

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

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск - 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (Новосибирский государственный университет, НГУ)

Научный руководитель:

Покровский Андрей Георгиевич, д. м. н, член-корр. РАН.

Официальные оппоненты:

Локтев Валерий Борисович, д. б. н., профессор, Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, зав. Отделом

Шестопалов Александр Михайлович, д. б. н., профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», зав. лабораторией

Коваль Ольга Александровна, к. б. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, с.н.с.

Защита состоится 18 сентября 2020 г. в 12 часов

на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 при

Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу:

630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан 17 августа 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н., доцент



Коваль В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Несмотря на то, что в последнее время наблюдается значительный прогресс в разработке противовирусных 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 – токсичностью, недостаточной селективностью, короткой продолжительностью 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 соблюдением ряда требований биобезопасности, что доступно лишь ограниченному числу лабораторий, получение адекватной модельной тест – системы позволит более широкому кругу исследователей производить поиск потенциальных противовирусных агентов. Так, были разработаны модели, воспроизводящие отдельные аспекты вирусной физиологии, в том числе, на основе псевдовирусов, но позволяющие избежать необходимости контакта исследователя с возбудителями особо опасных инфекций.

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. Начальные стадии инфекции, включающие в себя связывание с рецептором(ами), слияние вирусной и клеточной мембран, с последующим высвобождением вирусного капсида в цитозоль, определяется вирусными поверхностными белками, что позволяет использовать в поиске ингибиторов данных стадий инфекции 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 псевдовирусов 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 высокопатогенных вирусов, так как работа с псевдовирусами может осуществляться в лабораториях класса BSL-2, и, по классификации, используемой в РФ, соответствует лабораториям для работы с патогенами III-IV групп.

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

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

В ходе работы необходимо было решить следующие задачи:

- Сконструировать и получить препараты рекомбинантного вируса везикулярного стоматита (pVVC), 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 многоцикловоу инфекции pVVC 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 одноцикловоу инфекции псевдовирюсов pVVC с поверхностными белками вируса гриппа H5N1 и псевдовирюса с поверхностным белком вируса Марбург.

Научная новизна полученных результатов и практическая значимость. В работе впервые описан метод получения рекомбинантных вирусных частиц 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, и предоставляет возможность оценивать эффективность кандидатных препаратов до начала их тестирования с помощью инфекционных вирусных изолятов, а также изучать механизмы действия веществ с уже выявленной противовирусной активностью, что имеет высокую научную и практическую значимость. В заключительной части работы с использованием описанной системы была впервые испытана противовирусная активность группы соединений на основе природных

терпеноидов. Выявлены соединения, специфически подавляющие инфекцию псевдовируса с поверхностным гликопротеином вируса Марбург и показано, что эти соединения действуют на ранних стадиях псевдовиральной инфекции, опосредованных этим гликопротеином.

Положения, выносимые на защиту:

- Получены псевдовиральные препараты рВВС, экспрессирующего на своей мембране поверхностные белки вируса гриппа H5N1.
- Показано, что инфекционность полученных псевдовирусов обусловлена именно поверхностными белками вируса гриппа H5N1 – гемагглютинином и нейраминидазой. Обнаружено, что трансдуцирующая способность псевдовирусов с поверхностными белками вируса гриппа H5N1 зависит от нейраминидазы, функционирующей на стадии продукции псевдовируса. Предложенные псевдовирусы могут быть использованы для поиска и описания потенциальных противовирусных средств, действующих на стадиях инфекции, обуславливаемых гемагглютинином и/или нейраминидазой вируса гриппа.
- Среди N-содержащих гетероциклических производных терпенового спирта борнеола обнаружены соединения, блокирующие начальные стадии инфекции псевдовируса, псевдотипированного поверхностным белком вируса Марбург, по эффективности сравнимые с ранее описанными ингибиторами филовиральных инфекций.

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Получение псевдовиральных препаратов и определение их трансдуцирующей активности

Были получены псевдовиралы на основе лентивирусного капсида и на основе капсида рекомбинантного вируса везикулярного стоматита (pVBS). В качестве псевдотипирующих белков, изначально использовался гликопротеин G VBS, а также поверхностные белки вируса гриппа - гемагглютинин H5 вируса гриппа изолятов A/Egypt/N04395/2009 в комбинации с нейраминидазой N1 изолятов A/Thailand/(KAN-1)/2004/H5N1 или A/Russia/01/2009(H1N1).

В качестве клеток-продуцентов псевдовиралов использовалась линия клеток 293 FT – производные линии эмбриональных клеток почки человека HEK 293.

