полученного псевдовируса. С увеличением количества псевдовируса в выбранном диапазоне доз, люминесцентный сигнал возрастал линейно. При заражении клеток-мишеней количеством вируса, подобранным для определения действия ингибиторов и нейтрализации антителами (5×10^7 БОЕ), превосходил фоновый более чем в 1000 раз (Рисунок 10).

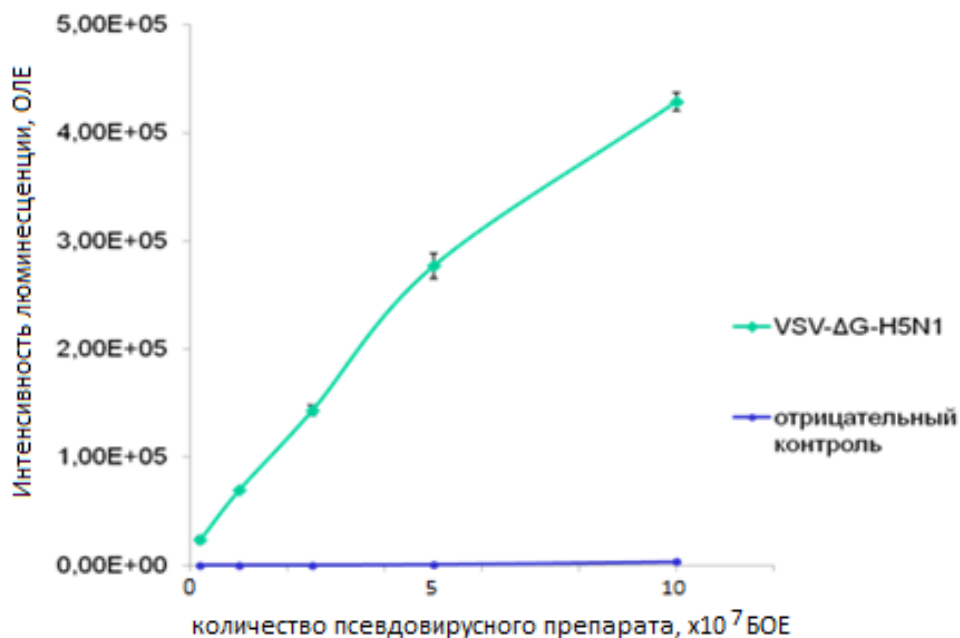


Рисунок 10. Трансдуцирующая активность псевдовируса VSV-ΔG-H5N1, экспрессирующего гемагглютинин H5(A/Egypt/N04395/2009/H5N1) и нейраминидазу N1(A/Hamburg/05/2009/H1N1). Клетки линии HEK293 заражали различными дозами псевдовирального препарата, люминесценцию зараженных клеток оценивали через 24 часа после инфекции. Отрицательный контроль – псевдовирус без поверхностных белков.

Таким образом, удовлетворяя условиям линейной зависимости сигнала люциферазы от дозы псевдовируса и демонстрируя отношение сигнала люциферазы по сравнению с фоновым значением (отрицательный контроль) в 100-1000, предложенная система подходит для количественной оценки ингибирующего эффекта веществ, обладающих активностью против поверхностных белков вируса гриппа.

На основе pBBC были получены псевдовирусы, экспрессирующие на своей мембране гемагглютинин H5 в комбинации с другими нейраминидазами N1 вируса гриппа. Такой же подход использовался для получения VSV-ΔG-MarV - pBBC, псевдотипированного поверхностным гликопротеином вируса Марбург.

На рисунке 11 представлен диапазона линейности люминесцентного сигнала при заражении клеток-мишеней различными дозами псевдовирусов ($0,5 - 5 \times 10^7$ БОЕ), VSV-ΔG-MarV и VSV-ΔG-G. В то время как для VSV-ΔG-MarV люминесцентный сигнал возрастает

пропорционально возрастанию дозы псевдовируса, при заражении клеток-мишеней VSV-ΔG-G дозой больше $2,5 \times 10^7$ БОЕ, люминесцентный сигнал выходит на плато.

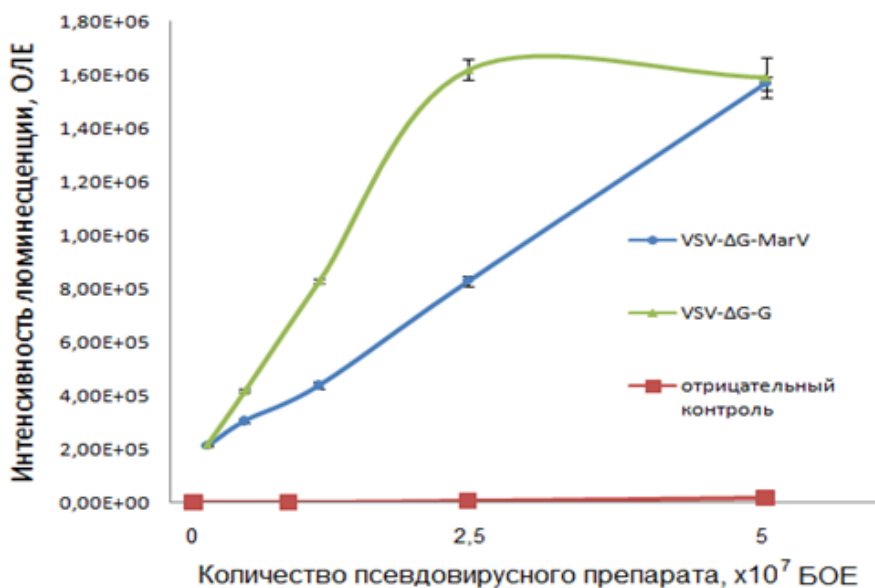


Рисунок 11. Трансдуцирующая активность псевдовирусов VSV-ΔG-MarV и VSV-ΔG-G. Клетки линии HEK293 заражали различными дозами псевдовирального препарата, люминесценцию зараженных клеток оценивали через 24 часа после инфекции. Отрицательный контроль – псевдовирус без поверхностных белков.

Диапазон линейности сигнала определялся при получении каждого псевдовирального препарата VSV-ΔG- H5N1 (данные не указаны).

2.2.2 Определение титров псевдовиральных препаратов с помощью метода образования бляшек

Метод образования бляшек является стандартным вирусологическим методом для определения концентрации некоторых вирусов. ВВС, размножаясь в клеточном монослое, залитом агаровой средой, способен образовывать бляшки, представляющие собой погибшие (или открепившиеся) под действием вируса клетки. Поскольку рВВС при заражении клеток-мишеней не производит вирусного потомства (в связи с отсутствующим в его геноме геном поверхностного белка G), при инфекции клеток рВВС бляшки не образуются. Однако, если клетки-мишени будут экспрессировать вирусный поверхностный белок, инфекция рВВС будет проходить несколько циклов, а нанесение на инфицированный клеточный монослой агарового покрытия способствует предотвращению переноса и быстрого распространения вируса.

В ходе данной работы клетки линии Vero, экспрессирующие гликопротеин G ВВС, доставленный трансфекцией плазмиды plp-VSVG, заражался псевдовирусами с поверхностными гликопротеинами вируса гриппа, Марбург и ВВС. Первый цикл инфекции обусловлен именно поверхностными белками псевдовирусов, тогда как дальнейшие циклы

обеспечиваются гликопротеином G, наследуемым образующимся псевдовиральным потомством из мембраны клеточного монослоя.

Для псевдовирусов с VSV-ΔG-H5N1 в отдельных экспериментах титр достигал 10^8 БОЕ.

Титры полученных псевдовиральных препаратов выравнивали внутри индивидуального эксперимента по сигналу люциферазы, далее равенство титров дополнительно независимо подтверждалось с помощью метода бляшкообразования (данные не представлены).

2.2.3 Оценка заражаемости различных клеточных культур псевдовиралами

Исследование клеточного тропизма полученных псевдовирусов и сравнение спектра перmissive клеток-мишеней с таковым самих инфекционных вирусов, гликопротеин которых использовался для псевдотипирования, является подходом, позволяющим оценить, насколько корректно полученный псевдотип отражает «нормальную физиологию» входа инфекционного вируса в клетку.

Понимание патогенеза вирусной инфекции обуславливает необходимость изучения восприимчивости различных клеток иммунной системы к вирусу гриппа.

В ходе данной работы изучена восприимчивость различных клеточных культур лимфоцитарного, макрофагального, а также глиального происхождения к инфекции псевдовиром, экспрессирующим на своей поверхности гемагглютинин субтипа H5 штамма A/Thailand/KAN-1/2004(H5N1) вируса птичьего гриппа и нейраминидазу пандемического штамма A/Russia/01/2009(H1N1) вируса гриппа. В качестве референсной клеточной культуры была выбрана линия HEK293, клетки которой считаются высоко перmissive для инфекции широким спектром вирусов (Рисунок 12). Линия клеток глиобластомы человека U87-MG оказалась перmissive к инфекции псевдовиром VSV-ΔG-H5N1. Псевдовирус так же способен заражать клетки человека лимфоидного происхождения линий MT-4 и CEM способны, хотя и в значительно меньшей степени, чем культуры, описанные выше. Клетки моноцитарных линий человека U937 и THP-1 и клеточные линии макрофагов мыши RAW 234.7 и ANA-1 оказались рестриктивны к этой псевдовиральной инфекции (Рисунок 12, А). В то же время, использованный для сравнения псевдовир VSV-ΔG-G заражает культуры клеток MT-4, CEM, U937 и RAW234.7 несколько более эффективно, чем VSV-ΔG-H5N1, тогда как клетки линий ANA-1 и THP-1 оказались рестриктивны к обоим типам псевдовирусов (Рисунок 12, Б). Таким образом, для всех исследованных клеточных линий, кроме U87-MG, значения сигнала трансдуцированной люциферазы при инфекции обоими типами псевдовирусов оказываются значительно более низкими, чем при инфекции клеток высокоперmissive линии HEK293. Для выяснения, связано ли это действительно с низкой эффективностью трансдукции этих клеточных линий псевдовиралами на основе капсида pBBC или же с некоторыми побочными эффектами экспрессии и детекции люциферазы в этих клеточных

линиях (например, протеолитическое расщепление люциферазы, нестабильность люциферина, устойчивость некоторых типов клеток к лизису буфером, используемым при детекции люциферазы), было проведено заражение клеток ВВС с поверхностным гликопротеином G и репортерным геном красного флюоресцентного белка (dsRed) (Рисунок 12, Б).

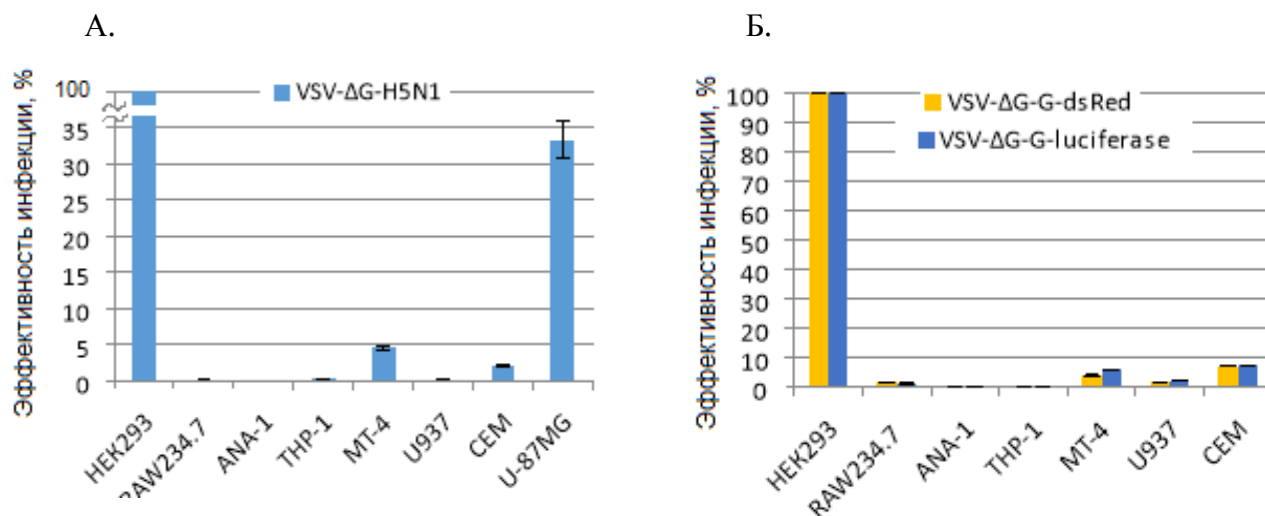


Рисунок 12. Заражаемость различных клеточных линий псевдовирuсами. А. Инфицирование различных клеточных линий псевдовирuсом VSV-ΔG-H5N1 с геном люциферазы. Значения выражены в % от эффективности заражения клеток линии HEK293. Б. Инфицирование различных клеточных линий псевдовирuсом VSV-ΔG-G с геном люциферазы и VSV-ΔG-G с геном красного флюоресцентного белка (VSV-ΔG-G(dsRed)). Значения выражены в % от эффективности заражения клеток линии HEK293.

Относительная восприимчивость (по сравнению с клетками линии HEK 293) выбранных клеточных линий к инфекции pBBC с репортерными генами люциферазы либо dsRed, сопоставима между собой. Таким образом, относительно низкие люминесцентные сигналы при инфекции этих клеточных линий связаны именно с низкой эффективностью репликации капсида ВВС в этих культурах, а не с неспецифическими эффектами, приводящими к низкой экспрессии / детекции люциферазы в этих клеточных линиях.

2.2.4 Трансдуцирующая активность псевдовирuсов, экспрессирующих различные типы нейраминидазы

Как отмечалось в обзоре литературы, инфекционные свойства вируса гриппа обуславливаются не только НА, отвечающим за связывание с рецепторами на клетке – мишени, но также нейраминидазой, а точнее, балансом функциональных активностей обоих поверхностных белков. Для изучения влияния нейраминидазы на инфекционность псевдовирuсного препарата, были получены псевдовирuсы, сочетающие гемагглютинин H5(Egypt) с тремя различными типами нейраминидаз, а также псевдовирuсы, экспрессирующие на своей поверхности только гемагглютинин (без нейраминидазы).

Показано, что полученные псевдовиральные препараты, отличающиеся только типом НА, имеют различную трансдуцирующую способность. Инфекционности препаратов VSV-ΔG-H5N1(California), VSV-ΔG-H5N1(Kan), VSV-ΔG-H5N1(Hamburg) равны 3.25 ± 0.11 , 1.99 ± 0.03 и 0.29 ± 0.01 млн ОЛЕ (относительные люминесцентные единицы), соответственно. Псевдовirusы, содержащие на своей поверхности только НА, имеют титр, сравнимый с отрицательным контролем, и он на 3 порядка ниже, чем у псевдовirusов, имеющих на своей поверхности оба поверхностных белка (Рисунок 13). В качестве отрицательного контроля использовали псевдовirusы, не имеющие поверхностных белков.

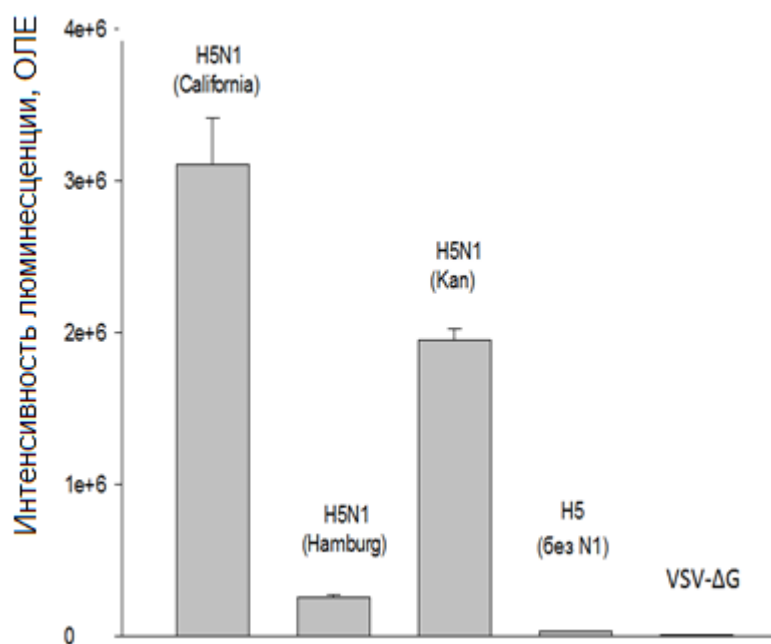


Рисунок 13. Влияние нейраминидазы на трансдуцирующий титр псевдовирального препарата. Эффективность трансдукции оценивали по активности люциферазы в клетках-мишенях HEK293, зараженных псевдовirusами VSV-ΔG-H5N1(California), VSV-ΔG-H5N1(Hamburg), VSV-ΔG-H5N1(Kan), экспрессирующими гемагглютинин H5(Egypt) и нейраминидазу N1 различных штаммов вируса гриппа H5N1, а также псевдовirusа VSV-ΔG-H5, экспрессируемы. Отрицательный контроль – псевдовirus без гемагглютинина и нейраминидазы.

Интересно, что цитопатический эффект (ЦПЭ), наблюдаемый при продукции псевдовirusов в клеточном монослое, коррелирует с инфекционностью полученного препарата: чем выше инфекционность, тем более выражены изменения в клетках - продуцентах (наличие округлившихся клеток, появление в них гранулярности, отрыв от дна чашки). Самый выраженный ЦПЭ наблюдался при продукции псевдовirusа H5N1 (California), который обладал и наивысшим значением инфекционности, менее выраженным, но сравнимым по силе, является H5N1(Kan). При продукции H5N1(Hamburg) ЦПЭ проявлялся слабо, а в монослое клеток – продуцентов, эспрессирующих НА без NA, и в клетках, не экспрессирующих поверхностные белки, его проявления не обнаружены (Рисунок 14).

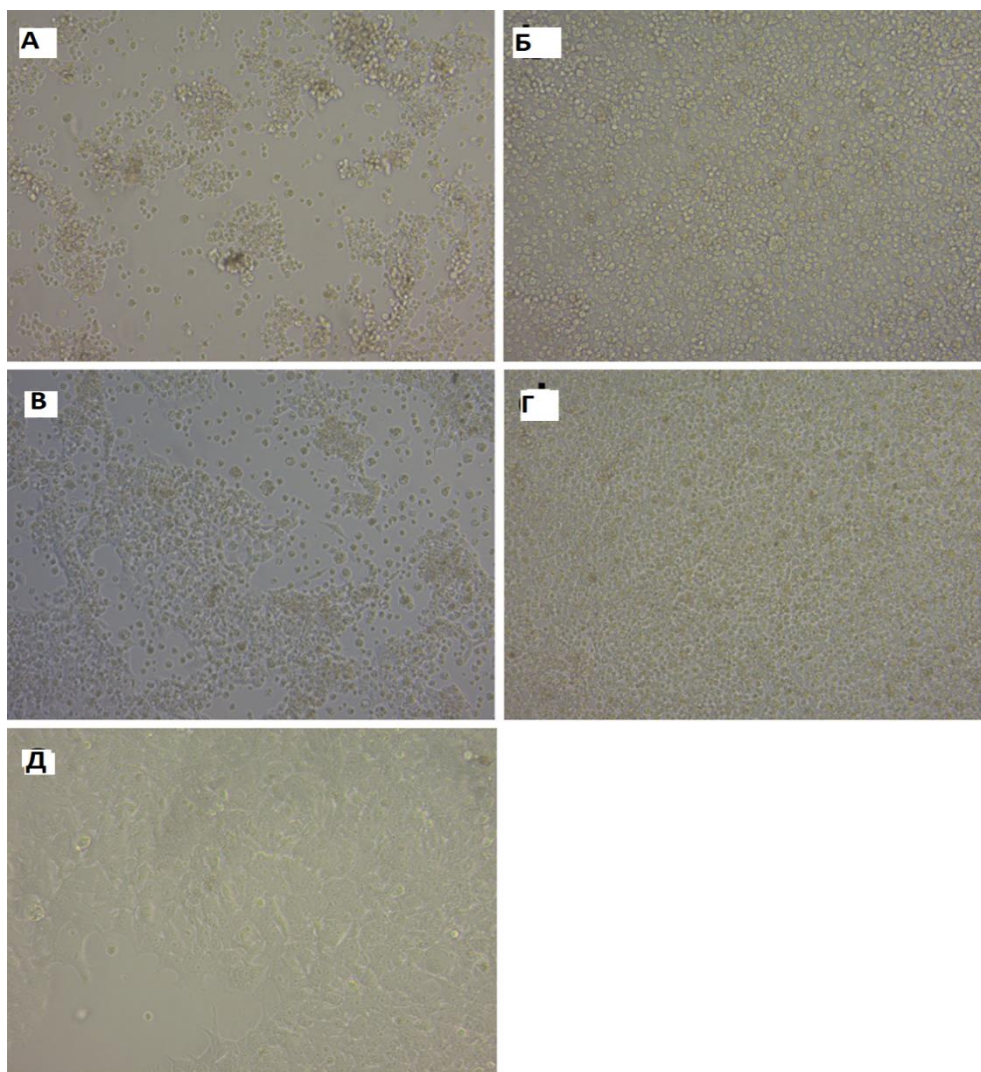


Рисунок 14. Цитопатический эффект в монослое клеток-продуцентов псевдовирuсов. Различная степень ЦПЭ в клеточных монослоях, экспрессирующих гемагглютинин H5 и одну из трех нейраминидаз: N1(California) (А), N1(Hamburg) (В) или N1(Kan) (С). ЦПЭ не наблюдается в клетках, экспрессирующих только гемагглютинин (Д) или вовсе не экспрессирующий поверхностны белки (Е).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что для получения псевдовирuсных препаратов с высокой инфекционной способностью необходима активность вирусной нейраминидазы, что соответствует описанной ранее важной роли нейраминидазы в отпочковывании инфекционных вирионов гриппа от зараженных клеток при продуктивной инфекции. Продемонстрированная возможность оценивать трансдукционную активность «двойных» НА-НА псевдотипов, комбинируя различные варианты экспрессируемых гемагглютинина и нейраминидазы может использоваться для изучения инфекционных свойств различных реассортантов вируса гриппа.

2.2.5 Гемагглютинин-опосредованный характер проникновения вируса в клетку

2.2.5.1 Ингибирование псевдовиральной инфекции лизосомотропными агентами

Известно, что многим вирусам для проникновения в клетку посредством эндоцитоза, необходима слабокислая среда содержимого эндосом, в связи с чем такие вирусы называют pH-зависимыми. Ингибиторы закисления эндосом/лизосом обладают противовирусной активностью в отношении многих вирусов, использующих pH-зависимый механизм проникновения в клетку, например, вирусов гепатита С, гриппа, везикулярного стоматита [92]. Хлорохин и хлорид аммония способны проникать в кислые компартменты клетки и накапливаться там в протонированной форме, что приводит к повышению pH внутри компартмента. Проводилась инфекция клеток – мишеней псевдовиром VSV-ΔG-H5N1 в присутствии различных концентраций ингибиторов закисления в диапазоне от 2 и до 100 мМ для хлорида аммония и от 10 до 100 мкМ для хлорохина. Были построены кривые, характеризующие зависимость между эффективностью псевдовиральной инфекции и концентрацией ингибитора (Рисунок 15). Оба вещества эффективно ингибируют псевдовиром VSV-ΔG-H5N1 с количественными характеристиками 50 % ингибирования (IC₅₀) равными 12 мМ и 27 мкМ для хлорида аммония (Рисунок 15, А) и хлорохина (Рисунок 15, Б), соответственно. Эти концентрации ингибиторов сопоставимы с данными, полученными для инфекционного вируса гриппа и псевдолентивирусов, псевдотипированных H5N1, что подтверждает возможность использования таких псевдовирусов вместо инфекционных вирусов гриппа при поиске ингибиторов гемагглютинина [147, 148].

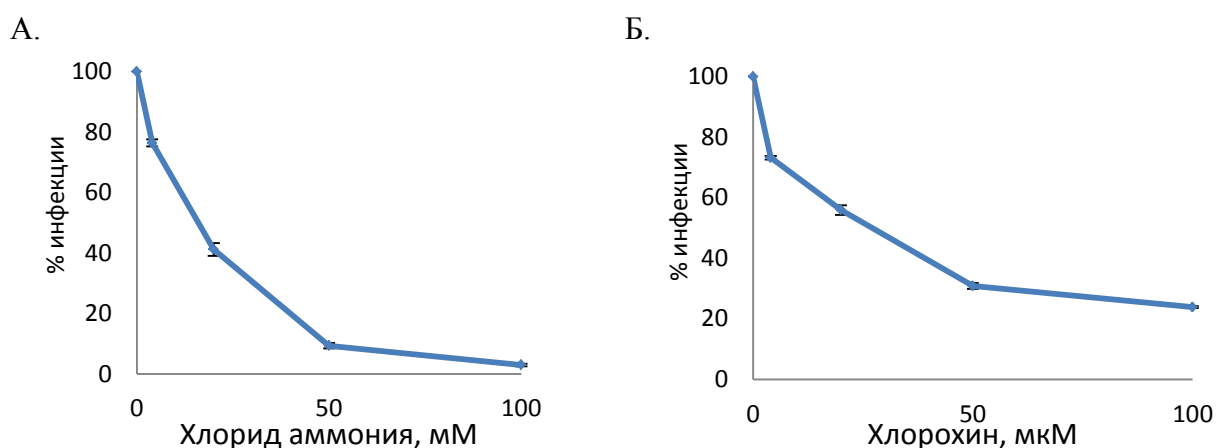


Рисунок 15. Подавление псевдовиральной инфекции VSV-ΔG-H5N1(California) в клетках линии HEK293 лизосомотропными препаратами. А. Подавление инфекции хлоридом аммония; Б. Подавление инфекции хлорохином.

2.2.5.2 Нейтрализация псевдовиральной инфекции моноклональными и поликлональными антителами к гемагглюнину

Для подтверждения того, что инфекции псевдовиром VSV-ΔG-H5N1, обусловлена именно гемагглютинином H5, проводилась нейтрализация псевдовируса VSV-ΔG-H5N1(California) специфическими моноклональными антителами и поликлональной сывороткой к H5 в сериях 10-кратных разведений. Инфекционность псевдовирального препарата, псевдотипированного гликопротеинами вируса гриппа H5N1, подавлялась дозозависимым образом в присутствии обоих антител. В то же время, инфекционность контрольного псевдовируса, несущего поверхностный белок G BBC (VSV-ΔG-G), остается неизменной даже при нейтрализации максимальной концентрацией антител ($98,7 \pm 0,1\%$ и $99,5 \pm 0,2\%$ от положительного контроля для моноклональных антител и поликлональной сыворотки, соответственно), что подтверждает специфичность нейтрализации псевдовируса VSV-ΔG-H5N1 антителами к H5N1 (Рисунок 16).

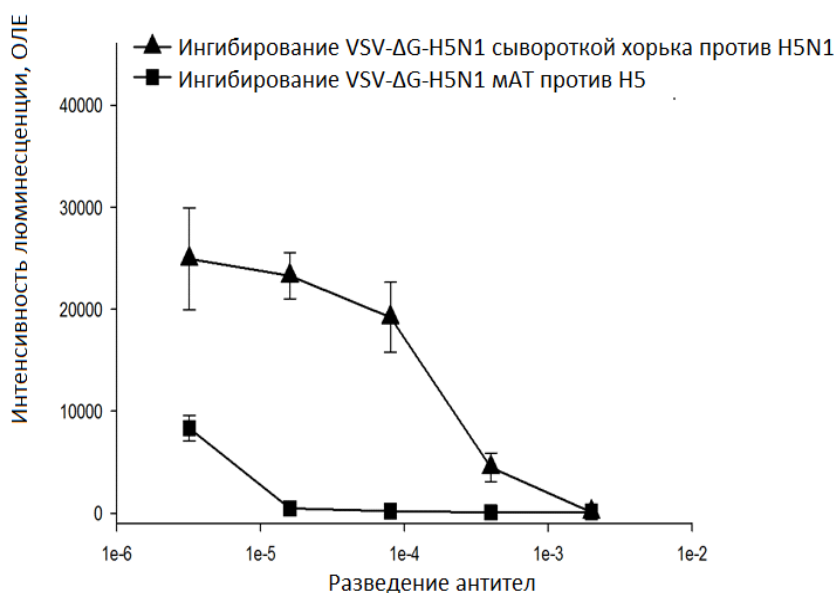


Рисунок 16. Нейтрализация VSV-ΔG-H5N1(California) моноклональными антителами к гемагглюнину H5 вируса гриппа и сывороткой хорька против вируса гриппа субтипа H5N1.

Таким образом, можно утверждать, что инфекция клеток-мишеней полученным псевдовиром определяется именно активностью гемагглюнина H5, встроенного в его мембрану, а сам такой псевдовир VSV-ΔG-H5N1 может быть использован для изучения ранних стадий инфекции вируса гриппа, опосредованных его гемагглютинином.

2.2.6 Влияние карбоксилата озельтамивира на продукцию псевдовируса и псевдовирусную инфекцию

Карбоксилат озельтамивира (ОК) – это активная форма лекарственного препарата, используемого для лечения инфекции вируса гриппа, озельтамивира фосфата, который относится к классу ингибиторов нейраминидазы. Как упоминалось в обзоре литературы, функции NA необходимы не только на завершающих стадиях жизненного цикла вируса гриппа, т. е. при отпочковывания вириона гриппа от поверхности клетки - хозяина, но она также может принимать участие в начальных этапах вирусной инфекции – входе вируса в клетку-мишень. Используя ОК, можно осуществлять ингибирование NA на этапе отпочковывания вириона при продукции псевдовирусов, а добавляя ингибитор к клеткам – мишеням до или во время инфекции псевдовирусом, возможно выявление действия NA на этапе входа псевдовируса в клетку. Инфекционность псевдовирусного препарата, полученного в присутствии ОК (500нМ) составляет $4.4 \pm 1.1\%$ от контроля. (Рисунок 17, А), то есть ОК эффективно подавляет нейраминидазу на этапе отпочковывания вирионов от клетки. Для того, чтобы оценить влияние ОК на псевдовирусную инфекцию, клетки – мишени инкубировали с различными концентрациями ОК (10 нМ, 100 нМ, 500 нМ, и 1000 нМ) перед добавлением псевдовируса. Инфекционность псевдовирусного препарата в присутствии ингибитора несущественно отличается от контроля, указывая, что активность вирусной нейраминидазы не оказывает влияния на эффективность инфекции клеток-мишеней сконструированным псевдовирусом (Рисунок 17, Б).

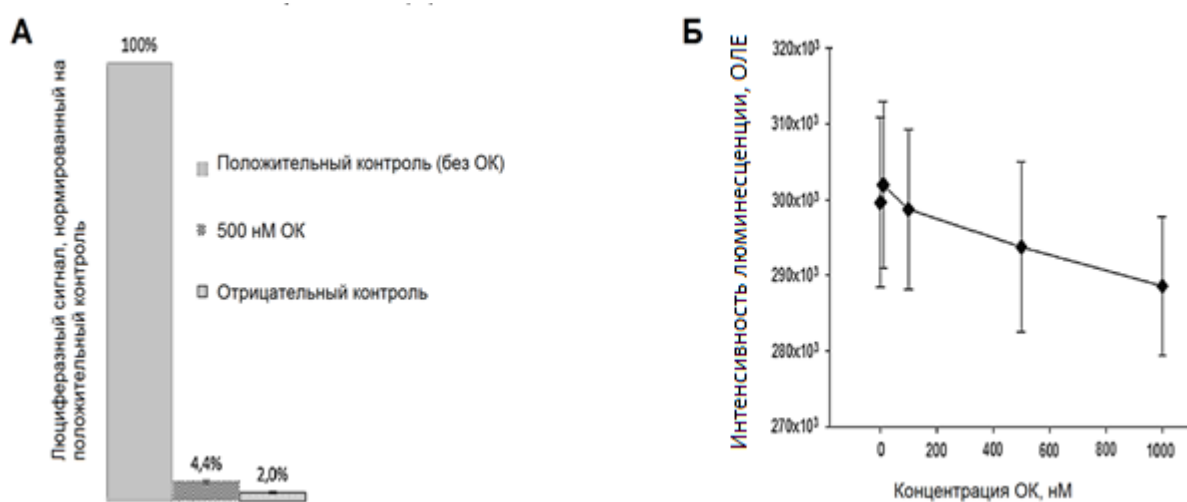


Рисунок. 17. Влияние озельтамивира карбоксилата (ОК) на продукцию псевдовируса VSV-ΔG-H5N1 в клетках-продуцентах и на начальные стадии псевдовирусной инфекции в клетках-мишенях. А. Трансдуцирующая активность VSV-ΔG-H5N1, полученного при добавлении ОК к клеткам-продуцентам; Б. Трансдуцирующая активность VSV-ΔG-H5N1 в присутствии ОК. В качестве клеток-продуцентов использовали линию клеток 293FT, в качестве клеток-мишеней - линию клеток HEK 293.

Таким образом, продемонстрирована возможность применения созданной псевдовиральной системы для анализа противовирусной активности препаратов класса ингибиторов нейраминидазы, используемых на стадии продукции псевдотипов, т.е., добавляемых в ростовую среду клеток-продуцентов псевдовирусов.

2.2.7 Стабильность псевдовиральных препаратов VSV-ΔG-H5N1

Для определения устойчивости псевдовиральных препаратов к замораживанию – оттаиванию, а также к хранению в незамороженном состоянии, порцию псевдовирального препарата хранили в течение трех недель при 4°C, другую порцию подвергали троекратному замораживанию (до -70° C) и оттаиванию (при комнатной температуре). Затем определяли трансдуцирующую активность каждой порции препарата. И в том, и в другом случае наблюдается лишь небольшое снижение трансдуцирующей способности (примерно на 5-10%) по сравнению со свежеприготовленным препаратом. Следовательно, полученные псевдовirusы обладают большей стабильностью по сравнению с псевдолентивирусами, которые при хранении в течение трех недель при 4°C теряют до 50% своей инфекционности [149].

2.2.8 Изучение фузогенных свойств различных гемагглютининов

Изучение фузогенности вирусных белков слияния осуществляется с использованием инфекционных вирусов (природных изолятов или рекомбинантных вирусов, полученных методами обратной генетики), псевдовирусов, экспрессирующих эти белки на своей поверхности, липосом со встроенными в их мембрану вирусными белками, либо методом слияния эффекторных клеток, экспрессирующих белки слияния, с клетками – мишенями (при необходимости экспрессирующими рецепторы для этих белков) [150].

Способы обнаружения клеточного слияния включают образование гетерокарионов (синцитиев), измерение активации репортерных генов, регистрацию образования пор электрофизиологическими методами или детекцию переноса липидных и цитоплазматических красителей [151].

Изучены фузогенные свойства трех вариантов гемагглютининов H1 вирусов гриппа, отличающихся организацией рецептор – связывающего сайта: A/South Carolina/1/1918 (выделен от людей, умерших во время пандемии «Испанки», связывает SA- α 2,6), A/New York/1/1918 (с заменой в позиции 190 (D190E), связывает только SA - α 2,3) и A/New York/1/1918 (D225G) (отличается одной аминокислотной заменой от HA штамма A/New York/1/18, обладает одинаковой тропностью как к SA- α 2,6, так и SA- α 2,3 [146, 152, 153], а также гемагглютинина H5 высокопатогенного вируса птичьего гриппа A/Thailand/KAN-1/2004(H5N1) методами образования синцитиев в клеточном монослое, экспрессирующем эти белки, и трансдукции клеток-мишеней псевдовирусами, несущим гемагглютенины на своей мембране.

2.2.8.1 Изучение трансдуцирующей активности псевдовирусов, экспрессирующих различные гемагглютинины

Плазмидные векторы, экспрессирующие гены различных гемагглютининов вируса гриппа, были сконструированы в целях получения псевдовирусов для поиска потенциальных ингибиторов входа вирусов гриппа и изучения их клеточного тропизма. В целях обеспечения равной экспрессии генов изучаемых белков, они клонировались в один и тот же экспрессионный вектор с использованием одинаковой стратегии клонирования.

Псевдовирусные препараты на основе рекомбинантного капсида ВВС с репортерным геном люциферазы, отличающиеся типом экспрессируемого гемагглютиниона, но имеющие одинаковую нейраминидазу на своей поверхности, получали методом ко-трансфекции плазмид, кодирующих эти поверхностные белки. Для активации фузогенности гемагглютининов типа Н1 клетки-продуценты дополнительно ко-трансфицировались плазмидой, которая кодирует сериновую протеазу TMPRSS2, обеспечивающую корректный протеолитический процессинг полипротеина гемагглютиниона, что активирует его фузогенные свойства. Определение активности люциферазы в клетках-мишенях показывает, что наибольшей трансдуцирующей активностью обладает псевдовирус, несущий гемагглютинин Н5 высокопатогенного вируса птичьего гриппа. Псевдовирусы, экспрессирующие различные варианты Н1 гемагглютиниона, обладают трансдуцирующей активностью на 2 порядка ниже, чем вышеописанный псевдовирус (Рисунок 18).

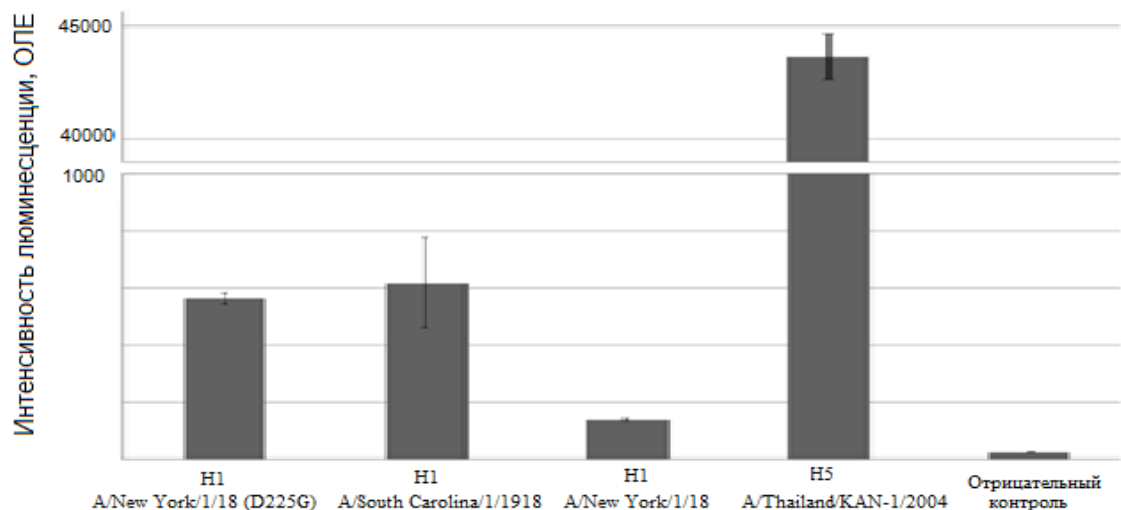


Рисунок 18. Трансдуцирующая способность псевдовирусов, экспрессирующих различные типы гемагглютининов. Столбцы 1-3 – гемагглютинины Н1 (1 - A/New York/1/18 (D225G), 2 - A/South Carolina/1/1918, 3 - A/New York/1/18), 4 -H5 штамма A/Thailand/KAN-1/2004(H5N1), 5 -отрицательный контроль – гемагглютинин на поверхности псевдовируса отсутствует.

В связи с тем, что их собственная трансдуцирующая активность лишь в несколько раз превышает фоновые значения (хотя и несколько отличается между собой), была предпринята попытка установить, обладают ли описываемые H1 гемагглютинины детектируемой фузогенной активностью в тесте образования синцитиев в клеточном монослое.

2.2.8.2 Синцитий-образующая способность различных типов гемагглютинина

Слияние вирусной и клеточной мембран происходит внутри эндосомы, где кислая среда индуцирует конформационные изменения гемагглютинина, ведущие к приобретению им фузогенных свойств. Слияние клеточных мембран в клеточном монослое, экспрессирующем гемагглютинин вируса гриппа, которое используется в тесте образования синцитиев, возможно только при снижении pH среды до 5,0, что достигается кратковременным добавлением кислого буфера. При нейтральных значениях pH образования синцитиев не происходит. В случае, если гемагглютинин на поверхности клеток обладает фузогенной активностью, формирование синцитиев возможно детектировать по перераспределению зеленого флюоресцентного сигнала eGFP между трансфицированными и нетрансфицированными клетками внутри синцития. Размер синцитиев, определяемый методом флюоресцентной микроскопии (Рисунок 19) с последующей статистической обработкой изображений пакетом программ ImageJ, таким образом, может являться мерой фузогенности изучаемых поверхностных белков.

Притом, что наибольшей способностью образовывать синцитии обладают клетки, экспрессирующие гемагглютинин H5 высокопатогенного вируса птичьего гриппа (Рисунок 19, Г), два из трех изучаемых гемагглютининов H1 (A/SouthCarolina/1/1918 и A/NewYork/1/18(D225G)) обладают существенно меньшей, но детектируемой (ненулевой) синцитий-образующей активностью (Рисунок 19, Б, В), тогда как фузогенность третьего (A/New York/1/1918) (Рисунок 19, А) лишь слегка отличается от отрицательного контроля - клеток, не экспрессирующих белков слияния (Рисунок 19, Д).