В данной работе термины «трансдуцирующий титр», «трансдуцирующая активность», «трансдуцирующая способность» используются как синонимы для обозначения эффективности доставки репортерного гена в клетки-мишени при их заражении псевдовиралами.

Псевдотипы на основе лентивирусного капсида были получены в результате совместной трансфекции клеток-продуцентов плазмидой поверхностного белка (pMD2.G, кодирующей ген гликопротеина G VBS или плазмидами, кодирующими гены поверхностных белков вируса гриппа – гемагглютинин и нейраминидазу), упаковочной psPAX2, и репортерной плазмидой pHIV-luciferase, кодирующей ген люциферазы светлячка. Наличие в геноме псевдовирала репортерного гена люциферазы позволяет регистрировать люминесцентный сигнал при трансдукции псевдовиралом клеток-мишеней. В качестве клеток – мишеней использовали эмбриональных клеток почки человека HEK 293.

Псевдотипы на основе pVBS – VSV-ΔG-G*, где G* - поверхностные белки гетерологичных вирусов, - получали путем сочетанной трансфекции клеток-продуцентов плазмидами экспрессии вирусных поверхностных белков с инфицированием клеток VSV-ΔG-G, где G – собственный гликопротеин G VBS.

VSV-ΔG-G представляет собой репликационно-дефектный VBS, в геноме которого удален ген гликопротеина G и на его место вставлен репортерный ген люциферазы светлячка или ген красного флуоресцентного белка dsRed (Рис. 1).

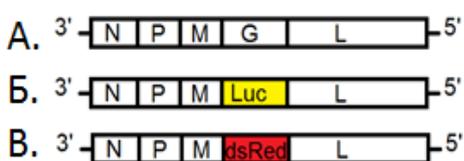


Рис. 1. Геном VBS и VSV-ΔG-G*. А - геном VBS; Б и В - геном VSV-ΔG-G*, в котором удален ген поверхностного гликопротеина G, вставлен ген люциферазы (Б) и красный флуоресцентный белок dsRed (В).

В качестве отрицательного контроля, характеризующего трансдукцию клеток-мишеней псевдовирусом, не экспрессирующим на своей мембране никакой поверхностный белок («голый капсид»), использовался псевдовиральный препарат, полученный при трансфекции клеток-продуцентов плазмидой bGal, экспрессирующей ген бета-лактамазы beta-Gal и не кодирующей никакого поверхностного белка, с последующей инфекцией клеточного монослоя тем же количеством VSV-ΔG-G, используемым при получении псевдотипов VSV-ΔG-G*.

Поскольку при инфицировании клеток-мишеней одинаковыми объемами псевдовиральных препаратов VSV-ΔG-G* и соответствующих псевдолентивирусов, для первых интенсивность люминесцентного сигнала была выше (Таблица 1), для дальнейшей работы была выбрана система на основе рВВС.

Таблица 1. Сравнительная эффективность трансдукции клеток-мишеней псевдовирусами на основе капсида лентивируса и капсида рВВС.

Псевдотипирующие белки (G*)	Лентивирусный капсид, ОЛЕ	рВВС, 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 данной работе используются рВВС с транسخеном люциферазы светлячка и транسخеном красного флуоресцентного белка dsRed.

Трансдуцирующий титр полученных псевдовиральных препаратов определялся модифицированным методом бляшкообразования. Клетки почки зеленой мартышки линии Vero трансфицировали плазмидой pIp-VSVG, содержащей ген поверхностного гликопротеина G BBC, затем инкубировали с VSV-ΔG-G* в серии десятикратных разведений и заливали 0,9% раствором агарозы. Подсчет образовавшихся бляшек проводили на следующий день. «Титр» частиц в полученном псевдовиральном препарате, выраженный в бляшкообразующих единицах (БОЕ) на мл, рассчитывали по формуле:

«Титр» = сумма средних арифметических количества бляшек в каждом разведении / объем заражающей дозы × (сумма разведений псевдовирусоносительного материала).

Титр псевдовирусов VSV-ΔG-H5N1 составлял в среднем порядка 10^9 БОЕ/мл.

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 псевдовирюсов для количественного анализа действия противовирусных средств, важно установить диапазон доз псевдовирюсного препарата, в котором сохраняется линейность люминесцентного сигнала. Для определения диапазона линейности люминесцентного сигнала клетки-мишени заражали различными дозами псевдовирюсов ($0,5 - 10 \times 10^7$ 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 псевдовирюсом с поверхностными белками вируса гриппа, превышал отрицательный контроль (люминесцентный сигнал, детектируемый при заражении клеток-мишеней псевдовирюсом без поверхностного белка) от 3 до 1500 раз в зависимости от дозы псевдовирюса, что свидетельствует о высокой трансдуцирующей активности полученного псевдовирюса. С увеличением количества псевдовирюса в выбранном диапазоне доз, люминесцентный сигнал возрастал линейно (Рис. 2).