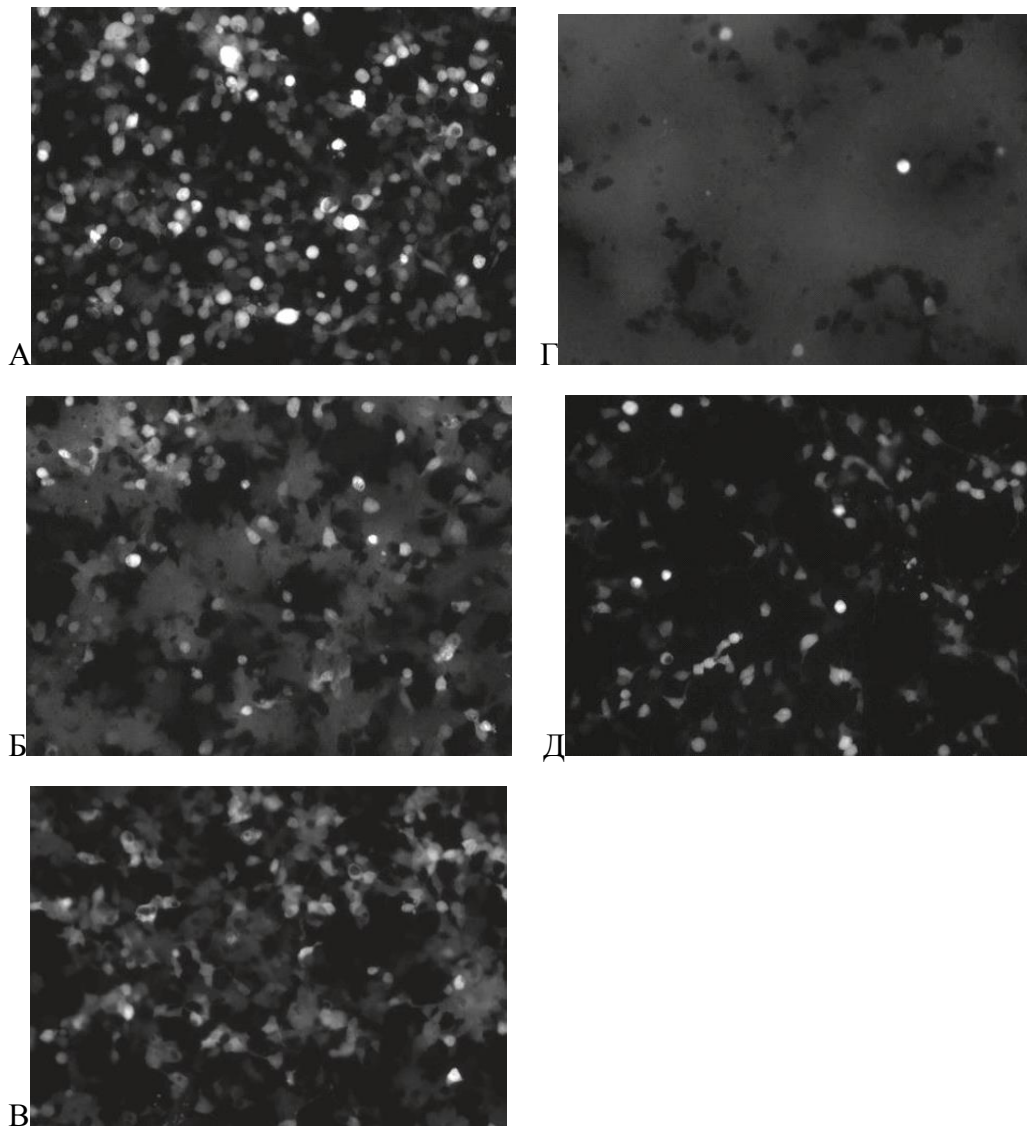


Рисунок 19. Формирование синцитиев клетками, экспрессирующими различные гемагглютинины. А-В. экспрессия гемагглютининов Н1: А. Н1 штамма A/NewYork/1/1918; Б. Н1 штамма A/SouthCarolina/1/1918; В. Н1 штамма A/NewYork/1/1918(D225G); Г. экспрессия гемагглютиниона Н5 A/Thailand/KAN-1/2004(H5N1); Д. отрицательный контроль.

Площади образующихся флюоресцентных объектов (синцитев) и их интенсивность флюоресценции представлены на рисунке 20.

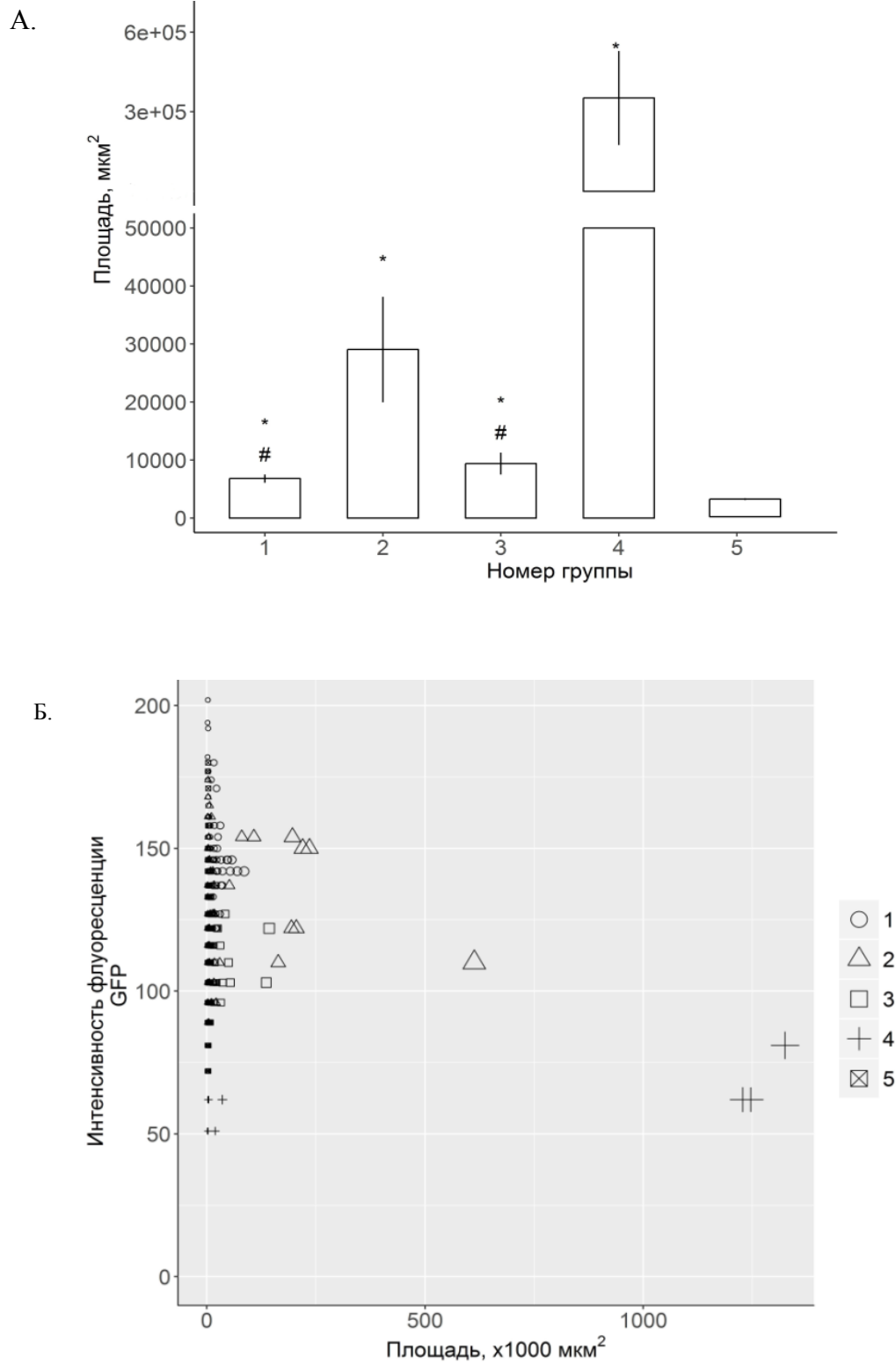


Рисунок 20. Площади образовавшихся синцитиев в эксперименте клетко-клеточного слияния. А. Средняя площадь флуоресцентных объектов (синцитиев) в культурах, экспрессирующих различные гемагглютинины: 1- H1 A/NewYork/1/1918, 2- H1A/SouthCarolina/1/1918, 3 - H1 A/NewYork/1/1918(D225G), 4- H5 A/Thailand/KAN-1/2004(H5N1), 5- отрицательный контроль; Б. Изменение площади и интенсивность флуоресценции единичных флуоресцентных объектов в тех же культурах (различные культуры обозначены различными значками: кружок - A/New York/1/18, треугольник - A/South Carolina/1/1918, квадрат - A/New York/1/18 (D225G), крестик - H5 A/Thailand/KAN-1/2004(H5N1), перекрестный квадрат – отрицательный контроль.

В ходе данной работы было показано, что способность гемагглютининов вируса гриппа образовывать синцитии не всегда коррелирует с трансдукционной активностью псевдовирuсов, несущих эти гемагглютинины на своей поверхности. Гемагглютинин высокопатогенного вируса гриппа H5 показал высокую фузогенную активность в обоих методах. Гемагглютинины H1 A/South Carolina/1/1918 и A/NewYork/1/1918 индуцируют образование синцитиев (хотя и в меньшей степени, чем H5), при этом псевдовирuсы, экспрессирующие их на своей поверхности, имеют низкую трансдукционную активность. Наконец, гемагглютинин A/NewYork/1/1918 (D225) показал низкую активность в обоих тестах. Ряд исследований указывает на различную чувствительность методов определения фузогенности, использующих псевдотипированные вирuсы либо слияние между собой клеток, экспрессирующих поверхностные белки слияния (в т. ч. метод образования синцитиев), причем как в разных работах преимущество отдается как одному, так и другому методу [109, 154]. В нашем случае метод образования синцитиев оказывается более чувствительным и информативным, по крайней мере, в отношении гемагглютининов H1.

Теоретическими доводами в пользу большей чувствительности метода слияния между собой клеток, экспрессирующих вирусные поверхностные белки являются 1) большая площадь контакта мембран в условиях клеточного монослоя, что приводит к участию в слиянии мембран большего количества молекул гемагглютининов; 2) в варианте образования синцития в монослоях, реакцию слияния мембран запускают гемагглютинины, присутствующие на обеих сливающихся мембранах двух клеток, тогда как псевдовирuсная трансдукция осуществляется только гемагглютинами на мембране псевдовирuса (таким образом, поверхностная плотность задействованных в слиянии мембран гемагглютининов повышается вдвое); 3) эффективная трансдукция рВВC псевдовирuсом, несущим гемагглютинины на своей поверхности требует существенно большего размера мембранной поры (чтобы пропустить через себя капсид рВВC), чем обмен цитоплазматическим eGFP между сливающимися клетками монослоя, экспрессирующего те же гемагглютинины.

Аргументом в пользу большей чувствительности псевдовирuсной трансдукции является более высокая плотность экспрессии гемагглютининов на вирусной мембране по сравнению с клеточной [155].

С другой стороны, метод псевдовирuсной трансдукции основывается на проникновении капсида в цитоплазму через образующуюся пору слияния. Таким образом, сравнительный размер псевдовирuса и диаметр поры определяют эффективность трансдукции. Разница в размерах капсидов вирuсов гриппа и ВВC (80–120 нм у вирuса гриппа, 70 x 200 нм у ВВC) может объяснять, почему некоторые гемагглютинины, определяющие инфекционность вирuсов гриппа обладают крайне низкой трансдуцирующей активностью в отношении капсидов ВВC.

Различные стерические отношения между мембранами сливающихся клеток (плоских по отношению друг к другу) и вирусной и эндосомальной мембранами (выгнутыми в одну сторону, но обладающими разными радиусами кривизны) также могут оказывать влияние на эффективность слияния мембран в клеточной и псевдовиральной моделях, но оценить вклад этого эффекта в чувствительность сравниваемых методов сложно.

Было показано, что гемагглютинин вируса гриппа может обладать различной фузогенной активностью в тестах образования синцитиев и псевдовиральной трансдукции. В нашей работе это особенно свойственно гемагглютинином H1 типа (два из которых сохраняли достаточно высокую фузогенность в тесте синцитий-образования, при том что все три демонстрировали крайне низкую трансдуцирующую активность несущих их псевдовирусов).

Таким образом, низкая трансдуцирующая активность полученных (H1)-псевдовирусов определяется не низкой способностью слияния мембран соответствующими гемагглютинином, но иными факторами, выяснение индивидуальной роли которых, вероятно, позволит получать H1-псевдовирусы с более высокой трансдуцирующей активностью.

2.2.9 Модель многоциклового инфицирования псевдовиральной инфекцией

Традиционно, говоря о псевдовирусах, включая исследуемые VSV-ΔG-G*, как правило, подразумевается, что в клетках-мишенях они ограничены лишь одним циклом инфекции, что делает их «биологически безопасными вирусами». При описании ингибиторов в экспериментах с однократным репликационным циклом отсутствует аккумуляция ингибирующего эффекта, наблюдаемая при ингибировании инфекционных вирусов, проходящих множественные циклы реинфекций. Это нередко может приводить к существенному завышению действующих концентраций ингибиторов на 1–2 порядка. То есть, формат многоциклового инфицирования дает возможность точнее осуществлять определение количественных характеристик ингибиторов.

При заражении псевдовиром VSV-ΔG-G* клеток, экспрессирующих поверхностный гликопротеин(ы) G*, будет наблюдаться образование новых псевдовирусов, способных заражать следующие (окружающие) клетки, с последующим экспоненциальным ростом количества зараженных клеток. Таким образом, многоцикловую псевдовиральную инфекцию можно рассматривать как относительно физиологическую модель продолжающейся во времени вирусной инфекции при полном сохранении биологической безопасности работ, поскольку инфекция способна к распространению только в границах экспрессирующей вирусный поверхностный белок клеточного монослоя.

В ходе данной работы была создана модель многоциклового инфицирования псевдовиром с поверхностным гликопротеином вируса Марбург и псевдовиром с гликопротеином BBC. Для этого клетки линии Vero трансфицировали плазмидой, кодирующей ген поверхностного гликопротеина GP вируса Марбург, гликопротеина G BBC, или плазмидой bGal, не

кодирующей вирусные поверхностные белки, затем заражали VSV-ΔG-MarV с репортерным геном красного флюоресцентного белка dsRed (Рисунок 21, А) или VSV-ΔG-G (Рисунок 21, Б). Клетки Vero, не экспрессирующие поверхностные белки, тоже заражали VSV-ΔG-G (Рисунок 21, В).

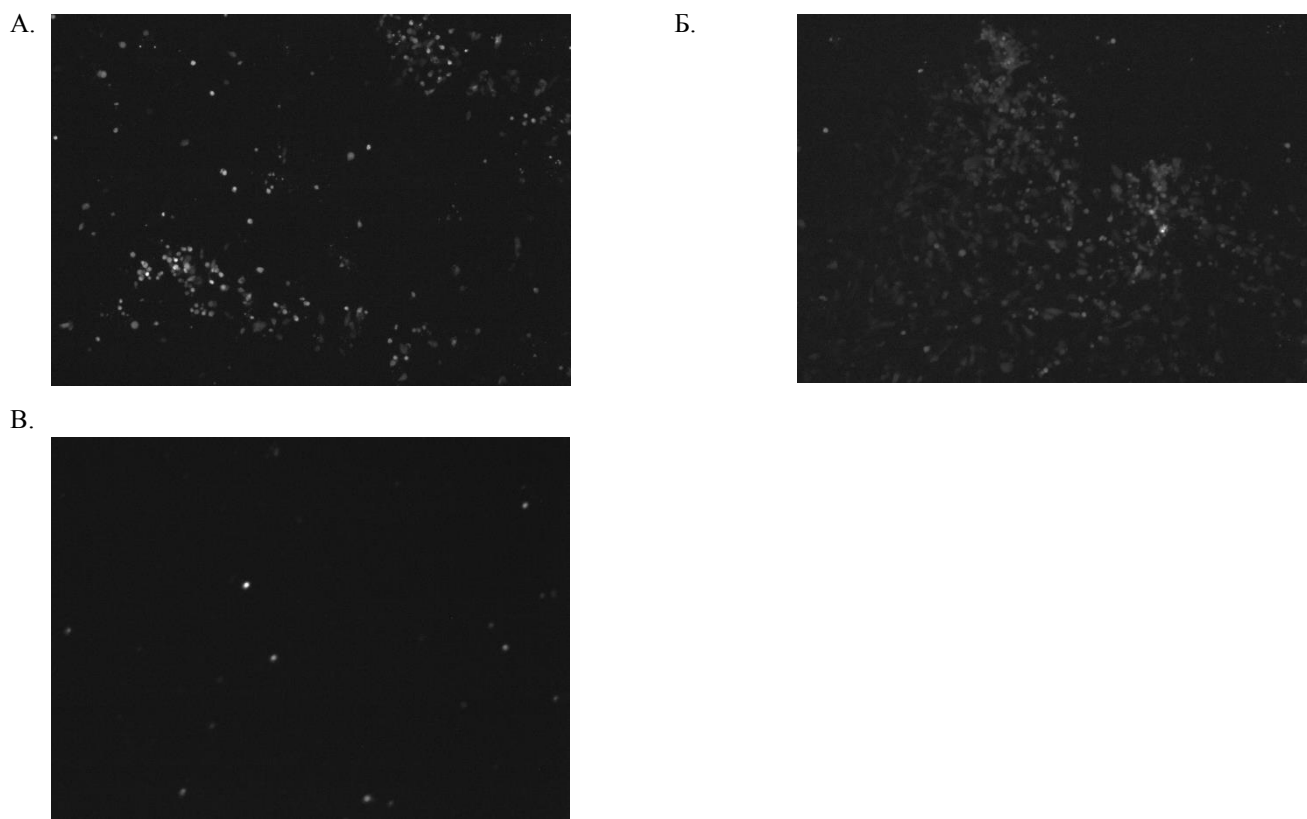


Рисунок 21. Реализация многоциклового инфекции псевдовирuses VSV-ΔG-MarV и VSV-ΔG-G в клетках линии Vero. А. Многоцикловая инфекция псевдовируса VSV-ΔG-MarV в монослое клеток, экспрессирующих поверхностный гликопротеин вируса Марбург. Б. Многоцикловая инфекция псевдовируса VSV-ΔG-G в монослое клеток, экспрессирующих поверхностный гликопротеин вируса G BBC. В. Одноцикловая инфекция VSV-ΔG-G при заражении клеток, не экспрессирующих вирусные поверхностные белки.

На фотографиях, сделанных через 48 часов после инфекции видны участки скопления флюоресцентных клеток, что подтверждает распространение инфекции VSV-ΔG-MarV (Рисунок 21, А) и VSV-ΔG-G (Рисунок 21, Б) в клеточном монослое. На рисунке 21, В видны лишь единичные флюоресцентные клетки, что соответствует одному циклу инфекции VSV-ΔG-G.

2.2.10 Изучение противовирусной активности оригинальных соединений

С использованием псевдовиральной системы на основе капсида рBBC выполнен скрининг библиотеки оригинальных химических соединений для выявления ингибиторов поверхностного белка вируса Марбург и высокопатогенного вируса птичьего гриппа (ВПППГ) H5N1.

Библиотека включает себя полусинтетические производные моно- и дитерпенов (производные дегидроабиетиламина) и природных каркасных терпеноидов – производные камфоры, получаемых из доступного возобновляемого растительного сырья, а также соединения, содержащие в своем остоле природный адамантановый фрагмент и различные фармакофорные группировки (см. приложение). В литературе описана разнообразная биологическая активность выбранных классов соединений [156].

Поскольку вирусы гриппа (и соответствующие псевдовirusы) имеют на своей поверхности два поверхностных белка, участвующие на разных стадиях вирусной инфекции – гемагглютинин, обеспечивающий вход вируса в клетку-мишень и нейраминидаза, необходимая для отсоединения зрелого вириона от поверхности клетки-мишени, исследование активности ингибиторов данных молекулярных мишеней осуществлялся на двух разных стадиях инфекционного цикла - при продукции псевдовirusов и при заражении ими клеток - мишеней.

Сначала оценивалась токсичность полученных соединений для клеток-мишеней линии НЕК с использованием МТТ – теста и определялась их 50% цитотоксическая концентрация (CC50). Далее, исходя из значений CC50, для каждого соединения был выбран диапазон малотоксичных концентраций, в которых исследовалась противовирусная активность.

В ходе скрининга не было выявлено веществ, избирательно подавляющих гемагглютинин-зависимый вход псевдовirusа VSV-ΔG-H5N1. Интересно, что среди исследуемых веществ были те, у которых ранее была выявлена противовирусная активность в отношении инфекционного вируса гриппа H1N1, но, однако, эти вещества не показали высокую ингибирующую активность в отношении псевдовirusа H5N1. Объяснением этому может быть, например, то, что данные вещества имеют молекулярную мишень, отличную от гемагглютинина, или же, они действуют селективно на гемагглютинин H1 и не действуют на гемагглютинин H5. Селективных ингибиторов нейраминидазы N1 вируса гриппа также не было выявлено.

2.2.11 Изучение противовирусной активности азотсодержащих производных сложных эфиров борнеола

Борнеол - вторичный спирт группы бициклических терпенов.

В ходе данной работы исследованы: сам борнеол (1), а также 2 группы сложноэфирных N-гетероциклических производных борнеола, отличающихся длиной алифатической цепи между гетероциклом и сложноэфирной связью: 2 атома углерода (соединения 4-11), 3 атома углерода (12-16). В роли референсных соединений, в терапевтических концентрациях селективно подавляющих инфекцию филовирусов, выбраны блокаторы ионных каналов амиодарон и верапамил.