Таким образом, удовлетворяя условиям линейной зависимости сигнала люциферазы от дозы псевдовирюса 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.

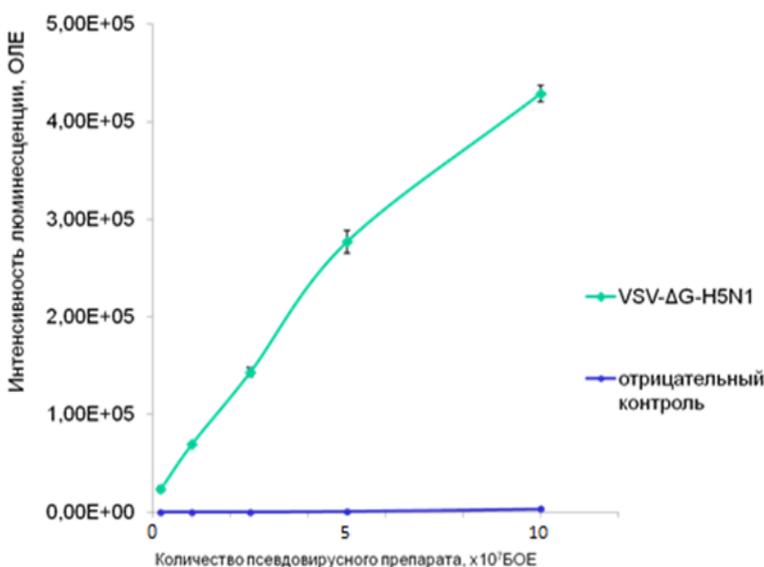


Рис. 2. Трансдуцирующая активность псевдовирюса VSV-ΔG-H5N1, экспрессирующего гемагглютинин H5(A/Egypt/N04395/2009/H5N1) и нейраминидазу N1(A/Hamburg/05/2009/H1N1). Клетки линии HEK293 заражали различными дозами псевдовирюсного препарата, люминесценцию зараженных клеток оценивали через 24 часа после инфекции. Отрицательный контроль – псевдовирюс без поверхностных белков.

На основе pVBS были получены псевдовирюсы, экспрессирующие на своей мембране гемагглютинин H5 в комбинации с другими нейраминидазами N1 вируса гриппа (Таблица 2). Такой же подход использовался для получения VSV-ΔG-MarV - pVBS, псевдотипированного поверхностным гликопротеином вируса Марбург.

Таблица 2. Псевдовirusы VSV-ΔG-G*, полученные в ходе данной работы, G*-поверхностные белки.

Условное обозначение	Псевдотипирующие белки (G*)
VSV-ΔG-H5N1(Kan)	H5 (A/Egypt/N04395/2009/H5N1) + N1 (A/Thailand/(KAN-1)/2004/H5N1)
VSV-ΔG-H5N1(Hamburg)	H5 (A/Egypt/N04395/2009/H5N1) + N1 A/Hamburg/05/2009/H1N1
VSV-ΔG-H5N1(California)	H5 (A/Egypt/N04395/2009/H5N1) + N1 A/California/27/2009/H1N1
VSV-ΔG-H5N1 (Thailand+Russia)	H5 A/Thailand/1(KAN-1)/2004/H5N1 + N1 A/Russia/01/2009(H1N1)
VSV-ΔG-H5	H5 (A/Egypt/N04395/2009/H5N1) Без нейраминидазы
VSV-ΔG- MarV	GP вируса Марбург, штамм Musoke
VSV-ΔG-G	G вируса везикулярного стоматита
VSV-ΔG - отрицательный контроль	Без поверхностных белков

Для псевдовirusных препаратов VSV-ΔG-MarV и VSV-ΔG-G также был определен диапазон линейности люциферазного сигнала. (Рис. 3).