Были определены IC₅₀ синтезированных соединений для VSV-ΔG-MarV и VSV-ΔG-G. Для каждого соединения рассчитывался индекс селективности (SI) – отношение токсичности соединения и ингибирующей активности против вируса Марбург (CC₅₀ / IC_{MarV50}) и коэффициент специфичности ингибитора (SC), представляющий собой отношение полуингибирующих концентраций для двух псевдовирuses (IC_{MarV50} к IC_{VSV50}). Значения IC_{MarV50}, IC_{VSV50}, TC₅₀, SI и SC для исследуемых веществ приведены в таблице 2.

Из таблицы видно, что сам борнеол не активен ни в отношении псевдовируса с поверхностным белком вируса Марбург, ни псевдовируса с G-гликопротеином BBC, и не является токсичным, в то время как производные это монотерпена, содержащие N-группу обладают различной токсичностью и противовирусной активностью.

Можно выявить некоторые закономерности влияния строения гетероциклического фрагмента на свойства исследуемого вещества. Например, присоединение к борнеолу кислородсодержащего гетероцикла (8 и 9) незначительно меняет токсичность и противовирусные свойства борнеола. Соединения борнеола с пятичленным N- гетероциклом (4 и 12) при сохраняющейся низкой токсичности обладают определенной противовирусной активностью, но в отношении обоих псевдовирuses, то есть являются неспецифическими ингибиторами. Вещества 8, 9, 10 и 16 обладают высоким SI, т.е. относительно небольшой токсичностью и высокой активностью в отношении VSV-ΔG-MarV. 8 и 10 также эффективно подавляют и инфекцию контрольным псевдовирусом VSV-ΔG-G, с коэффициентом специфичности SC₅₀ равным 3 и 4, соответственно, т.е. являются неспецифическими. Остальные 4 соединения являются специфическими ингибиторами MarV - GP-зависимого входа (SC>10).

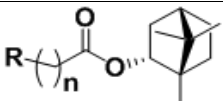
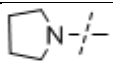
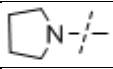
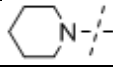
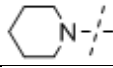
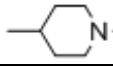
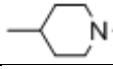
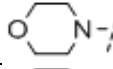
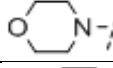
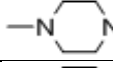
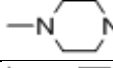
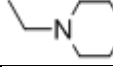
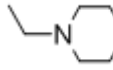
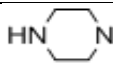
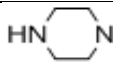
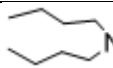
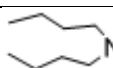
Кроме того, была выявлена общая зависимость индекса селективности полученных соединений от длины алифатической цепочки. Соединения с большей длиной цепочки оказались более активными в отношении VSV-ΔG-MarV и имеют больший индекс селективности. При этом не наблюдается непосредственной связи между длиной линкера и токсичностью соединения. Вдобавок к этому, в парах 6-членных гетероциклических соединений 5-13 и 6-14 изменение длины линкера повышает не только IS, но и более чем в 10 раз увеличивает специфичность ингибирования VSV-ΔG-MarV. Так, способность соединения 14 ингибировать вход вируса Марбург (IC_{MarV50} 4 мкмоль/мл), сравнима с активностью известных ингибиторов филовиральной инфекции – блокаторов ионных каналов амиодарона (IC₅₀ 2 мкмоль/мл) и верапамила (IC₅₀ 13 мкмоль/мл).

Как видно из таблицы, большая часть соединений является сравнительно малотоксичными (SI порядка или >10). Остальные соединения, обладающие более высокой токсичностью, вряд ли следует рассматривать в качестве клинически релевантных ингибиторов.

Среди низкотоксичных производных борнеола обнаруживается 6 веществ, являющихся относительно специфическими ингибиторами Marb-GP – опосредованной инфекции (SC>10).

Остальные вещества, вне зависимости от их токсичности, либо неспецифически подавляют обе псевдовиральные инфекции, VSV-ΔG-MarV и VSV-ΔG-G, либо вовсе не проявляют ингибирующих свойств (Таблица 2).

Таблица 2. Специфичность и селективность производных борнеола как ингибиторов VSV-ΔG-MarV-инфекции.

							
Вещество	R	n	CC50 (мкМ)	IC _{MarV} 50, (мкМ)	IC _{VSV} 50, (мкМ)	SI	SC
(-)-борнеол	-	-	>3000	203±3	>650	>14	>3
1		1	480±25	52±5	239±19	9	5
2		2	684±67	12±1	29±6	59	2
3		1	321±33	86±11	102±9	4	1
4		2	302±23	9±1	121±7	35	14
5		1	240±18	28±2	77±16	9	3
6		2	215±25	4±1	79±19	60	34
7		1	1279±14	263±24	267±10	5	1
8		2	406±33	78±7	257±12	5	3
9		1	637±18	47±3	187±24	14	4
10		2	421±4	19±1	318±23	20	16
11		1	859±21	29±2	447±15	29	15
12		2	474±29	10±2	106±5	47	11
13		1	361±7	20±1	69±13	18	3
14		2	207±9	10±4	102±25	21	10
15		1	73±5	11±1	20±1	6	2
16		2	86±4	6±1	48±5	15	8
Верапамил	-	-	280±13	13±1	>200	>21	>15

CC50 – 50%-цитотоксическая концентрация, IC_{MarV}50 – полуингибирующая концентрация для псевдовируса VSV-ΔG-MarV, IC_{VSV}50 – полуингибирующая концентрация для псевдовируса VSV-ΔG-VSV, SI – индекс селективности – отношение токсичности соединения и ингибирующей активности против вируса Марбург, SC – коэффициент специфичности ингибитора – отношение полуингибирующих концентраций для двух псевдовирусов.

Для оценки стадии вирусной инфекции, на которую действуют наиболее активные из изученных соединений, был выполнен эксперимент, аналогичный time-of-addition assay. VSV-ΔG-MarV были адсорбированы к клеткам спинокуляцией при 4°C. После отмывки не прикрепившихся частиц холодным ФСБ, путем повышения температуры до 37°C инициировали захват псевдовиральных частиц клетками. Два наиболее активных из выявленных веществ, а также референсные вещества добавляли к клеткам в различные моменты времени. В качестве контрольных веществ использовался гепарин - ингибитор адсорбции псевдовируса к клетке, имипрамин – ингибитор NPC-1, а также рибавирин – ингибитор РНК-зависимой РНК - полимеразы (Рисунок 22).

Гепарин ингибирует инфекцию VSV-ΔG-MarV только в случае его доавления не позже 5 минут от начала инфекции, что еще раз подтверждает факт, что гепарин действует как блокатор адгезии вирусных частиц к поверхности клетки. Эффективность рибавирина сохраняется даже после 5,5 часов после начала инфекции. Соединения 4 и 6 эффективны при добавлении к клеткам в течение часа от момента начала инфекции псевдовиром. Таким образом, полученные данные подтверждают, что исследуемые производные борнеола действуют на ранних стадиях инфекции, после адгезии частиц к клеткам, но до начала репликации капсида ВВС.

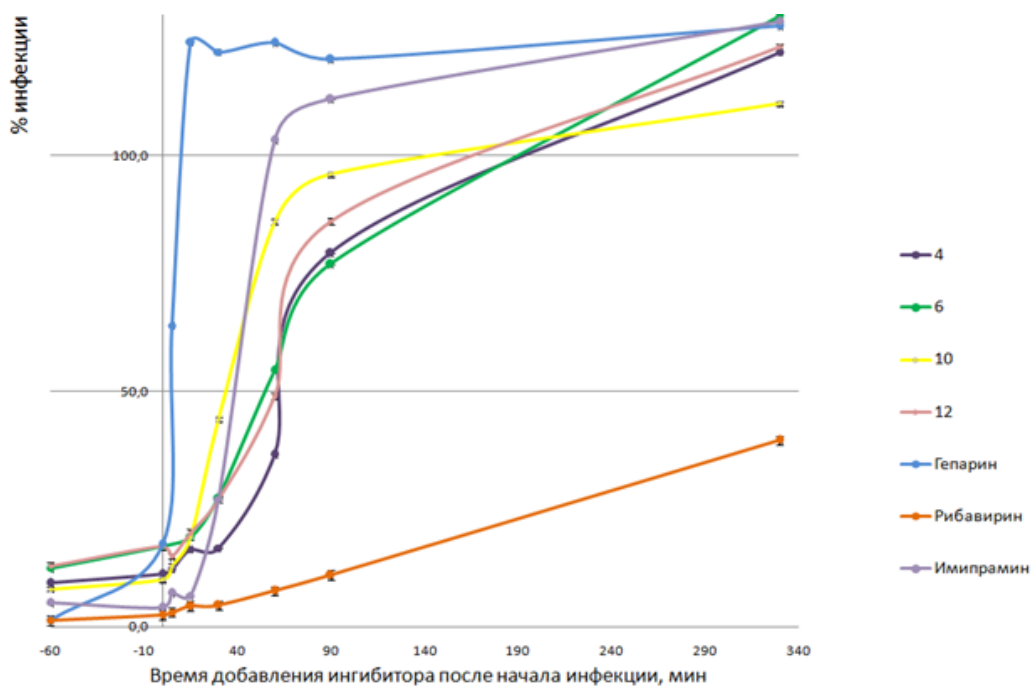


Рисунок 22. Влияние различных режимов добавления ингибиторов на эффективности псевдовиральной инфекции VSV-ΔG-MarV. Соединения 4, 6, 10, 12 использовались в концентрациях 15 мкМ, 25 мкМ, 15 мкМ и 30 мкМ, соответственно; гепарин, имипрамин, рибавирин в концентрациях 10 мкг/мл, 12,5 мкМ и 40,9 мкМ, соответственно.

Способность наиболее активных веществ подавлять псевдовирус VSV-ΔG-MarV была подтверждена также на клетках линии Vero. Цитопатический эффект, наблюдаемый при добавлении VSV-ΔG-MarV к клеткам, нивелируется при применении исследуемых веществ в концентрации 15мкМ (Рисунок 23).

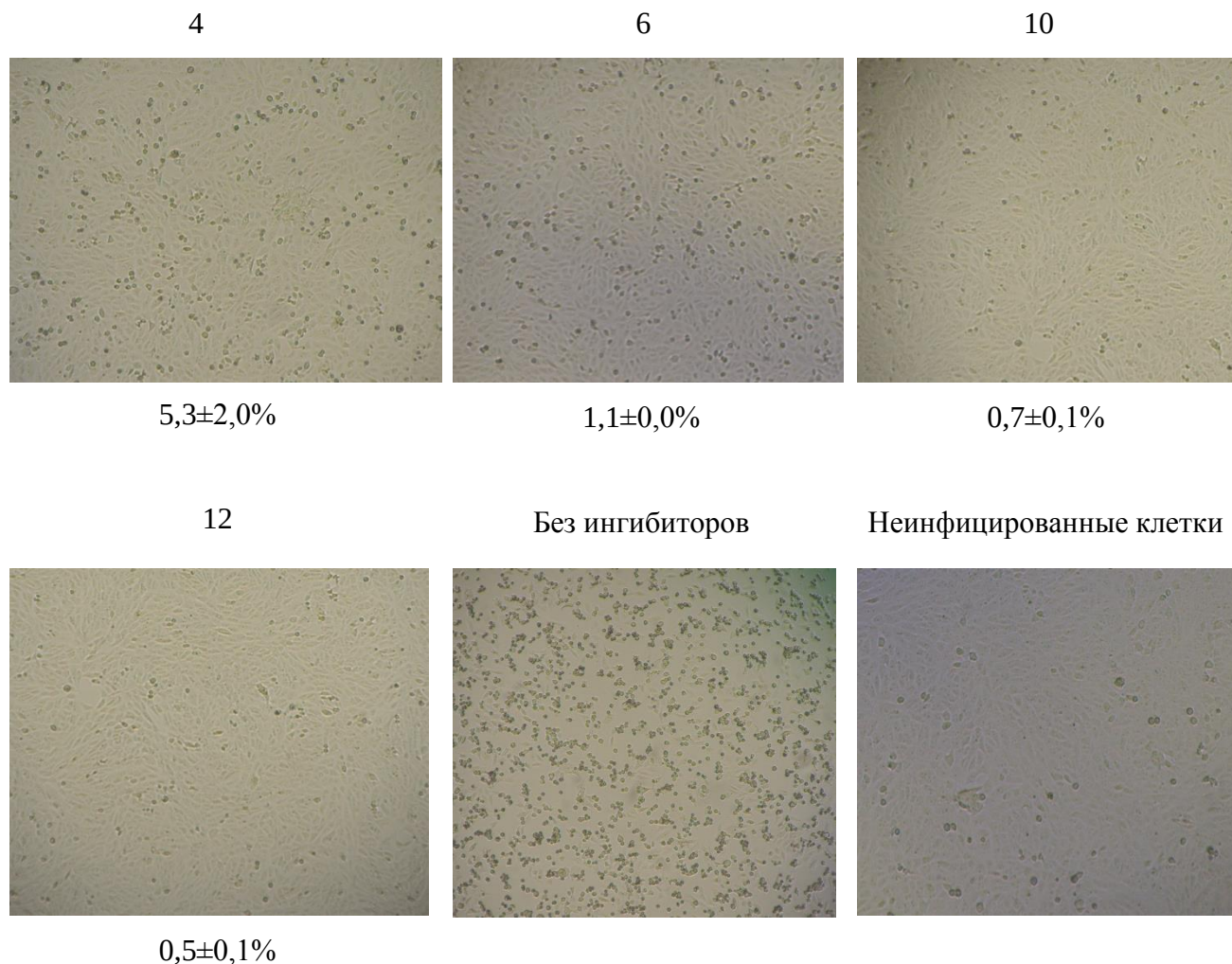


Рисунок 23. Подавление псевдовирусной инфекции терпеноидами 4, 6, 10, 12 в клетках линии Vero. Клетки инфицировали псевдовирусом VSV-ΔG-MarV в присутствии соединений 4, 6, 10, 12 в концентрации 15мкМ, либо без ингибиторов. В скобках указан % инфекции по отношению к положительному контролю (по результатам люминометрии).

Инфицированные псевдовирусом VSV-ΔG-MarV клетки округляются и открепляются от дна чашки. При добавлении соединений 4, 6, 10, 12 при инфицировании VSV-ΔG-MarV, внешний вид клеточного монослоя сравним с неинфицированными клетками.

3. Обсуждение результатов

Псевдовirusы, псевотпированные поверхностными белками высокопатогенных вирусов, могут служить релевантной заменой инфекционным вирусам при решении многих задач, в том числе, при изучении функций поверхностных белков и поиска их ингибиторов. Наиболее часто для псевдотипирования используют капсид лентивирусов и ВВС. Каждая система имеет свои преимущества и недостатки, поэтому при ее выборе существенное значение имеют цели и задачи исследования, а также доступность конкретной системы.

Изначально основным направлением использования псевдовirusов в данной работе являлось выявление ингибирующей активности новых субстанций (химических веществ) в отношении поверхностных гликопротеинов высокопатогенных вирусов – вируса гриппа H5N1 и вируса Марбург, - обуславливающих ранние этапы соответствующих вирусных инфекций – вход вируса в клетку.

Основными преимуществами псевдовirusов на основе капсида ВВС является их высокая трансдуцирующая активность (приблизительно в 100 раз выше, чем у псевдолентивирусов, способность включать в состав липидной вирусной оболочки широкий спектр поверхностных вирусных (глико)протеинов и существенное сокращение времени эксперимента [81]. Эта система была успешно использована для исследования функций поверхностных белков ряда высокопатогенных вирусов (хантанвирусов [157], вируса Нипа, Хендра [158], гепатита С [159], вируса простого герпеса [160] и других.

В ходе данной работы впервые были получены псевдовirusы на основе рекомбинантного ВВС, несущие одновременно оба поверхностных белка вируса гриппа А (гемагглютенина и нейраминидазы), показана возможность их использования для исследования роли функционального баланса между гемагглютинином и нейраминидазой в инфекционности вируса гриппа (в том числе, потенциальных новых реассортантов вируса гриппа), и продемонстрированы их преимущества перед псевдолентивирусами, несущими поверхностные белки вируса гриппа (простота получения, высокий трансдуцирующий титр и термическая стабильность).

Важным аспектом, определяющим патогенез вирусной инфекции, является тропизм вируса, который определяется, в том числе, функционированием вирусных поверхностных белков, а также наличием рецепторов на клетках–мишенях. Псевдовirusы, псевдотипированные поверхностными белками гетерологичных вирусов, могут использоваться в исследованиях, направленных на изучения вирусного тропизма.

Различные субтипы вируса гриппа могут обладать тропностью к нервной ткани. Однако патогенез вирусной инфекции, а также пути проникновения вируса в ЦНС до сих пор до конца не ясны. Ранее было показано, что остатки сиаловых кислот, служащих рецепторами для вируса

гриппа H5N1, экспрессируются на поверхности некоторых нейронов головного мозга человека, что может лежать в основе нейротропизма вируса птичьего гриппа [161].

Также была продемонстрирована способность вирусов птичьего гриппа H5N1 заражать клетки человека перевиваемых культур астроцитарного и нейронального происхождения, вызывая в них цитопатический эффект, экспрессию провоспалительных цитокинов и апоптоз [162]. Насколько известно, псевдовirusы, экспрессирующие поверхностные белки вируса гриппа, ранее не использовались для изучения тропизма вируса гриппа к клеткам ЦНС, и могут служить удобным и безопасным инструментом для изучения патогенеза инфекции вируса гриппа H5N1 в клетках головного мозга человека.

Случаи заражения людей высокопатогенными H5N1 вирусами гриппа показали, что эти вирусы вызывают сильную воспалительную реакцию, так называемый «цитокиновый шторм» и это вносит весомый вклад в тяжесть заболевания. В связи с этим был проведен ряд исследований по заражению различных клеток иммунной системы вирусами гриппа.

Эффективность инфекции макрофагов зависит от их типа, их микроокружения, а также от штамма вируса, что, как считается, ведет к различиям в запуске воспалительного ответа, и, в конечном итоге, определяет исход инфекции [163]. Так, например, вирусы, имеющие мало N-связанных гликанов, слабо взаимодействуют с маннозным рецептором макрофагов и заражают их с низкой эффективностью. Показано отсутствие репликации вируса в макрофагах высокопатогенного вируса гриппа H5N1 и H7N1 и сезонного вируса гриппа H1N1 (PR8). Репликация сезонного, пандемического 2009 и птичьего H5N1 вирусов гриппа и продукция провоспалительных цитокинов в альвеолярных макрофагах происходит гораздо слабее по сравнению с макрофагами, полученными из моноцитов периферической крови. С другой стороны, есть данные и о том, что ВПВПГ H5N1, способен заражать В-лимфоциты и эффективно реплицироваться в макрофагах, причем это свойство является уникальным именно для этого субтипа, способствует его высокой патогенности и определяется именно гемагглютинином H5 [164]. Человеческие мононуклеарные клетки периферической крови являются мишенью H5N1-инфекции, причем моноциты и В-лимфоциты являются наиболее восприимчивыми популяциями, в то время как Т-лимфоциты относительно резистентны к инфекции вирусами гриппа H5N1 и H3N2 [165], а макрофаги, полученные из моноцитов, более восприимчивы к инфекции, чем сами моноциты [166].

Полученные в ходе настоящей работы данные о возможности заражения клеток Т-лимфоидного происхождения H5N1-псевдовirusом указывают на возможность доставки вирусного капсида в эти клетки с помощью гемагглютинина H5. Таким образом, литературные данные о резистентности Т-клеток к инфекции вирусом H5N1, свидетельствуют о блоке этой инфекции на более поздних стадиях, чем H5-зависимый вход. Оригинальность полученных

результатов связана с тем, что большинство работ по исследованию клеточного тропизма вируса гриппа ведется с использованием инфекционных вирусных изолятов. Принципиальная возможность использования псевдовирюсов для изучения НА-опосредованного клеточного тропизма вируса гриппа была продемонстрирована с помощью псевдоленивирюсов [167], в то время как использование системы на основе ВВС, псевдотипированного гемагглютинином и нейраминидазой гриппа, для этих целей здесь было продемонстрировано впервые.

Как уже было сказано в обзоре литературы, еще одним преимуществом псевдовирюсов рекомбинантного ВВС является возможность построения многоциклового инфекции при сохранении биологической безопасности системы. В настоящее время описано создание многоциклового псевдовирюсной инфекции для изучения начальных этапов высокопатогенных вирусных инфекции вирусом Хендра, Нипа, Хунин и Лухо, которые опосредуются их поверхностными белками. Такая система также была описана для вируса «испанского» гриппа H1N1, где клеточный монослой экспрессировал только один поверхностный белок гриппа – гемагглютинин, а нейраминидаза добавлялась извне. С ее помощью исследована нейтрализующая активность специфических сывороток и описаны свойства химических соединений, являющихся ингибиторами поверхностных белков этих вирусом [158, 168]. В данной работе впервые смоделирована многоциклового инфекция VSV-ΔG для поверхностного гликопротеина вируса Марбург. В дальнейшем планируется моделирование инфекции для псевдовирюсов гриппа, экспрессирующих оба вирусных поверхностных белка – и гемагглютинин, и нейраминидазу, для более точного описания их действия во время нескольких циклов адгезии – отпочковывания. Моделирование многоциклового инфекции также позволит получать более точные концентрации ингибиторов поверхностных белков вируса (по сравнению с одноциклового моделью псевдовирюсной инфекции).

Несмотря на успехи фармакологии и вакцинопрофилактики, проблема поиска новых ингибиторов высокопатогенных вирусом, в том числе, вирусом гриппа и филловирюсов, остается актуальной. В ходе биологического скрининга, а также использования специальных химических компьютерных программ, уже найдены некоторые потенциальные низкомолекулярные ингибиторы вируса Эбола и Марбург, принадлежащие к различным классам химических соединений [169]. Однако это не отменяет необходимости систематического поиска новых препаратов различных классов действия. Вирусные поверхностные белки могут являться фармакологическими мишенями для действия новых ингибиторов.

В настоящее время ведется активный поиск ингибиторов входа филловирюсов в клетку, причем как среди оригинальных соединений, так и среди зарегистрированных лекарственных препаратов, используемых для лечения других заболеваний. Так, известно, что блокаторы

ионных каналов амиодарон и верапамил ингибируют вход филовирусов в клетки в концентрациях, сравнимых с теми, что достигаются в плазме при использовании их в клинике в качестве антиаритмиков. Для входа филовирусов в клетку необходимо множество взаимодействий между клеточными и вирусными белками, некоторые механизмы используются рядом вирусов, другие уникальны для филовирусов. Ингибитор может действовать непосредственно на вирус – то есть на вирусные поверхностные белки, в таком случае являясь абсолютно селективным, или на клеточные факторы, необходимые для продуктивной вирусной инфекции (например, активность эндоцитоза, pH внутри компартмента и т.д.). Второе нередко может быть связано либо со способностью ингибировать более чем один вирус (в случае, если эти вирусы используют данный клеточный механизм для входа) либо с более высокой токсичностью для самих клеток. Схематичное изображение начальных стадий инфекции псевдовирусов VSV-ΔG-MarV и VSV-ΔG-G дано на рисунке 24.

В данной работе впервые изучена противовирусная активность библиотеки оригинальных соединений, производных терпеноидов, как в отношении их действия на инфекцию псевдовирусов с поверхностными белками вируса гриппа H5N1, так и псевдовируса, псевдотипированного поверхностным белком вируса Марбург.

Наиболее интересными в отношении ингибирования MarvGP-зависимой псевдовирусной инфекции оказались производные борнеола. Борнеол и его производные широко распространены в природе, обнаружены в эфирных маслах, получаемых из культивируемых и дикорастущих растений. Борнеол сегодня активно используется в ароматерапии, парфюмерии, косметологии благодаря своим противомикробному, местнораздражающему и противовоспалительному действиям. Показана противовирусная активность в отношении вируса простого герпеса 1 типа, активность фторсодержащих производных борнеола против вируса гриппа H5N1, анти-ВИЧ-активность сложных эфиров изоборнеола.

При использовании псевдотипированных вирусов для выявления ингибиторов, ожидается, что соединения, обладающие специфической ингибирующей активностью в отношении MarV-GP- зависимого входа вируса в клетку будут подавлять VSV-ΔG-MarV в значительно большей степени, чем псевдовирс VSV-ΔG-G, используемый в качестве контроля. В тоже время соединения, подавляющие оба псевдовируса в равной степени, скорее всего, могут воздействовать на репликацию капсида pBBC или на клеточные механизмы, общие для входа обоих вирусов (состав и свойства клеточных мембран, активность эндоцитоза и закисление содержимого эндосом и т.д.). Активность данных соединений не зависит от функции псевдотипирующих поверхностных белков, то есть такие вещества не могут рассматриваться как селективные ингибиторы поверхностных белков филовирусов и вирусов птичьего гриппа. Однако такие вещества могут быть интересны, например, при разработке

ингибиторов широкого спектра действия или ингибиторов рабдовирусов. Аналогично для ингибиторов гемагглютинин - зависимого входа. Были выявлены вещества, действующие селективно на псевдотипированный MarvGP псевдовирус, имеющие высокий индекс селективности (т.е. относительно низкую токсичность) и высокий индекс специфичности.

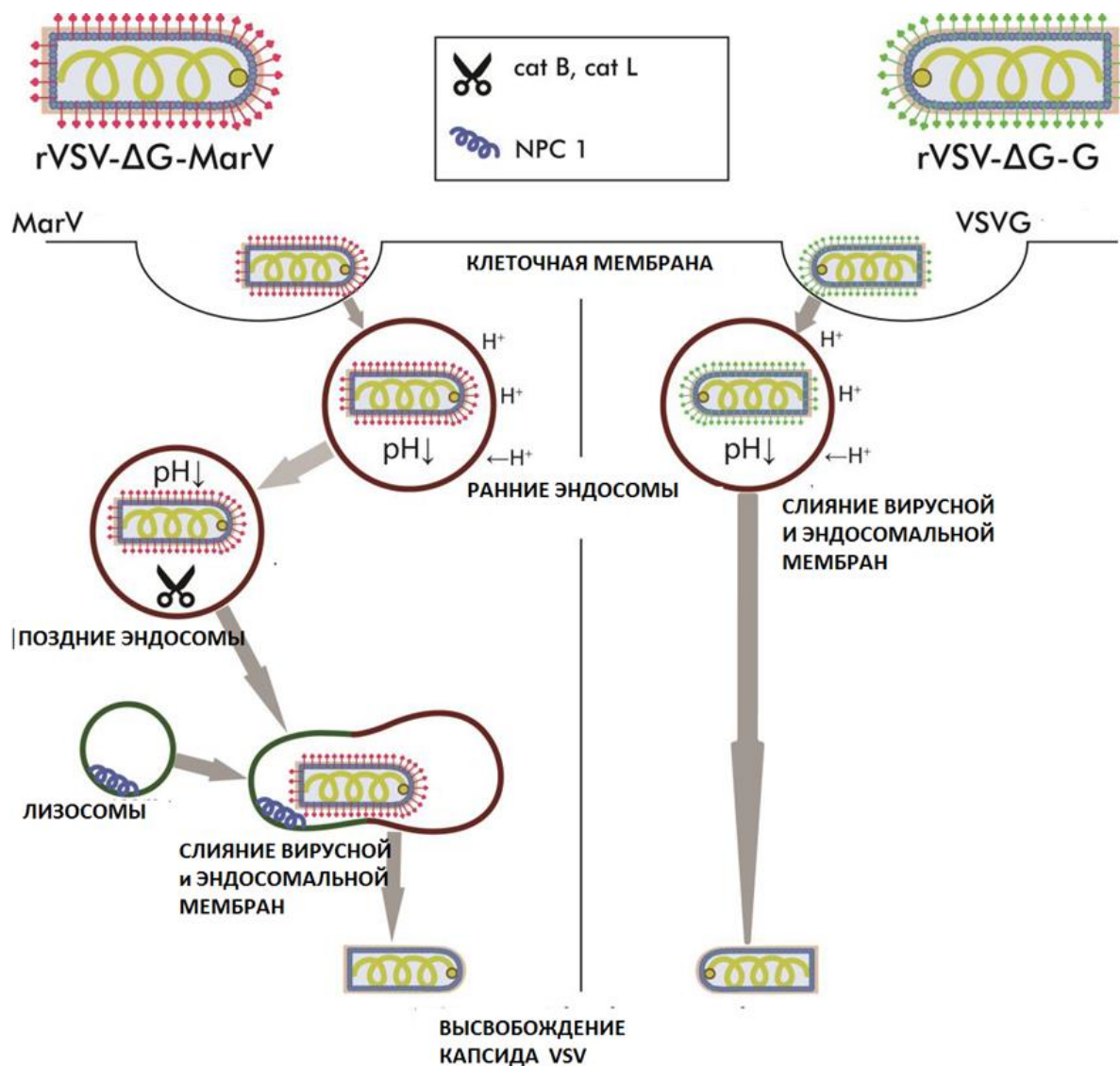


Рисунок 24. Сравнительное изображение начальных стадий инфекций VSV-ΔG-MarV и VSV-ΔG-G. Оба псевдотипа проникают в клетку путем эндоцитоза. Капсид псевдовируса VSV-ΔG-G высвобождается в цитозоль уже из ранней эндосомы, в то время как VSV-ΔG-MarV продолжает движение по эндосомальному пути. В поздних эндосомах MarV-GP подвергается протеолитическому расщеплению катепсинами. После эндолизосомного слияния псевдотип VSV-ΔG-MarV связывается со своим рецептором NPC1, таким образом, индуцируя слияние мембран и высвобождение капсида VSV в цитозоль. Ожидается, что ингибиторы филловиралов будут ингибировать стадии, специфические для псевдовируса VSV-ΔG-MarV.

С целью подтверждения возможности практического применения разработанной системы, соединения 4 и 6, проявившие наибольшую активность в отношении псевдовирусных частиц, были протестированы в отношении ингибирования инфекции репликационно-компетентного вируса Марбург штамма Рорр в культуре клеток. Исследование было проведено сотрудниками ФБУН ГНЦ БВ «Вектор» под руководством заведующим отделом «Коллекция микроорганизмов», к. б. н. Пьянкова О.В.. IC₅₀ для веществ 4 и 6 составила 3.7 мкмоль и 2.2 мкмоль, а терапевтический индекс – 110 и 32, соответственно. Таким образом, исследуемые соединения продемонстрировали высокую противовирусную активность в отношении вируса Марбург, а псевдовирусная система может быть использована в качестве эффективного инструмента для поиска противовирусных веществ.

Длительность временного окна после запуска вирусного входа, в течение которого возможно добавление ингибитора без потери его активности, косвенно указывает на стадию вирусного жизненного цикла, в отношении которого действует этот ингибитор (time-of-addition assay). Для более точного разрешения данной проблемы, могут быть использованы ингибиторы с точно установленной молекулярной мишенью. Данный метод широко используется уточнения механизма действия новых и уже известных ингибиторов вирусных инфекций [170, 171].

Time-of-addition assay для исследуемых оригинальных соединений показал, что они действуют на стадии, близкой к действию имипрамина – то есть на стадии взаимодействия GP вируса Марбург с его истинным рецептором NPC-1, находящимся на мембране поздних эндосом или лизосом.

Заключение

Таким образом, в ходе работы получена коллекция псевдовирусов на основе капсида рекомбинантного ВВС, а также на основе лентивирусного капсида. Использование псевдовирусов на основе капсида ВВС имеет некоторые преимущества над псевдолентивирусами. Во-первых, работа с этой системой требует использования меньшего количества плазмид (только плазмиды, кодирующие поверхностные белки), во-вторых, псевдотипированные ВВС имеют более высокий трансдуцирующий титр по сравнению с псевдолентивирусами и дают возможность более быстрого его определения в силу особенностей репликационного цикла рабдовирусов и лентивирусов. Псевдотипированные ВВС являются более термостабильными, выдерживают многократные циклы замораживания-оттаивания. Кроме того, с использованием рекомбинантного ВВС возможно создание многоциклового модели распространения вирусной инфекции в клеточном монослое, что дает возможность изучения кумулятивного действия ингибиторов, а также, в случае наличия нескольких поверхностных белков, действующих на различных стадиях вирусного жизненного цикла, позволяет изучать их различные комбинации.

В ходе данной работы впервые получен псевдовирус с поверхностными белками вируса гриппа методом ко-экспрессии репликационно-неполноценного капсида ВВС (с инактивированным геном G-белка) и плазмидных векторов, кодирующих поверхностные белки вируса гриппа H5N1. Такой подход представляется более практичным для получения большого количества рВВС-псевдовирусов, псевдотипированных различными комбинациями НА и NA. Показано, что предложенная система может быть использована для поиска противовирусных препаратов, действующих на стадии инфекции, как обусловленные активностью гемагглютинаина, так и обусловленные активностью нейраминидазы.

С использованием псевдовируса на основе капсида ВВС, псевдотипированного поверхностным гликопротеином вируса Марбург, изучена активность оригинальных химических соединений N-гетероциклических сложных эфиров борнеола на начальные стадии инфекции вируса Марбург. Противовирусные свойства наиболее активных веществ были подтверждены *in vitro* с использованием инфекционных изолятов вируса Марбург и Эбола, что подтверждает целесообразность использования данного подхода для скрининга потенциальных ингибиторов особо опасных вирусных инфекций. Дальнейшие исследования должны выявить молекулярные механизмы, ответственные за ингибирование инфекции, а полученные данные могут быть полезны для создания более активных и менее токсичных ингибиторов филовиральной инфекции на основе производных борнеола.

Выводы

1. Впервые сконструированы и получены псевдовирусные препараты на основе репликационно–дефектного капсида рекомбинантного вируса везикулярного стоматита (pVBC) с инаktivированным геном поверхностного гликопротеина G, экспрессирующие поверхностные белки вируса гриппа А субтипа H5N1. Титр полученных препаратов, определенный в модифицированном тесте бляшкообразования на клетках линии Vero, составил порядка 10^9 БОЕ/мл. Люминесцентный сигнал, детектируемый при заражении клеток линии HEK293, возрастает линейно и превышает фоновый более 1000 раз, таким образом, псевдовирус pVBC с репортерным геном люциферазы подходит для количественной оценки ингибирующего эффекта веществ, обладающих активностью против поверхностных белков вируса гриппа.
2. Показано, что трансдуцирующая активность псевдовирусов с гемагглютинином H5 одного типа и различными нейраминидазами вируса гриппа H5N1 определяется типом нейраминидазы. Наиболее высоким трансдуцирующим титром обладали псевдовирусы, экспрессирующие на своей поверхности нейраминидазу N1 вируса гриппа A/California/27/2009/H1N1, в то время как трансдуцирующие титры псевдовирусов с нейраминидазой N1 изолята A/Hamburg/05/2009/H1N1 и изолята A/Thailand/1(KAN-1)/2004/H5N1 были ниже в 2 и 10 раз, соответственно.
3. С использованием специфических поликлональных и моноклональных антител против H5, лизосомотропных агентов и ингибитора нейраминидазы карбоксилата осельтамивира показана возможность применения предложенной псевдовирусной системы для поиска и изучения ингибиторов обоих поверхностных белков вируса гриппа H5N1 – гемагглютенина и нейраминидазы.
4. Впервые создана модель многоциклового инфицирования псевдовируса на основе репликационно-дефектного pVBC с поверхностным гликопротеином вируса Марбург.
5. С использованием псевдовирусных систем проведено исследование противовирусной активности более 100 соединений - производных полусинтетических терпеноидов (на модели одноциклового псевдовирусной инфекции). Обнаружены соединения, относящиеся к N-гетероциклическим производным сложных эфиров борнеола, специфически ингибирующие проникновение псевдовируса с поверхностным белком вируса Марбург в клетку. Наиболее активным является (1S,4S)-1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-ил-3-(4-метилпиперидин-1-ил)пропаноат, его полуингибирующая концентрация составляет 4 ± 1 мкМ, при индексе селективности равном 60, что отражает его сравнительно низкую токсичность.

Список цитируемой литературы

1. Altstein A.D., Zhdanov, V.M., Omelchenko, T.N., Dzagurov, S.G., Miller, G.G., Závada, J. Phenotypic mixing of vesicular stomatitis virus and D-type oncornavirus. // Int J Cancer. – 1976. – №1. – P. 780–784
2. Závada J. Viral pseudotypes and phenotypic mixing. Short review // Arch Virol. – 1976 –№ 50. – P. 1–15.
3. Závada J., Dickson C., Weiss R.. Pseudotypes of vesicular stomatitis virus with envelope antigens provided by murine mammary tumor virus // Virology. – 1977. – № 82. – P. 221–231
4. Rubin H. Genetic Control of Cellular Susceptibility to Pseudotypes of Rous Sarcoma Virus // Virology. – 1965. – №26. – P. 270-276
5. Závada J.. The pseudotypic paradox // J Gen Virol. - 1982 (Pt 1). - P. 15-24.
6. Wang S. Combining a Fusion Inhibitory Peptide Targeting the MERS-CoV S2 Protein HR1 Domain and a Neutralizing Antibody Specific for the S1 Protein Receptor-Binding Domain (RBD) Showed Potent Synergism against Pseudotyped MERS-CoV with or without Mutations in RBD // Viruses.– 2019. – V.11. – №1. – P. 31.
7. Du L., Yang Y., Zhou Y., Lu L., Li F., Jiang S. MERS-CoV spike protein: a key target for antivirals // Expert Opin Ther Targets. – 2017. – №21. – P.131-43.
8. Grehan, K., Ferrara, F., Temperton, N. An optimised method for the production of MERS-CoV spike expressing viral pseudotypes // Methods X. – 2015. – № 2. – P. 379-384
9. Long, J.; Wright, E.; Molesti, E.; Temperton, N.; Barclay, W. Antiviral therapies against Ebola and other emerging viral diseases using existing medicines that block virus entry // F1000Research – 2015- 4, 30.
10. Anantpadma M.; Kouznetsova J.; Wang H.; Huang R.; Kolokoltsov A.; Guha R.; Lindstrom A.R.; Shtanko O.; Simeonov A.; Maloney D. J.; et al. Large-scale screening and identification of novel Ebola virus and marburg virus entry inhibitors // Antimicrob. Agents Chemother. – 2016. – №60. – P. 4471–4481
11. Beck, S.; Henß, L.; Weidner, T.; Herrmann, J.; Müller, R.; Chao, Y.-K.; Grimm, C.; Weber, C.; Sliva, K.; Schnierle, B.S. Identification of entry inhibitors of Ebola virus pseudotyped vectors from a myxobacterial compound library // Antivir. Res. – 2016. – № 132. – P. 85–91.

12. Jae L.T., Raaben M., Herbert A.S., Kuehne A.I., Wirchnianski A.S., Soh TK, Stubbs SH, Janssen H, Damme M, Saftig P. et al. Virus entry. Lassa virus entry requires a trigger-induced receptor switch // *Science*. – 2014. – V.344. – №6191. – P. 1506-10.
13. Bhella, D.. The role of cellular adhesion molecules in virus attachment and entry // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. – 2015. - 370, 20140035.
14. Lusso P., di Marzo Veronese F., Ensoli B., Franchini G., Jemma C., DeRocco S. E., Kalyanaraman V. S., Gallo R. C. Expanded HIV-1 cellular tropism by phenotypic mixing with murine endogenous retroviruses // *Science*. – 1990. – V. 247. – №4944. – P. 848-52.
15. Page K. A., Landau N. R., Littman D. R. Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity // *J Virol*. – 1990. – V.11 – № 11. – P. 5270-6.
16. Landau N. R., Page K. A., Littman D. R. Pseudotyping with human T-cell leukemia virus type I broadens the human immunodeficiency virus host range // *J Virol*. – 1991. – №65. - P.162–169
17. Cronin, J., Zhang, X.Y., Reiser, J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping // *Curr Gene Ther*. – 2005. – № 4. – P. 387-98.
18. Schnell M. J., Buonocore L., Whitt M. A., Rose J. K. The minimal conserved transcription stop-start signal promotes stable expression of a foreign gene in vesicular stomatitis virus // *J Virol*. – 1996 - V.70. – №4. – P. 2318–23
19. Takada A., Robison C., Goto H., Sanchez A., Murti K. G., Whitt M. A., Kawaoka Y. A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1997. – V. 94. – №26. – P. 14764-9.
20. Chan S. Y., Speck R. F, Ma M. C., Goldsmith M. A.. Distinct mechanisms of entry by envelope glycoproteins of Marburg and Ebola (Zaire) viruses // *J Virol*. – 2000. – V.74. – №10. – P. 4933-7.
21. Gnirss K., Kühl A., Karsten C., Glowacka I., Bertram S., Kaup F., Hofmann H., Pöhlmann S.. Cathepsins B and L activate Ebola but not Marburg virus glycoproteins for efficient entry into cell lines and macrophages independent of TMPRSS2 expression // *Virology*. – 2012. – V. 424. – N 1. – P. 3-10.
22. Carette, J.E. , Raaben, M., Wong, A.C., Herbert, A.S., Obernosterer, G., Mulherkar, N., Kuehne, A.I., Kranzusch, P.J., Griffin, A.M., Ruthel, G.. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1 // *Nature*. – 2011. – V. 477. – №7364. – P.340-3

23. Sakurai Y., Kolokoltsov A. A., Chen, C. C., Tidwell M. W., Bauta W. E., Klugbauer N, Grimm C., Wahl-Schott C, Biel M, Davey RA. Two-pore channels control Ebola virus host cell entry and are drug targets for disease treatment // *Science*. – 2015. – V. 347. – № 6225. – P. 995-8
24. Flint M., Logvinoff C., Rice C.M., McKeating J.A. Characterization of infectious retroviral pseudotype particles bearing hepatitis C virus glycoproteins // *J Virol*. – 2004. – N. 78. – P. 6875–82.
25. Castet V., Moradpour D. A model for the study of hepatitis C virus entry // *Hepatology*. – 2003. – V. 38. – № 3. – P.771-774.
26. Jones K. S., Fugo K., Petrow-Sadowski C., Huang Y., Bertolette D. C., Lisinski I., Cushman S.W., Jacobson S., Ruscetti F. W. Human T-cell leukemia virus type 1 HTLV-1 and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. *J. Virol*. – 2006. – № 80. – P. 8291–8302.
27. Bartosch B., Vitelli A., Granier C., Goujon C., Dubuisson J., Pascale S., Scarselli E., Cortese R, Nicosia A, Cosset FL. Cellentry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor // *J Biol Chem*. – 2003. – V.278. – №43. – P. 41624-30.
28. Mazarakis N. D., Azzouz M., Rohll J. B., Ellard F. M., Wilkes F. J., Isen A. L., Carter E. E., Barber R. D., Baban D. F., Kingsman S. M., Kingsman A. J., O'Malley K., Mitrophanous K. A. Rabies virus glycoprotein pseudotyping of lentiviral vectors enables retrograde axonal transport and access to the nervous system after peripheral delivery // *Hum. Mol. Genet*. – 2001. – №10. – P. 2109-21
29. Kato S., Kobayashi K., Inoue K., Kuramochi M., Okada T., Yaginuma H., Morimoto K., Shimada T., Takada M., Kobayashi K.. A lentiviral strategy for highly efficient retrograde gene transfer by pseudotyping with fusion envelope glycoprotein // *Hum Gene Ther*. – 2011. – V.22. – №2. – P. 197-206.
30. Keele B. F., Giorgi E. E., Salazar-Gonzalez J. F., Decker J. M., Pham K. T., Salazar M. G., Sun C., Grayson T., Wang S. c coавт. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – V.105. – №21. – P. 7552-57
31. Saha M. N., Tanaka A., Jinno-Oue A., Shimizu N., Tamura K., Shinagawa M., Chiba J., Hoshino H. Formation of Vesicular Stomatitis Virus Pseudotypes Bearing Surface Proteins of Hepatitis B Virus // *J. Virology*. – 2005. – V. 79. – № 19. – P. 12566–12574.