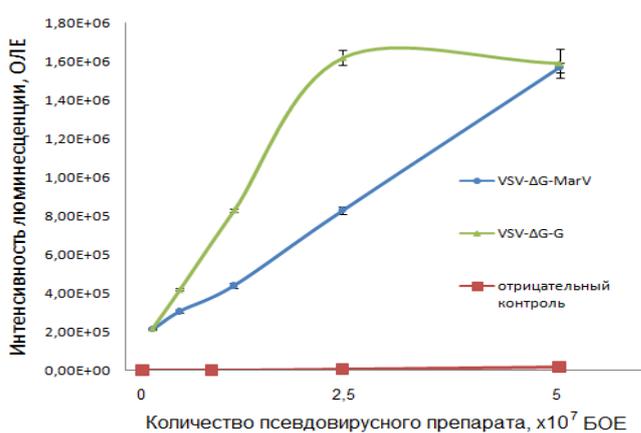


Рис. 3. Трансдуцирующая активность псевдовirusов VSV-ΔG-MarV и VSV-ΔG-G.

Клетки линии HEK293 заражали различными дозами псевдовirusного препарата, люминесценцию зараженных клеток оценивали через 24 часа после инфекции. Отрицательный контроль – псевдовirus без поверхностных белков.

В то время как для VSV-ΔG-MarV люминесцентный сигнал возрастает пропорционально возрастанию дозы псевдовirusа, при заражении клеток-мишеней VSV-ΔG-G дозой больше $2,5 \times 10^7$ БОЕ, люминесцентный сигнал выходит на плато.

Таким образом, оба метода - определение экспрессии репортерного гена в клетках-мишенях и модифицированный метод бляшкообразования - показали, что полученные псевдовirusы с поверхностными белками вируса гриппа H5N1 обладают высокой трансдуцирующей способностью, а линейность люминесцентного сигнала в широком (выбранном) диапазоне доз псевдовirusа свидетельствует о возможности использования полученных псевдовirusов для описания количественных характеристик противовirusных средств.

2. Трансдуцирующая активность псевдовirusов, экспрессирующих различные типы нейраминидазы

Для изучения влияния нейраминидазы на трансдуцирующую способность псевдовирального препарата рВВС, были получены псевдовirusы, сочетающие гемагглютинин H5(Egypt) с тремя различными типами нейраминидаз (таблица 2), а также псевдовirusы, экспрессирующие на своей поверхности только гемагглютинин (без нейраминидазы). В качестве отрицательного контроля использовали псевдовirus, не имеющий поверхностных белков.

Показано, что полученные псевдовirusные препараты, отличающиеся только типом NA, 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, соответственно. Псевдовirusы, содержащие на своей поверхности только HA, имеют титр, сравнимый с отрицательным контролем, и он на 3 порядка ниже, чем у псевдовirusов, имеющих на своей поверхности оба поверхностных белка (Рис. 4).

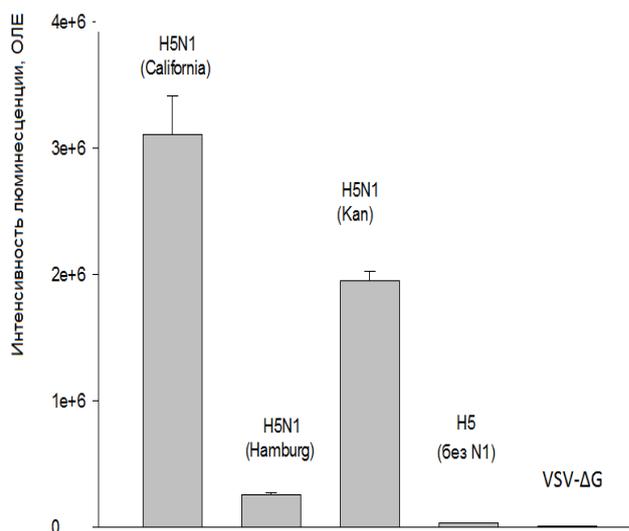


Рис. 4. Влияние нейраминидазы на трансдуцирующий титр псевдовirusного препарата. Эффективность трансдукции оценивали по активности люциферазы в клетках-мишенях HEK293, зараженных псевдовirusами VSV-ΔG-H5N1(California), VSV-ΔG-H5N1(Hamburg), VSV-ΔG-H5N1(Kan), экспрессирующими гемагглютинин H5(Egypt) и нейраминидазу N1 различных штаммов вируса гриппа H5N1, а также псевдовirusа VSV-ΔG-H5, экспрессируемы. Отрицательный контроль – псевдовirus без гемагглютинина и нейраминидазы.

Таким образом, установлено, что трансдуцирующая активности псевдовirusов, использующих гемагглютинин одного типа, определяется типом нейраминидазы, коэкспрессирующейся совместно с этим гемагглютинином. Продемонстрированная возможность оценивать трансдукционную активность «двойных» HA-NA псевдотипов, комбинируя различные варианты гемагглютинина и нейраминидазы, может использоваться для изучения инфекционных свойств различных реассортантов вируса гриппа.