32. Chai N., Chang H.E., Nicolas E., Gudima S., Chang J., Taylor J.. Assembly of hepatitis B virus envelope proteins onto a lentivirus pseudotype that infects primary human hepatocytes // *J Virol.* – 2007. – V.81. – № 20. – P.10897-10904
33. Temperton N.J., Hoschler K., Major D., Nicolson C., Manvell R., Hien V.M., Ha do Q., de Jong M., Zambon M., Takeuchi Y., Weiss R.A. A sensitive retroviral pseudotype assay for influenza H5N1-neutralizing antibodies // *Influenza Other Respir Viruses.* – 2007. – V. 1. – №3. –P. 105-12.
34. Molesti E., Wright E., Terregino C., Rahman R., Cattoli G., Temperton N.J. Multiplex evaluation of influenza neutralizing antibodies with potential applicability to in-field serological studies // *J Immunol Res.* – 2014. 2014:457932.
35. Duehr J., Wohlbold T. J., Oestereich L., Chromikova V., Amanat F., Rajendran M., Gomez-Medina S., Mena I, Benjamin R. tenOever, García-Sastre A., Basler C. F., Munoz-Fontela C., Krammer F. Novel cross-reactive monoclonal antibodies against Ebolavirus glycoproteins show protection in a murine challenge model // *J Virol.* – 2017. – V.91. – №16. -e00652-17
36. Li M., Gao F., Mascola J. R., Stamatatos L., Polonis V. R., Koutsoukos M., Voss G., Goepfert P., Gilbert P., Greene K. M., Bilska M., Kothe D. L., Salazar-Gonzalez J. F., Wei X., Decker J. M., Hahn B. H., Montefiori D. C. Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies // *J Virol.* – 2005. – V. 79. – №16. – P. 10108-25.
37. Kim S.-H., Lim K.-I.. Stability of retroviral vectors against ultracentrifugation is determined by the viral internal core and envelope proteins used for pseudotyping // *Mol Cells.* – 2017. – V.40. – №5. – P. 339–345.
38. Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., Yee, J.-K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: Concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells // *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* – 1993. – V. 90. – P. 8033- 37.
39. Bouard D., N. Alazard-Dany, and F. L. Cosset. Viral vectors: from virology to transgene expression // *The British Journal of Pharmacology* – 2009. – V. 157 – № 2. – P. 153–65.
40. Maetzig T., Galla M., Baum C., Schambach A. Gammaretroviral vectors: biology, technology and application. // *Viruses.* – 2011. - V 3. – №6. – P. 677-713.
41. Maier P., Christof von Kalle, Laufs S. Retroviral Vectors for Gene Therapy // *Future Microbiol.* – 2010. – V.10. – №5 – P. 1507-1523.

42. Ferreira V., Petry H., Salmon F. Immune Responses to AAV-Vectors, the Glybera Example from Bench to Bedside // *Front Immunol.* 2014.3;5:82. eCollection
43. Aiuti A., Roncarolo M. G., Naldini, L. Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an ex vivo gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products // *EMBO Mol Med.* – 2017. – V. 9. – № 6. – P. 737-740.
44. Ameri H. Prospect of retinal gene therapy following commercialization of voretigene neparvovec-rzyl for retinal dystrophy mediated by RPE65 mutation // *J Curr Ophthalmol.* – 2018. – V. 30. – №1. – P. 1-2.
45. Kobayashi K., Inoue K. I., Tanabe S., Kato S., Takada M.. Pseudotyped Lentiviral Vectors for Retrograde Gene Delivery into Target Brain Regions // *Front Neuroanat.* –2017. – 11:65.
46. Yang L., Bailey L., Baltimore D., Wang P. Targeting lentiviral vectors to specific cell types in vivo // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2006. –V.103. – №31. – P.11479-84.
47. Matrai J., Chuah M.K., VandenDriessche T. Recent Advances in Lentiviral Vector Development and Applications // *Mol Ther.* – 2010. – V.18 – №3. – P.477-90.
48. Yu L, Bai W, Wu X, Zhang L, Zhang L, Li P, Wang F, Liu Z, Zhang F, Xu Z. A recombinant pseudotyped lentivirus expressing the envelope glycoprotein of hantaan virus induced protective immunity in mice // *Virol. J.* – 2013. – 10:301.
49. Xu J.P., Francis A.C., Meuser M.E. , Mankowski M., Ptak R.G., Rashad A.A., Melikyan G.B., Cocklin S Exploring Modifications of an HIV-1 Capsid Inhibitor: Design, Synthesis, and Mechanism of Action // *J Drug Des Res.* – 2018. – V. 5. – №2. – P. 1070.
50. Madu I. G., Li S., Li B., Li H., Chang T., Li Y. J., Vega R., Rossi J., Yee J. K., Zaia J., Chen Y. A Novel Class of HIV-1 Antiviral Agents Targeting HIV via a SUMOylation-Dependent Mechanism // *Sci Rep.* – 2015.–V. 8. – №5. – P. 17808.
51. Upert G., Di Giorgio A., Upadhyay A., Manvar D., Pandey N., Pandey V.N., Patino N. Inhibition of HIV Replication by Cyclic and Hairpin PNAs Targeting the HIV-1 TAR RNA Loop // *J Nucleic Acids.* – 2012:591025.
52. Basu A., Mills D.M., Bowlin T.L.High-throughput screening of viral entry inhibitors using pseudotyped virus // *Curr Protoc Pharmacol* – 2010. – Chapter 13:Unit 13B.3.
53. Perlmutter J. D.; Hagan M. F. Mechanisms of virus assembly // *Phys. Chem.* – 2015. – №. 66 – P. 217–239.

54. Johnson J.E., Rodgers W., Rose J.K.. A plasma membrane localization signal in the HIV-1 envelope cytoplasmic domain prevents localization at sites of vesicular stomatitis virus budding and incorporation into VSV virions // *Virology*. – 1998. – V. 251. – № 2. – P. 244-52
55. Mammano F., Salvatori F., Indraccolo S., De Rossi A., Chieco-Bianchi L., Göttlinger H. G. Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of Moloney murine leukemia virus particles and gene transfer into CD4+ cells // *J Virol*. – 1997. – V.71. – №4. – P. 3341-5.
56. Bruett L., Clements J. E.. Functional murine leukemia virus vectors pseudotyped with the visnavirus envelope show expanded visna virus cell tropism. // *J Virol*. – 2001. – V.75. – №23. – P. 11464-73.
57. Hu H.P., Hsieh S.C., King C.C., Wang W.K. Characterization of retrovirus-based reporter viruses pseudotyped with the precursor membrane and envelope glycoproteins of four serotypes of dengue viruses. // *Virology*. – 2007. – V.368 - №2. – P. 376-87.
58. Kobayashi M., Iida A., Ueda Y., Hasegawa M. Pseudotyped lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus SIVagm with envelope glycoproteins from paramyxovirus // *J Virol*. – 2003. – V. 77. – №4. – P.2607-14.
59. Palomares K., Vigant F., Van Handel B., Pernet O., Chikere K., Hong P., Sherman S. P., Patterson M., An D. S., Lowry W. E. et al.. Nipah virus envelope-pseudotyped lentiviruses efficiently target ephrinB2-positive stem cell populations in vitro and bypass the liver sink when administered in vivo // *J Virol*. – 2013. – №87. – P. 2094–2108.
60. Zhou F., Wang G., Buchy P., Cai Z., Chen H., Chen Z., Cheng G., Wan X. F., Deubel V., Zhou P. A Triclade DNA Vaccine Designed on the Basis of a Comprehensive Serologic Study Elicits Neutralizing Antibody Responses against All Clades and Subclades of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 // *Viruses*. – 2012. – V.86. – №12. – P. 6970-8.
61. Sigert S., Thalert S., Wagner R., Schnierle B. S.. Assessment of HIV-1 entry inhibitors by MLV/HIV-1 pseudotyped vectors // *AIDS Res Ther*. – 2005. – № 12. – P. 2-7
62. Sung, V. M., Lai, M. M. Murine retroviral pseudotype virus containing hepatitis B virus large and small surface antigens confers specific tropism for primary human hepatocytes: a potential liverspecific targeting system // *J Virol* – 2002 - № 76. – P. 912–917.
63. Bottcher-Friebertshauser, E., Freuer, C., Sielaff, F., Schmidt, S., Eickmann, M.,Uhlendorff, J., Steinmetzer, T., Klenk, H.D., Garten, W. Cleavage of influenza virus hemagglutinin by airway

proteases TMPRSS2 and HAT differs in subcellular localization and susceptibility to protease inhibitors // J. Virol. – V.84. – P. 5605–5614

64. Kido H., Kamoshita K., Fukutomi A., Katunuma N. Processing protease for gp160 human immunodeficiency virus type I envelope glycoprotein precursor in human T4+ lymphocytes. Purification and characterization // J Biol Chem. – 1993. – V. 268. – №18. – P. 13406-13.
65. Aguilar H. C., Henderson B. A., Zamora J. L., Johnston G. P. Paramyxovirus glycoproteins and the membrane fusion process // Curr. Clin. Microbiol. Rep. – 2016. – №3. – P. 142–154.
66. Millet J. K., Whittaker G. R. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. // Virus Res. – №2015. –202. – P. 120-34.
67. Böttcher, E., Freuer, C., Steinmetzer, T., Klenk, H.-D., Garten, W. MDCK cells that express proteases TMPRSS2 and HAT provide a cell system to propagate influenza viruses in the absence of trypsin and to study cleavage of HA and its inhibition // Vaccine. – 2009. – V.27. – N 45. – P. 6324–6329.
68. Bertram S., Glowacka I., Steffen I., Kühl A., Pöhlmann S.. Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin // Rev Med Virol. –2010. – V.20. – №5. –P. 298-310.
69. Sawoo O., Dublineau A., Batéjat C., Zhou P., Manuguerra J.-C., Leclercq I. Cleavage of hemagglutinin-bearing lentiviral pseudotypes and their use in the study of influenza virus persistence // PLoS One -2014- 9:e106192.10.1371/journal.pone.0106192
70. Jung C., Le Doux J. M.. Lentiviruses inefficiently incorporate human parainfluenza type 3 envelope proteins //Biotechnol. Bioeng. –2008. – № 99. – P. 1016-1027.
71. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system // J Virol. – 1998. – V. 72. – № 11. – P. 8463-71
72. Williams D. A., Orkin S. H., Mulligan R. C.. Retrovirus-mediated Transfer of Human Adenosine Deaminase Gene Sequences into Cells in Culture and into Murine Hematopoietic Cells in Vivo // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1986. – №83. – P. 2566-70.
73. Bergmana I., Whitaker-Dowlingd P., Gaoa Y., Griffine J A. Preferential targeting of vesicular stomatitis virus to breast cancer cells // Virology – 2004. – № 330. – P. 24–33
74. Melzer M. K., Lopez-Martinez A., Altomonte J.. Oncolytic Vesicular Stomatitis Virus as a Viro-Immunotherapy: Defeating Cancer with a ‘Hammer’ and ‘Anvil’ // Biomedicines. – 2017. – V. 5. – №1. – P.8.

75. Jayakara H. R., Jeetendraa E., Whitt M.A. Rhabdovirus assembly and budding // *Virus Research* – 2004. – V. 106. – P. 117–132
76. Kopecky S. A., Lyles D. S.. The cell-rounding activity of the vesicular stomatitis virus matrix protein is due to the induction of cell death. // *J Virol.* – 2003. – V. 77. – №9. – P. 5524-8.
77. Coil DA, Miller AD. Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus // *J Virol.* – 2004. – V.78 – №20. – P.10920-6.
78. Nikolic J., Belot L., Raux H., Legrand P., Gaudin Y., A Albertini A. Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein // *Nat Commun.* – 2018. – №1. – P. 1029.
79. Tani H., Morikawa S., Matsuura Y. Development and Applications of VSV Vectors Based on Cell Tropism // *Front Microbiol.* 2012. - 2:272.
80. Whitt, M. A. Generation of VSV Pseudotypes Using Recombinant Δ G-VSV for Studies on Virus Entry, Identification of Entry Inhibitors, and Immune Responses to Vaccines // *J. Virol. Methods.* – 2010. – V. 169. – № 2. – P. 365–374.
81. Fukushi S., Tani H., Yoshikawa T., Saijo M., Morikawa S. Serological Assays Based on Recombinant Viral Proteins for the Diagnosis of Arenavirus Hemorrhagic Fevers // *Viruses.* – 2012. – V. 4. – № 10. – P. 2097–2114.
82. Whitby K., Pierson T.C., Geiss B., Lane K., Engle M., Zhou Y., Doms R.W., Diamond M.S. Castanospermine, a potent inhibitor of dengue virus infection in vitro and in vivo // *J. Virol.*– 2005. – №79. – P. 8698–8706.
83. Qing M., Liu W., Yuan Z., Gu F., Shi P.Y.. A high-throughput assay using dengue-1 virus-like particles for drug discovery // *Antiviral Res.* – 2010. – V.86. – №2. – P. 163-71.
84. Li D., Chen T., Hu Y., Zhou Y., Liu Q., Zhou D., Jin X., Huang Z. An Ebola Virus-Like Particle-Based Reporter System Enables Evaluation of Antiviral Drugs In Vivo under Non-Biosafety Level 4 Conditions // *J Virol.* – 2016. – №90. – P. 8720–8.
85. Mortola E., Roy P. Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system // *FEBS Lett.* – 2004. – V. 576. – №1–2. – P. 174–8.
86. Martínez-Sobrido L., Cadagan R., Steel J., Basler C. F., Palese P., Moran T. M., García-Sastre A. Hemagglutinin-pseudotyped green fluorescent protein-expressing influenza viruses for the detection of influenza virus neutralizing antibodies // *J Virol.* – 2010. – V. 84. – №4. – P. 2157-63.

87. Tscherne D.M., Manicassamy B., García-Sastre A. An enzymatic virus-like particle assay for sensitive detection of virus entry // *J. Virol. Methods*. – 2010. – №163. – P. 336–343.
88. Lavillette, D., Bartosch, B., Nourrisson, D. et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes // *J Biol Chem*. – 2006. – V. 281. - P. 3909–17
89. Eisenberg R. J., Atanasiu D., Cairns T. M., Gallagher JR, Krummenacher C, Cohen GH. Herpes virus fusion and entry: a story with many characters // *Viruses*. – 2012. – N 4. – P. 800–32.
90. Chang, A., Dutch, R. E. Paramyxovirus fusion and entry: multiple paths to a common end // *Viruses*. – 2012. -V. 4. – №4. – P. 613–36.
91. Wang, K.; Xie, S.; Sun, B. Viral proteins function as ion channels // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2011- №1808. – P. 510–515.
92. Smith A. E., Helenius A. How Viruses Enter Animal Cells // *Science*. – 2004. – V. 304. – P. 237–241.
93. Harrison S. C. Viral membrane fusion // *Virology*. – 2015. – №479-480. – P. 518–531
94. White J. M., Delos S. E., Brecher M., Schornberg K. Structures and Mechanisms of Viral Membrane Fusion Proteins: Multiple Variations on a Common Theme // *Crit Rev Biochem Mol Biol*. – 2008. – V. 43. – N 3. – P. 189–219.
95. Plemper R. K. Cell Entry of Enveloped Viruses // *Curr Opin Virol*. – 2012. – V. 1. – №2. – P. 92-100.
96. Chernomordik L. V., Zimmerberg J. Bending membranes to the task: structural intermediates in bilayer fusion // *Curr Opin Struct Biol*. – 1995. – № 5. – P. 541–7.
97. Kielian M. Mechanisms of Virus Membrane Fusion Proteins // *Annu Rev Virol*. – 2014. – V.1. – №1. – P.171-89.
98. Podbilewicz B. Virus and cell fusion mechanisms // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. – 2014. –№30. – P. 111 – 139
99. Kalthoff D., Globig A., Beer M. Highly pathogenic avian influenza as a zoonotic agent // *Vet. Microbiol*. – 2010. – № 140. – P. 237–245
100. Bouvier N. M., Pales P. The biology of influenza virus // *Vaccine*. – 2008. – 26 (Suppl 4). P. 49–53.

101. McAuley J. L., Gilbertson B. P., Trifkovic S., Brown L. E., McKimm-Breschkin J. L. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions // *Front Microbiol.* – 2019 Jan 29; 10:39.
102. Rumschlag-Booms E., Rong L. Influenza Virus Entry Implications in Virulence and Future Therapeutics // *Advances in Virology.* – 2013. – V. 2013. – P. 1–9.
103. <http://20.rospotrebnadzor.ru/directions/epid/97143/>
104. Poovorawan Y., Pyungporn S., Prachayangprecha S., Makkoch J. Global alert to avian influenza virus infection: From H5N1 to H7N9 // *Pathog. Glob. Health.* – 2013. – V. 107. – № 5. – P. 217–223.
105. O'Hanlon, R.; Shaw, M.L. Baloxavir marboxil: The new influenza drug on the market // *Curr. Opin. Virol.* – 2019. – V. 35 – P. 14–18.
106. Mair CM, Ludwig K, Herrmann A, Sieben C. Receptor binding and pH stability — How influenza A virus hemagglutinin affects host-specific virus infection // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – V. 18387. – №4. – P.1153-68
107. Yamaya M., Shimotai Y., Hatachi Y., Lusamba Kalonji N., Tando Y., Kitajima Y., et al. The serine protease inhibitor camostat inhibits influenza virus replication and cytokine production in primary cultures of human tracheal epithelial cells // *Pulm Pharmacol Ther.* – 2015. – № 33. – P. 66–74.
108. Xiong X., McCauley J.W., Steinhauer D.A. Receptor binding properties of the influenza virus hemagglutinin as a determinant of host range // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2014. – V. 385. – P. 63-91.
109. Lin A. H., Cannon P. M. Virus Res. Use of pseudotyped retroviral vectors to analyze the receptor-binding pocket of hemagglutinin from a pathogenic avian influenza A virus (H7 subtype) // *Virus Res.* – 2002. – V. 83. – №1-2. – P. 43-56.
110. Yang J., Li M., Xintian S, Liu S. Influenza A Virus Entry Inhibitors Targeting the Hemagglutinin // *Viruses.* – 2013. – №. 5. – P. 352-373.
111. Terabayashi T., Morita M., Ueno M., Nakamura T., Urashima T. Inhibition of influenza-virus-induced cytopathy by sialylglycoconjugates // *Carbohydr Res.* – 2006. – V. 341 - №13 - P. 2246-53.
112. Luo, M. Influenza virus entry // *Adv. Exp. Med. Biol.* - 2012. - № 726. – P. 201–221.

113. Edinger TO, Pohl MO, Stertz S. Entry of influenza A virus: host factors and antiviral targets // *J Gen Virol.* – 2014. - V. 95 (Pt 2). – P.263 – 77.
114. Ludwig S. Targeting cell signaling pathways to fight the flu: towards a paradigm change in anti-influenza therapy // *J Antimicrob Chemother.* – 2009. – V.64. – № 1. – P.1-4
115. Ohuchi M., Asaoka N., Sakai T, Ohuchi R. Roles of neuraminidase in the initial stage of influenza virus infection // *Microbes Infect.* – 2006. – V. 8. – №5. – P.1287-93.
116. Matrosovich M. N., Matrosovich T. Y., Gray T., Roberts N. A., Klenk H. D. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium // *J Virol.* – 2004 – V. 78. – P. 12665–12667.
117. Su B., Wurtzer S., Rameix-Welti M. A., Dwyer D., van der Werf S., Naffakh N., Clavel F., Labrosse B.. Enhancement of the Influenza A Hemagglutinin (HA)-Mediated Cell-Cell Fusion and Virus Entry by the Viral Neuraminidase (NA) // *PLoS One.* – 2009. – V. 4. – № 12.
118. Wagner R., Matrosovich M., Klenk H. D.. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections // *Rev Med Virol.* – 2002. – V.12 – №3. – P.159-66.
119. Rudrawar S., Dyason J.C., Rameix-Welti M.A., Rose F.J., Kerry P.S., Russell R.J., van der Werf, S., Thomson R.J., Naffakh N., von Itzstein M. Novel sialic acid derivatives lock open the 150-loop of an influenza A virus group-1 sialidase // *Nat Commun.* – 2010. – №1. – P. 113-113
120. Air G. M.. Influenza Neuraminidase // *Influenza Other Respir Viruses.* – 2012. – V.6 – №4. – P. 245–256.
121. Moules V., Ferraris O., Terrier O., Giudice E., Yver M., Rolland J.P., Bouscambert-Duchamp M., Bergeron C., Ottmann M., Fournier E. et al. In vitro characterization of naturally occurring influenza H3NA– viruses lacking the NA gene segment: Toward a new mechanism of viral resistance // *Virology* – 2010. – № 404. - P. 215–224
122. Jagadesh A., Salam A.A., Mudgal P.P., Arunkumar G. Influenza virus neuraminidase (NA): a target for antivirals and vaccines // *Arch Virol.* – 2016. – V.161. – №8. – P. 2087-94
123. Vanderlinden E., Naesens L. Emerging Antiviral Strategies to Interfere with Influenza Virus Entry // *Med Res Rev.* – 2014. – V. – 34. –№ 2. –P.301-39.
124. Vavricka C.J., Li Q., Wu Y., Qi J., Wang M., Liu Y., Gao F., Liu J., Feng E., He J., Wang J., Liu H., Jiang H., Gao G.F.. Structural and functional analysis of laninamivir and its octanoate prodrug reveals group specific mechanisms for influenza NA inhibition. *PLoS Pathog* 2011.7:e1002249.

125. Garcia J. M., Lai J. C. Production of influenza pseudotyped lentiviral particles and their use in influenza research and diagnosis: an update // *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* – 2011. – V. 9. – № 4. – P. 443–455.
126. Carnell G.W., Ferrara F., Grehan K., Thompson C.P., Temperton N.J.. Pseudotype-based neutralization assays for influenza: a systematic analysis // *Front Immunol.* – 2015. – 6:161.
127. Roth M. G., Compans R. W.. Delayed appearance of pseudotypes between vesicular stomatitis virus and influenza virus during mixed infection of MDCK cells // *J Virol.* – 1981. – V.40. – №3. – P. 848–860.
128. Kretzschmar E., Buonocore L., Schnell M. J., Rose J. K. High-efficiency incorporation of functional influenza virus glycoproteins into recombinant vesicular stomatitis viruses // *J Virol.* – 1997. – V. 71. – №8. – P. 5982–9.
129. Kalhoro N.H., Veits J., Rautenschlein S., Zimmer G. A recombinant vesicular stomatitis virus replicon vaccine protects chickens from highly pathogenic avian influenza virus (H7N1) // *Vaccine.* – 2009. – V.27. – №8. – P.1174–1183
130. Zimmer G., Locher S., Berger Rentsch M., Halbherr S. J.. Pseudotyping of vesicular stomatitis virus with the envelope glycoproteins of highly pathogenic avian influenza viruses // *J Gen Virol.* – 2014. – V.95 (Pt 8). – P.1634–1639.
131. Cardile, A.P., Warren T.K., Martins K.A., Reisler R.B., Bavari S. Will There Be a Cure for Ebola? // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* – 2016. – № 57. – P. 329-348
132. Kuhn, J. H., Becker, S., Ebihara, H., Geisbert, T. W., Johnson, K. M.; Kawaoka, Y.; Lipkin, W. I., Negrodo, A. I., Netesov, S. V., Nichol, S. T., Palacios, G., Peters, C. J.; Tenorio, A., Volchkov, V. E., Jahrling, P. B. Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: Classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations // *Archives of Virology.* – 2010. – V. 155. – P. 2083—2103.
133. Jeffers S. A., Sanders D. A., Sanchez A. Covalent modifications of the Ebola virus glycoprotein // *J. Virol.* – 2002. – V. 76. – № 24. – P.12463–12472.
134. Hunt, C.L.; Lennemann, N.J.; Maury, W. Filovirus entry: A novelty in the viral fusion world // *Viruses.* – 2012. – V.4. – P. 258–75.
135. Moller-Tank S., Maury W. Phosphatidylserine receptors: enhancers of enveloped virus entry and infection//*Virology.* – 2014. – №46. – P. 565–580.

136. Amara A., Mercer, J.. Viral apoptotic mimicry // *Nature Reviews Microbiology*. – 2015. – V.13. – №8. – P. 461
137. Sanchez A. Analysis of filovirus entry into vero e6 cells, using inhibitors of endocytosis, endosomal acidification, structural integrity, and cathepsin (band1) activity // *J. Infect. Dis.* – 2007. – 196, S251–S258.71.
138. Aleksandrowicz P.; Marzi A.; Biedenkopf, N.; Beimforde, N.; Becker, S.; Hoenen, T.; Feldmann, H.; Schnittler, H.J. Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis // *J. Infect. Dis.* – 2011. – №204. – P. 957–67
139. Martinez O, Johnson J, Manicassamy B, Rong L, Olinger GG, et al. Zaire Ebola virus entry into human dendritic cells is insensitive to cathepsin L inhibition// *Cellular microbiology*. –2010. – №12. – P. 148–157.
140. Miller E. H., Obernosterer G., Raaben M., Herbert A. S., Deffieu M. S., Krishnan A., Ndungo E., Sandesara R. G., Carette J. E., Kuehne A. I. Et al.. Ebola virus entry requires the host-programmed recognition of an intracellular receptor // *EMBO J.* – 2012. – V.31. – №8. – P. 1947-60
141. Côté M., Misasi J., Ren T., Bruchez A., Lee K., Filone C. M., Hensley L., Li Q., Ory D., Chandran K., Cunningham J.. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection // *Nature*. – 2011. – V.477. – №7364. – P. 344-8.
142. Wang H., Shi Y., Song J., Qi J., Lu G., Yan J., Gao G.F.. Ebola Viral Glycoprotein Bound to Its Endosomal Receptor Niemann-Pick C1 // *Cell*. –2016. – V.164 – №1–2. – P. 258-268
143. Li, X., Saha, P., Li, J., Blobel, G. & Pfeffer, S. R. Clues to the mechanism of cholesterol transfer from the structure of NPC1 middle luminal domain bound to NPC2 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2016. – V. 113. – №36. – P. 10079–10084.
144. McMullan L. K., Flint M., Dyal J., Albarino C., Olinger G. G., Foster S., et al. The lipid moiety of brincidofovir is required for in vitro antiviral activity against Ebola virus // *Antiviral research*. – 2016. – №125. – P. 71–78.
145. Reid A. H., Fanning T. G , Hultin J. V., Taubenberger J.K. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1999. – V.96 – № 4. – P. 1651–6.

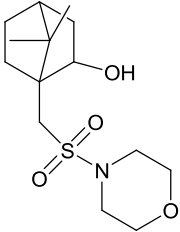
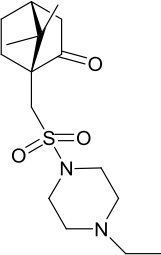
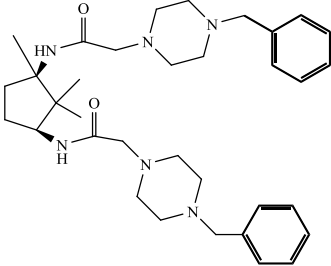
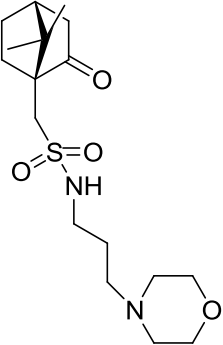
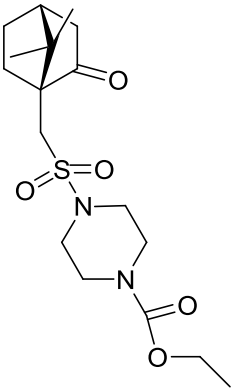
146. Glaser L., Stevens J., Zamarin D., Wilson I. A., García-Sastre A., Tumpey T. M., Basler C. F., Taubenberger J. K., Palese P. A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity // *J Virol.* – 2005. – V. 79. – N 17. – P.11533-11536.
147. Tsai C., Caillet C., Hu H., Zhou F., Ding H., Zhang G., Zhou B., Wang S., Lu S., Buchy P., Deubel V., Vogel F. R., Zhou P. Measurement of neutralizing antibody responses against H5N1 clades in immunized mice and ferrets using pseudotypes expressing influenza hemagglutinin and neuraminidase // *Vaccine.* – 2009. – V. 12. – № 27. – P. 6777–6790
148. Wang H. L., Jiang C. Yu. Influenza A virus H5N1 entry into host cells is through clathrin-dependent endocytosis // *Science in China Series C: Life Sciences.* – 2009. – V. 52. – № 5. – P. 464–469.
149. Wang W., Xie H., Ye Z., Vassell R., Weiss C. D.. Characterization of lentiviral pseudotypes with influenza H5N1 hemagglutinin and their performance in neutralization assays // *J. Virol Methods.* – 2010. – V.165. – № 2. – P. 305-310.
150. Xu S., Zhou J., Liu K., Liu Q., Xue C., Li X., Zheng J., Luo D., Cao Y. Mutations of two transmembrane cysteines of hemagglutinin (HA) from influenza A H3N2 virus affect HA thermal stability and fusion activity // *Virus Genes.* – 2013. – V. 47. – № 1. – P. 20-26.
151. Cohen F. S., Melikyan G. B. Methodologies in the Study of Cell–Cell Fusion // *Methods.* – 1998. – V. 16 – № 2. – P.215-226.
152. Chutinimitkul S., S. Herfst, J. Steel, A.C .Lowen, J. Ye, D. van Riel, E.J. Schrauwen, T.M. Bestebroer, B. Koel, D.F. Burke, K.H. Sutherland-Cash, C.S .Whittleston, C.A. Russell, D.J .Wales, D.J. Smith, M. Jonges, A. Meijer, M. Koopmans, G.F. Rimmelzwaan, T. Kuiken, A.D. Osterhaus, A. Garcia-Sastre, D.R .Perez, R.A. Fouchier. Virulence-associated substitution D222G in the hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus affects receptor binding // *J. Virol.* – 2010. – № 84. – P.11802–11813.
153. Zhang W., Y. Shi, J. Qi, a F. Gao, Q. Li, Z. Fan, J. Yan, G. F. Gaoa. Molecular Basis of the Receptor Binding Specificity Switch of the Hemagglutinins from both the 1918 and 2009 Pandemic Influenza A Viruses by a D225G Substitution. // *J Virol.* – 2013. – V.87. – N.10. – P. 5949-58.
154. Su Y., Zhu X., Wang Y., Wu M., Tien P. Evaluation of Glu11 and Gly8 of the H5N1 influenza hemagglutinin fusion peptide in membrane fusion using pseudotype virus and reverse genetics // *Arch Virol.* – 2008. – V. 153. – № 2. – P. 247-57.

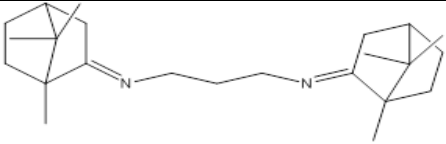
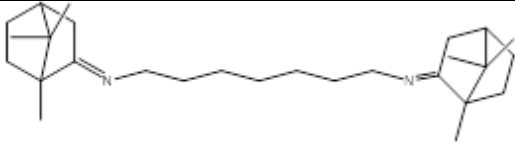
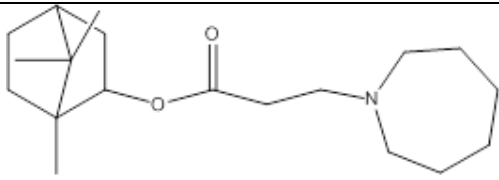
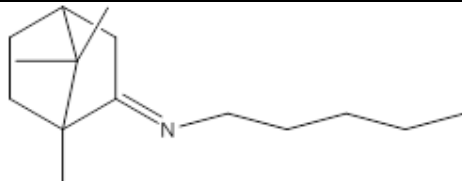
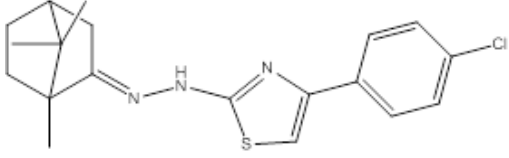
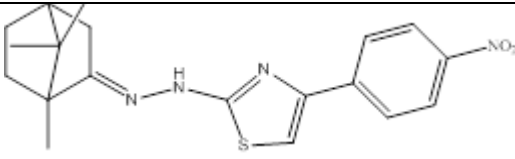
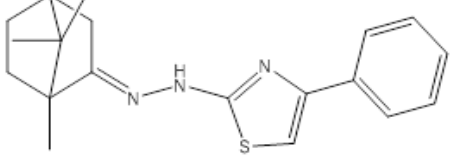
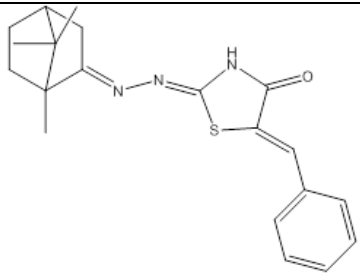
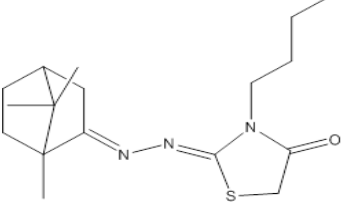
155. Ellens H., Bentz J., Mason D., Zhang F., White J. M. Fusion of influenza hemagglutinin-expressing fibroblasts with glycophorin-bearing liposomes: role of hemagglutinin surface density // *Biochemistry*. – 1990. – V. 29. – № 41. – P. 9697-9707.
156. Sokolova A. S., Yarovaya O. I., Shtro A. A., Borisova M. S., Morozova E. A., Tolstikova T. G., Zarubaev V. V., Salakhutdinov N. F. Synthesis and biological activity of heterocyclic borneol derivatives // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. – 2017. – V. 53. – № 3 – P.371-377
157. Ogino M., Ebihara H., Lee B. H., Araki K., Lundkvist A., Kawaoka Y., Yoshimatsu K., Arikawa J.. Use of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing hantaan or seoul virus envelope proteins in a rapid and safe neutralization test // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2003. – V. 10. – № 1. – P. 154–160.
158. Talekar A., Pessi A., Glickman F., Sengupta U., Briese T., Whitt M. A., Mathieu C., Horvat B., Moscona A., Porotto M.. Rapid screening for entry inhibitors of highly pathogenic viruses under low-level biocontainment. // *PLoS One*. – 2012. – V. 7. –№3. – P.e30538.
159. Tamura K., Oue A., Tanaka A., Shimizu N., Takagi H., Kato N., Morikawa A., Hoshino H.. Efficient formation of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing the native forms of hepatitis C virus envelope proteins detected after sonication // *Microbes Infect.* – 2005. – №7. – P. 29–40.
160. Rogalin H. B., Heldwein E. E. Characterization of vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing essential entry glycoproteins gB, gD, gH, and gL of herpes simplex virus 1 // *J. Virol.* – 2016. – № 90. – P. 10321–10328.
161. Yao L., Korteweg C., Hsueh W., Gu J. Avian influenza receptor expression in H5N1-infected and noninfected human tissues // *Faseb J.* – 2008. – V. 22. – P. 33–740
162. Ng Y. P., Lee S. M., Cheung T. K., Nicholls J. M., Peiris J. S., Ip N. Y.: Avian influenza H5N1 virus induces cytopathy and proinflammatory cytokine responses in human astrocytic and neuronal cell lines // *Neuroscience*. – 2010. – № 168. – P. 613-623.
163. Lee S. M., Dutry I., Peiris J. S. Editorial: macrophage heterogeneity and responses to influenza virus infection // *J Leukoc Biol.* – 2012. – V. 92 – №1. – P. 1-4.
164. Cline T. D., Karlsson E. A., Seufzer B. J., Schultz-Cherry S.. The hemagglutinin protein of highly pathogenic H5N1 influenza viruses overcomes an early block in the replication cycle to promote productive replication in macrophages // *J Virol.* – 2013. – №87. – P. 1411– 1419.

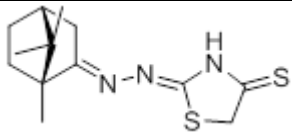
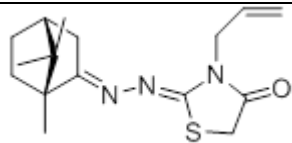
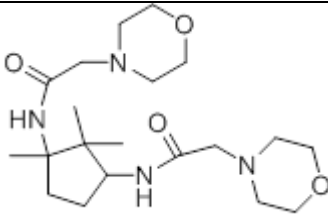
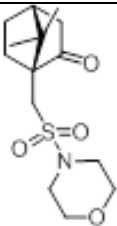
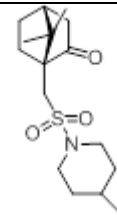
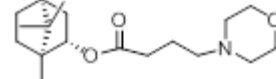
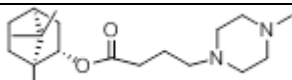
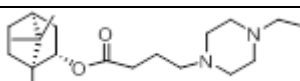
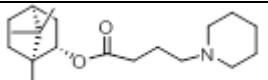
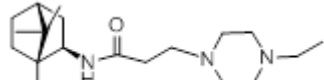
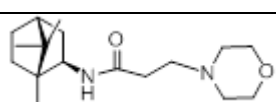
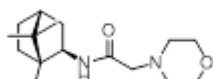
165. Lersritwimanmaen P., Na-Ek P., Thanunchai M., Thewsoongnoen J., Sa-Ard-Iam N., Wiboon-Ut S, Mahanonda R, Thitithanyanont A. The presence of monocytes enhances the susceptibility of B cells to highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 virus possibly through the increased expression of $\alpha 2,3$ SA receptor // *Biochem Biophys Res Commun.* – V.464. – № 3. – P. 888-93.
166. Hoeve M. A., Nash A.A., Jackson D., Randall R.E., Dransfield I. Influenza virus A infection of human monocyte and macrophage subpopulations reveals increased susceptibility associated with cell differentiation // *PLoS One.* – 2012. – V. 7.– №1. – P.e29443.
167. Guo, Y.; Emily, R. B.; Wang, J. Z.; Xiao, H. X.; Yu, J.; Wang, J. W.; Guo, L.; George, F. G.; Cao, Y. J.; Michael, C.; Rong, L. J. Analysis of hemagglutinin-mediated entry tropism of H5N1 avian influenza // *Viol. J.* – 2009- 6, 10.1186/1743-422X-6-39
168. Porotto M., Orefice G., Yokoyama C.C., Mungall B. A., Realubit R., Sganga M.L., Aljofan M., Whitt M., Glickman F., Moscona A.. Simulating henipavirus multicycle replication in a screening assay leads to identification of a promising candidate for therapy // *J Virol* – 2009. – № 83. – P. 5148–5155.
169. Picazo E., Giordanetto F. Small molecule inhibitors of ebola virus infection. *Drug Discov. Today.* – 2015. – V.20. – №2. – P. 277–286.
170. Daelemans D., Pauwels R., De Clercq E., Pannecouque C. A time-of-drug addition approach to target identification of antiviral compounds // *Nat Protoc.* – 2011. – V.6. – №6. – P. 925-33.
171. Laconi S., Madeddu M. A., Pompei R. Study of the Biological Activity of Novel Synthetic Compounds with Antiviral Properties against Human Rhinoviruses // *Molecules.* – 2011. – №16. – P. 3479–3487.