3. Гемагглютинин–опосредованный характер проникновения вируса в клетку

3.1 Ингибирование псевдовirusной инфекции лизосомотропными агентами

Известно, что некоторые вирусы, в том числе, вирус гриппа проникают внутрь клетки посредством эндоцитоза, и для слияния вирусной и эндосомальной мембран

необходима кислая среда. Ингибиторы закисления эндосом/лизосом обладают противовирусной активностью в отношении многих вирусов, использующих рН-зависимый механизм проникновения в клетку, в том числе, в отношении вирусов гриппа.

Проводилась инфекция клеток – мишеней псевдовиром VSV-ΔG-H5N1(California) в присутствии ингибиторов закисления эндосом хлорида аммония (2 - 100 мМ) и хлорохина (10 - 100 мкМ) (Рис. 5). Оба вещества эффективно подавляют псевдовирусную инфекцию VSV-ΔG-H5N1 с количественными характеристиками 50 % ингибирования (IC50) равными 12 мМ и 27 мкМ для хлорида аммония (Рис. 5, А) и хлорохина (Рис. 5, Б), соответственно. Эти концентрации ингибиторов сопоставимы с данными, полученными ранее для инфекционного вируса гриппа и псевдолентивирусов, псевдотипированных H5N1, что подтверждает возможность использования псевдовиром VSV-ΔG-H5N1 вместо инфекционных вирусов гриппа при поиске противовирусных средств, действующих на этапе входа вируса в клетку-мишень.

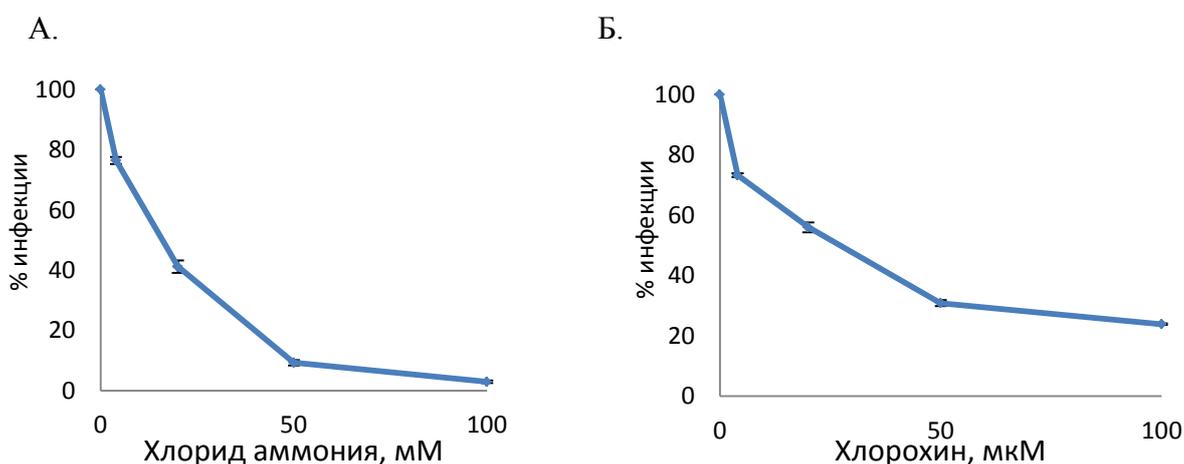


Рис. 5. Подавление псевдовирусной инфекции VSV-ΔG-H5N1(California) в клетках линии HEK293 лизосомотропными препаратами. А – подавление инфекции хлоридом аммония; Б – подавление инфекции хлорохином.

Таким образом, показано, что имеет место рН-зависимый и обусловленный эндоцитозом механизм входа псевдовirusа в клетку, характерный для опосредованного гемагглютинином гриппа инфекции.

3.2 Нейтрализация псевдовирусной инфекции моноклональными и поликлональными антителами к гемагглютинину

Для подтверждения того, что инфицирование клеток-мишеней псевдовиром VSV-ΔG-H5N1, обусловлено именно гемагглютинином H5, проводилась нейтрализация псевдовirusа VSV-ΔG-H5N1(California) специфическими моноклональными антителами и поликлональной сывороткой к H5 в сериях 10-кратных разведений и далее оценивалась инфекционность препарата. Обнаружено, что инфекционность псевдовirusного препарата

VSV-ΔG-H5N1 подавлялась дозозависимым образом как в присутствии моноклональных антител, так и в присутствии сыворотки. В то же время инфекционность псевдовируса VSV-ΔG-G, несущего поверхностный белок G BBC, оставалась 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 H5 (Рис. 6). Таким образом, можно утверждать, что инфекция клеточ-мишеней полученным псевдовирусом определяется именно активностью гемагглютинина H5, встроенного в его мембрану, а сам такой псевдовирус VSV-ΔG-H5N1 может быть использован для изучения ранних стадий инфекции вируса гриппа, опосредованных его гемагглютинином.

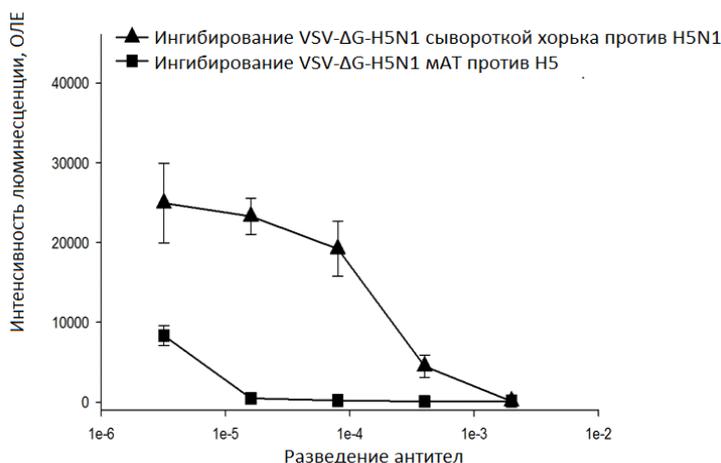


Рис. 6. Нейтрализация VSV-ΔG-H5N1(California) моноклональными антителами к гемагглютину H5 вируса гриппа и сывороткой хорька против вируса гриппа субтипа H5N1.

4. 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. Функционирование NA необходимо как на завершающих стадиях жизненного цикла вируса гриппа, т. е. при отпочковывания вириона гриппа от поверхности клетки - хозяина, так и на начальных этапах вирусной инфекции – входе вируса в клетку-мишень. Трансдуцирующая активность псевдовирусного препарата, полученного в присутствии ОК (500нМ) составляет $4.4\pm 1.1\%$ от контроля. (Рис. 7, 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 псевдовиром (Рис. 7, Б).

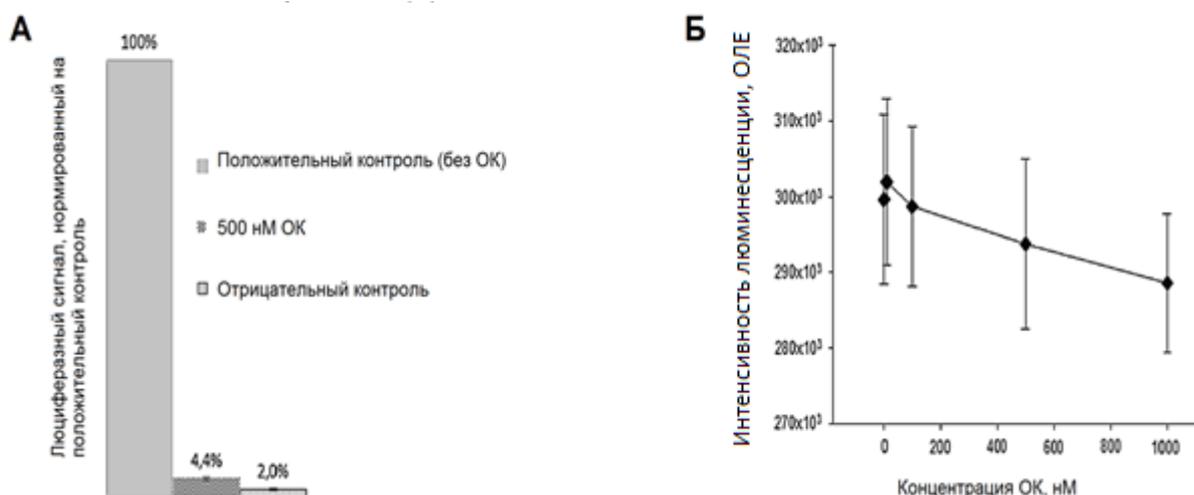


Рис. 7. Влияние озельтамивира карбоксилата (ОК) на продукцию псевдовируса VSV-ΔG-H5N1 в клетках-продуцентах и на начальные стадии псевдовиральной инфекции в клетках-мишенях. А – трансдуцирующая активность VSV-ΔG-H5N1, полученного при добавлении ОК к клеткам-продуцентам; Б- трансдуцирующая активность VSV-ΔG-H5N1 в присутствии ОК. В качестве клеток-продуцентов использовали линию клеток 293FT, в качестве клеток-мишеней - линию клеток НЕК 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.