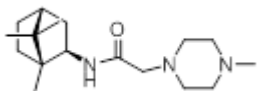
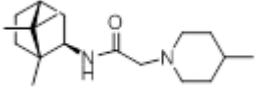
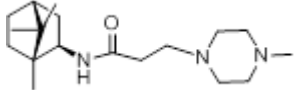
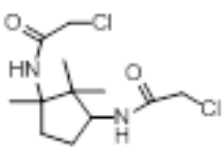
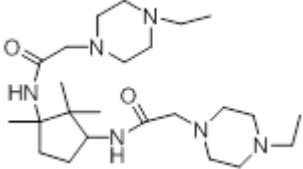
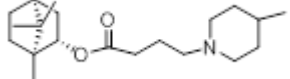
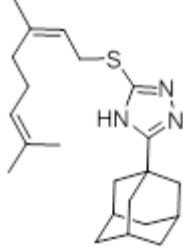
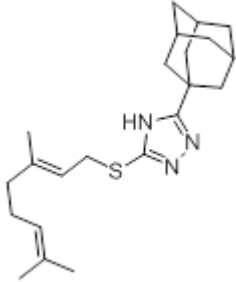
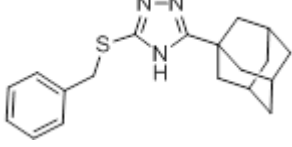
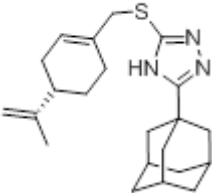
Приложение

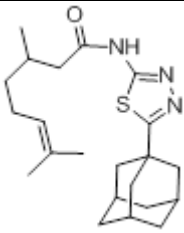
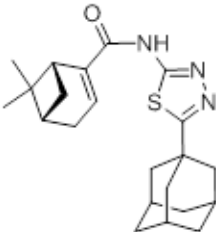
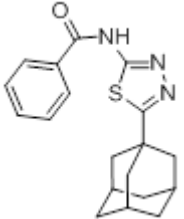
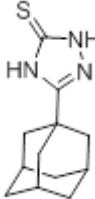
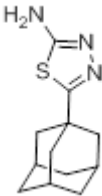
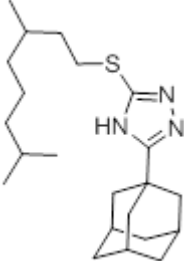
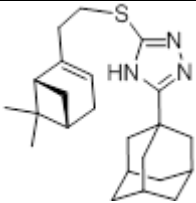
Список некоторых оригинальных веществ со структурной формулой, активностью в отношении трех псевдовирусов и 50% токсической концентрацией

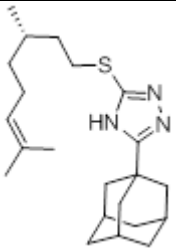
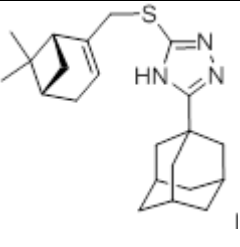
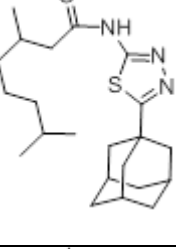
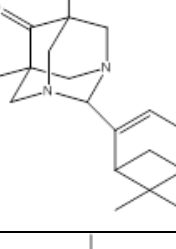
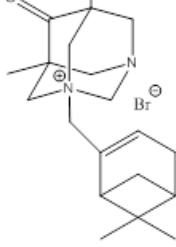
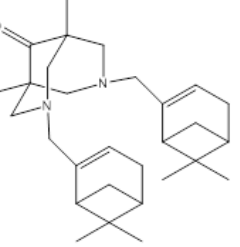
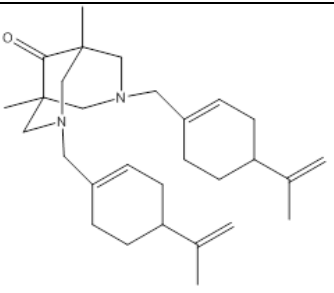
Структурная формула	IC ₅₀ _{VSV-MarvGP} , мкМ	IC ₅₀ _{VSV-H5N1} , мкМ	IC ₅₀ _{VSV-G} , мкМ	CC ₅₀ , мкМ
	>25	>25	>25	>500
	>25	>25	>25	>500
	>25	>25	>25	>500
	>25	>25	>25	>500
	>25	>25	>25	>500

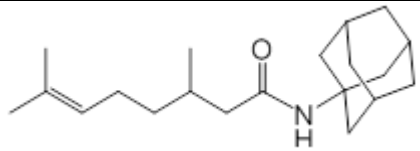
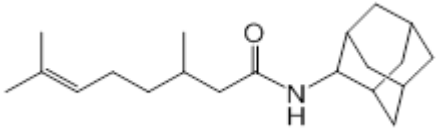
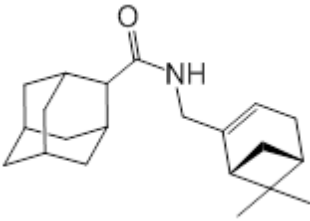
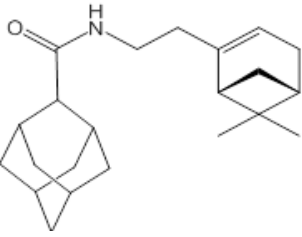
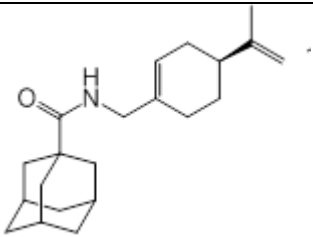
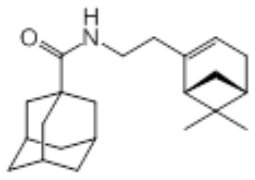
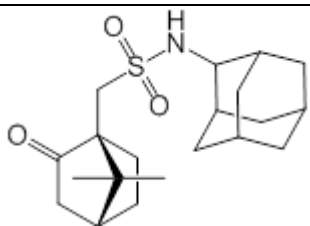
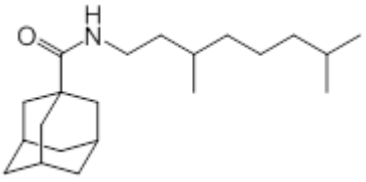
	>25	>25	>25	420
	>25	>25	>25	>500
	>25	>25	>25	380
	>25	>25	>25	>500
	>25	>25	>25	>250
	>25	>25	>25	>500
	16±1	15±2	12±1	179±8
	>25	>25	>25	>500
	>25	>25	>25	>200

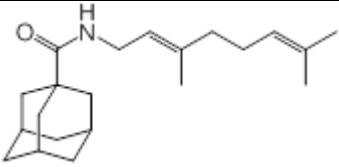
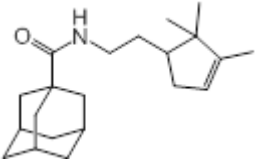
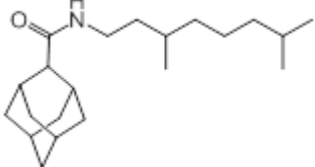
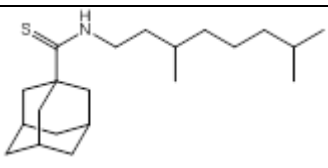
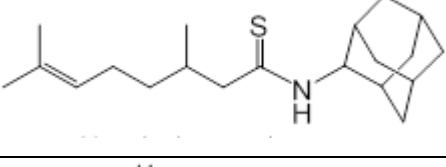
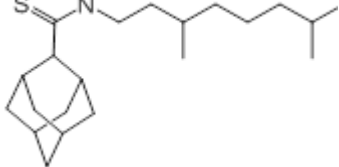
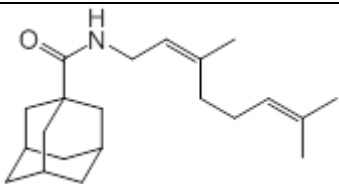
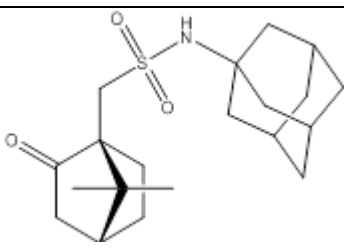
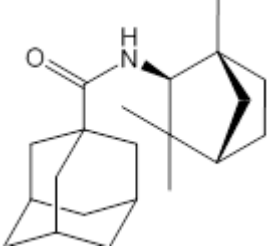
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	н/о	>25	>200
	>25	н/о	>25	>200
	18±3	21±2	20±2	172±6
	н/о	21±3	15±1	140±5
	21±0	14±2	20±2	190±5
	>25	>25	>25	200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200

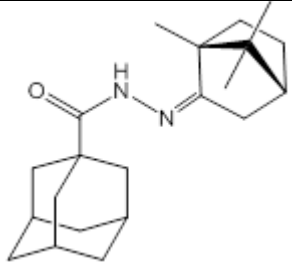
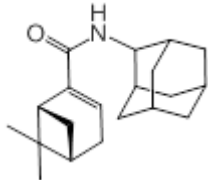
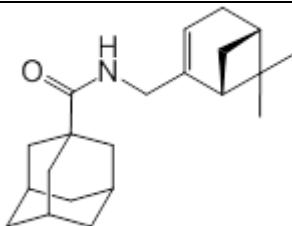
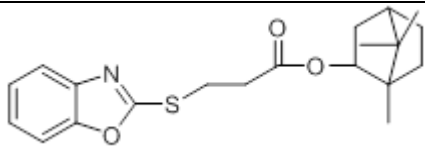
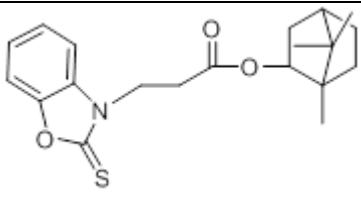
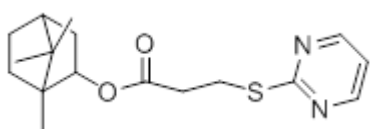
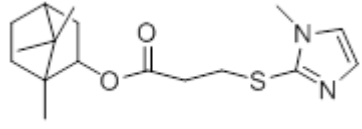
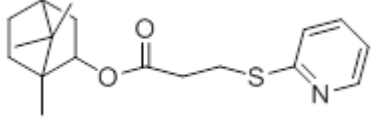
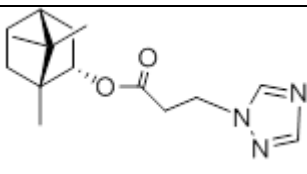
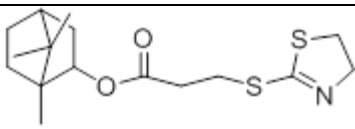
	>25	>25	>25	>200
	13±1	15±2	15±1	89
	>25	>25	>25	>200
	>20	>20	>20	110
	24±4	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	230
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200

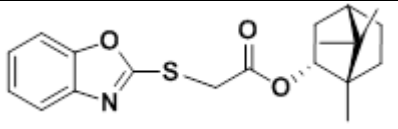
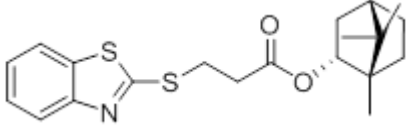
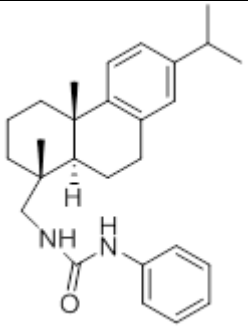
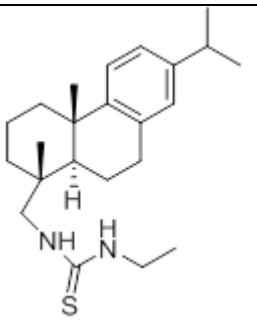
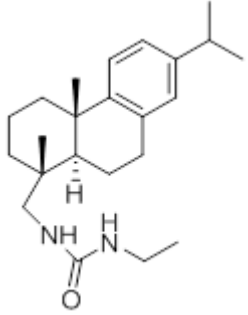
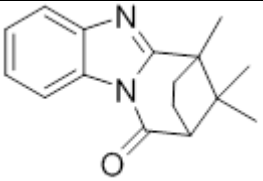
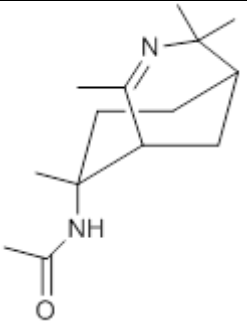
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200

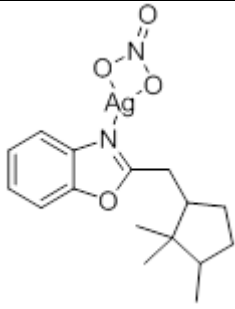
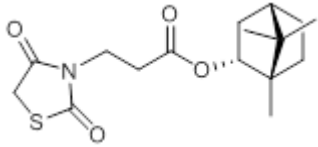
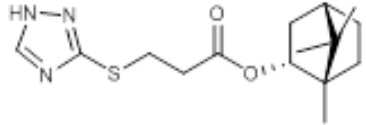
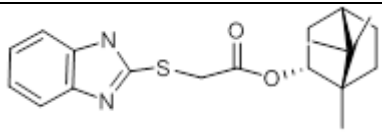
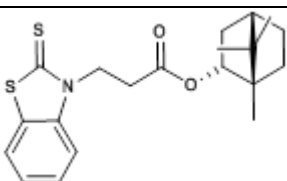
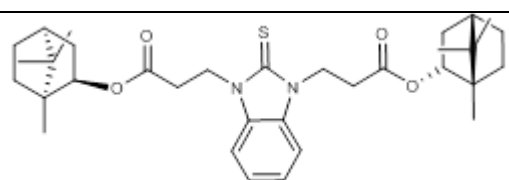
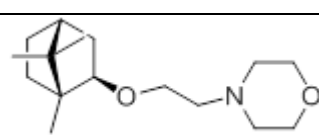
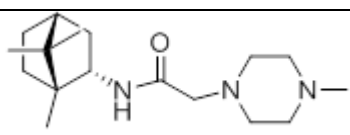
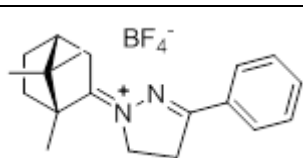
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200

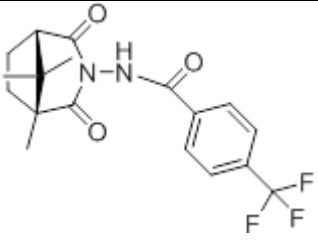
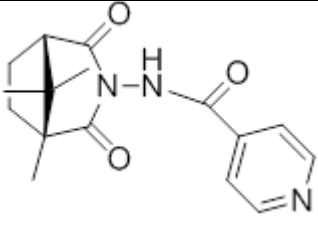
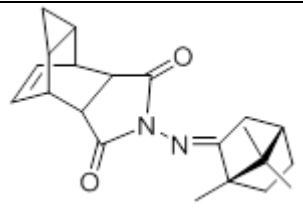
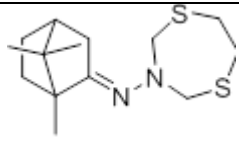
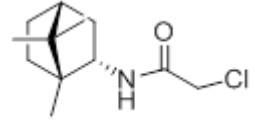
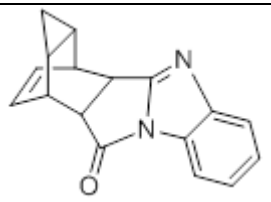
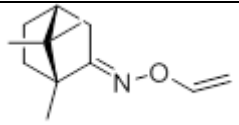
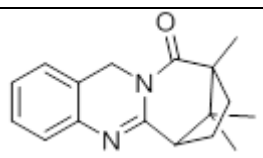
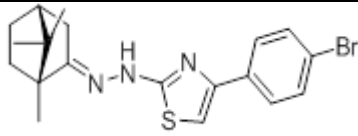
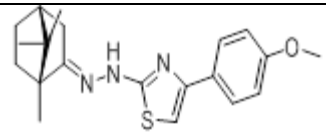
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200

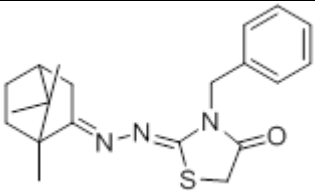
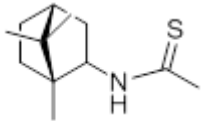
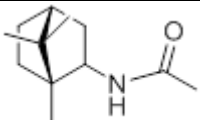
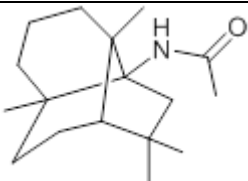
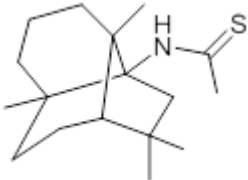
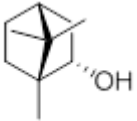
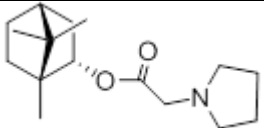
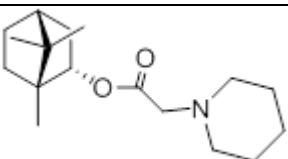
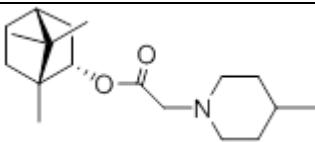
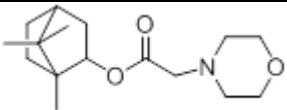
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200

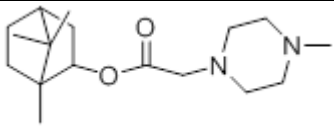
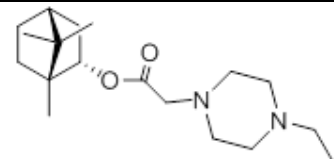
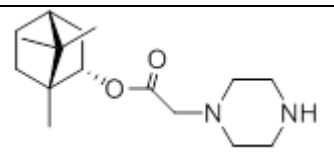
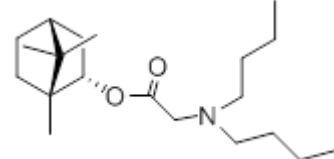
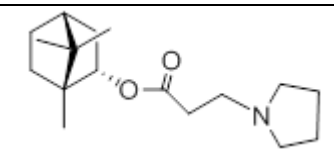
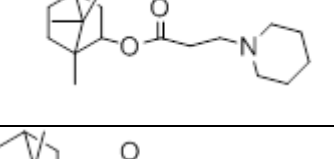
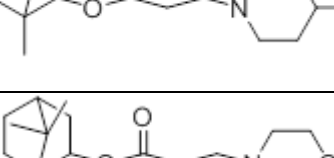
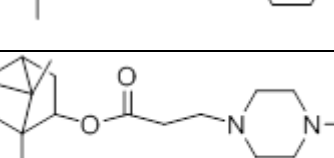
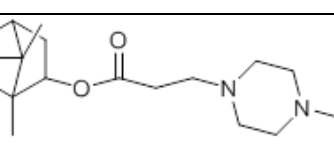
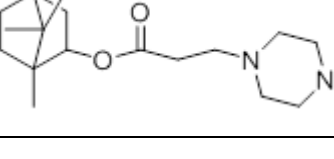
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200

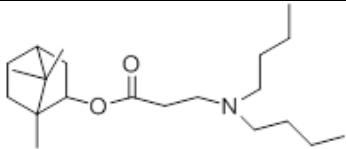
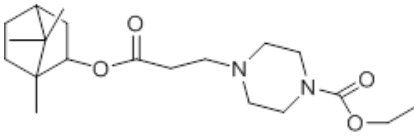
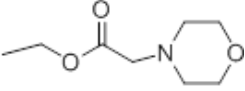
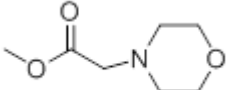
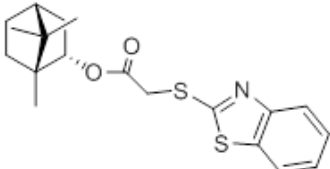
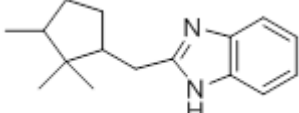
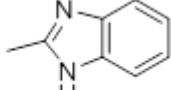
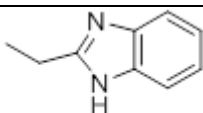
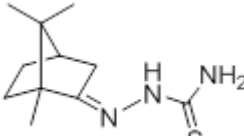
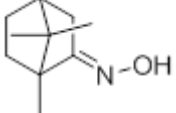
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>500
	>25	>25	>25	>500
	6±1	н/о	8±1	52±2
	42±2	н/о	65±3	380±5
	>100	>100	>100	>500

	4±0	н/o	10±0	31±1
	>25	>25	>25	>250
	>25	>25	>25	>250
	>25	>25	>25	>250
	>25	>25	>25	>250
	>25	>25	>25	>250
	>25	>25	>25	>250
	>25	>25	>25	>250
	>25	>25	>25	>250

	>25	>25	>25	>250
	21±1	26±2	>30	150±3
	>25	>25	>25	>>50
	>25	>25	>25	>50
	>25	>25	>25	>50
	>25	>25	>25	>150
	>25	>25	>25	>150
	>25	>25	>25	>150
	>25	>25	>25	>150
	>25	>25	>25	>150

	>25	>25	>25	>150
	>25	>25	>25	>150
	>50	>50	>50	>150
	>50	>50	>50	250
	>50	>50	>50	>150
	263±3	>300	>650	>3000
	52±5	n/o	239±19	480±25
	86±11	n/o	102±9	321±33
	28±2	n/o	77±16	240±18
	263±24	298±14	267±10	1279±14

	47±3	н/о	187±24	637±18
	29±2	н/о	447±15	859±21
	20±1	н/о	69±13	361±7
	11±1	17±2	20±1	73±5
	12±1	н/о	29±6	684±67
	9±1	н/о	121±7	302±23
	4±1	н/о	79±9	215±25
	78±7	н/о	257±12	406±33
	19±1	н/о	318±23	421±4
	10±2	н/о	106±5	474±29
	10±2	н/о	102±25	207±9

	6±1	52±3	48±2	86±4
	22±3	29±1	23±1	75±2
	>700	>700	>500	>3000
	>700	>700	>1000	>3000
	39±1	84±2	88±3	623±8
	21±1	15±1	31±1	196±4
	>100	>100	>100	>500
	>100	>100	>100	>500
	>25	>25	>25	>200
	>25	>25	>25	>200