5. Модель многоциклового псевдовиральной инфекции

Традиционно, говоря о псевдовирусах, включая VSV-ΔG-G*, как правило, подразумевается, что в клетках-мишенях они ограничены лишь одним циклом инфекции, что делает их «биологически безопасными вирусами». При исследовании противовирусных средств в экспериментах с псевдовирусами, имеющими однократный репликационный цикл, отсутствует аккумуляция ингибирующего эффекта, наблюдаемая при ингибировании инфекционных вирусов, проходящих множественные циклы реинфекций, поэтому формат многоциклового заражения 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, многоциклового псевдовиральной инфекции 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.

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- Δ G-MarV с репортерным геном красного флюоресцентного белка dsRed (Рис. 8, А) или VSV- Δ G-G (Рис. 8, Б). Клетки Vero, не экспрессирующие поверхностные белки, тоже заражали VSV- Δ G-G (Рис. 8, В).

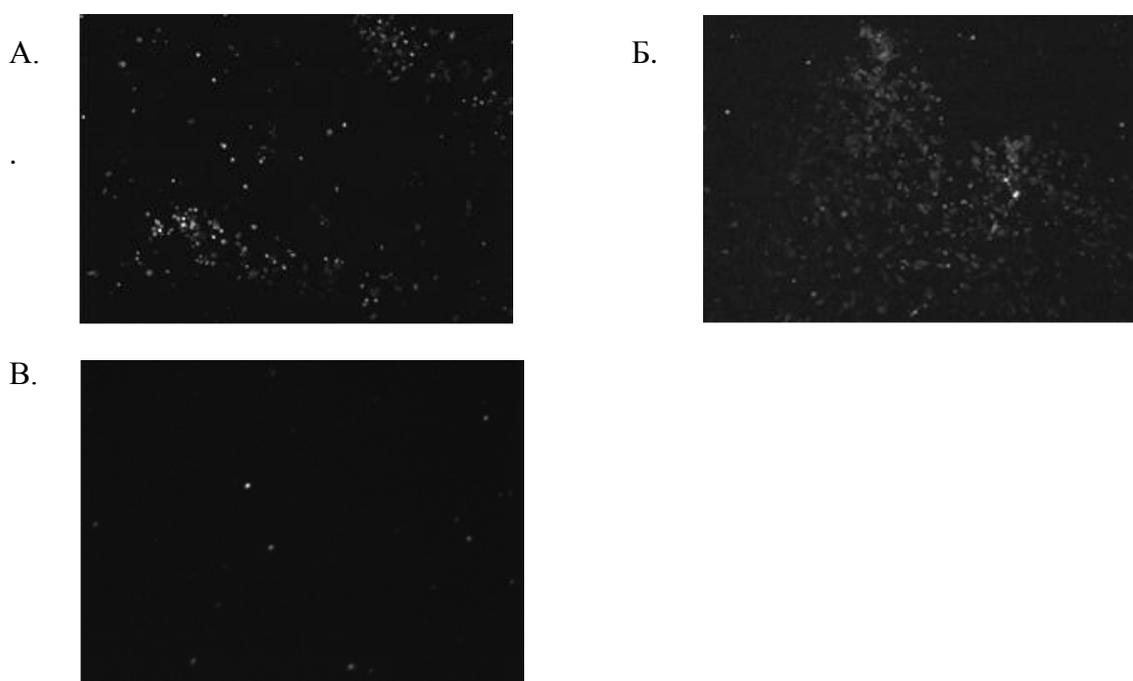


Рис. 8. Реализация многоциклового инфекции псевдовирюсов VSV- Δ G-MarV и VSV- Δ G-G в клетках линии Vero. А. Многоцикловая инфекция псевдовирюса VSV- Δ G-MarV в монослое клеток, экспрессирующих поверхностный гликопротеин вируса Марбург. Б. Многоцикловая инфекция псевдовирюса VSV- Δ G-G в монослое клеток, экспрессирующих поверхностный гликопротеин вируса G BBC. В. Одноцикловая инфекция VSV- Δ G-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- Δ G-MarV (Рис. 8, А) и VSV- Δ G-G (Рис 8, Б) в клеточном монослое. На рис. 8 В видны лишь единичные флюоресцентные клетки, что соответствует одному циклу инфекции VSV- Δ G-G.

6. Изучение противовирусной активности производных терпеноидов

С использованием псевдовирюсов на основе капсида рВВС, была исследована противовирусная активность библиотеки соединений терпенового ряда, синтезированных в Лаборатории физиологически активных веществ Новосибирского института органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН. Библиотека включает в себя полусинтетические производные моно- и дитерпенов (производные дегидроабизтиламина) и природных каркасных терпеноидов – производные камфоры, а также соединения, содержащие в своем остове природный адамантановый фрагмент и различные фармакофорные группировки. В литературе описана разнообразная биологическая активность выбранных классов соединений. Среди исследуемых соединений были, в том числе, производные камфоры, для которых ранее была показана противовирусная активность в отношении инфекционного вируса гриппа H1N1.

Для изучения действия соединений на поверхностный гликопротеин GP вируса Марбург и на гемагглютинин H5 вируса гриппа, клетки линии HEK293 заражали псевдовирюсом VSV-ΔG-MarV или, соответственно, VSV-ΔG-H5N1 (гемагглютинин H5 A/Thailand/1(KAN-1)/2004/H5N1 и нейраминидаза N1 пандемического штамма A/Russia/01/2009(H1N1)) в присутствии исследуемых веществ. Псевдовирюс VSV-ΔG-G использовался в качестве контроля ингибирования веществами псевдовирусной инфекции на стадиях, не связанных со специфическим действием поверхностных белков вируса Марбург и вируса гриппа. Для оценки активности исследуемых соединений в отношении нейраминидазы вируса гриппа, исследуемые вещества добавляли к клеткам при продукции псевдовирюсов VSV-ΔG-H5N1.

С использованием МТТ–теста была определена токсичность соединений для клеток-мишеней линии HEK 293, для каждого соединения была подсчитана концентрация, подавляющая жизнеспособность клеток на 50% по сравнению с контролем (CC50).

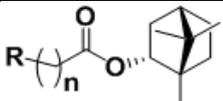
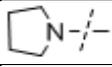
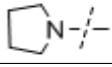
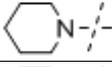
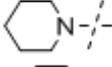
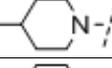
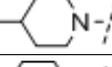
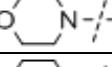
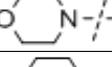
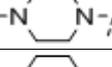
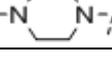
Для каждого соединения были определены полуингибирующая концентрация (IC50) в отношении VSV-ΔG-MarV, VSV-ΔG-H5N1 и VSV-ΔG-G. Далее рассчитывался индекс селективности (SI) – отношение 50%-токсической концентрации соединения и 50%-ингибирующей активности псевдовирюса (CC50/IC50) и коэффициент специфичности ингибитора (SC), представляющий собой отношение полуингибирующих концентраций для двух псевдовирюсов (IC_{MarV}50 к IC_{VSV}50 или IC_{H5N1}50 к IC_{VSV}50).

В ходе исследования не было выявлено соединений, избирательно подавляющих гемагглютинин - зависимый вход псевдовирюса VSV-ΔG-H5N1 в клетку, даже среди веществ, обладающих противовирусной активностью в отношении инфекционного вируса гриппа H1N1. Объяснением этому может быть, например, то, что данные вещества имеют

молекулярную мишень, отличную от гемагглютинина, или же, они действуют селективно на гемагглютинин Н1 и не действуют на гемагглютинин Н5. Селективных ингибиторов нейраминидазы N1 вируса гриппа также не было выявлено.

Наибольший интерес в качестве специфических ингибиторов входа вируса Марбург, представляют производные терпенового спирта борнеола. В ходе данной работы был исследован сам борнеол, а также 2 группы сложноэфирных N-гетероциклических производных борнеола, отличающихся длиной алифатической цепи между гетероциклом и сложноэфирной связью: одна CH₂ группа (соединения 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15) и две CH₂ группы (соединения 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16) (Таблица 3). В роли референсных соединений, в терапевтических концентрациях селективно подавляющих инфекцию филовирусов, выбраны блокаторы ионных каналов амиодарон и верапамил. Сам борнеол не активен ни в отношении псевдовируса с поверхностным белком вируса Марбург, ни псевдовируса с G-гликопротеином ВВС, и не является токсичным, в то время как производные этого монотерпена, содержащие N-группу обладают различной токсичностью и противовирусной активностью (Таблица 3).

Таблица 3. Специфичность и селективность производных борнеола как ингибиторов VSV-ΔG-MarV – инфекции. 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.

							
Вещество	R	n	CC50 (мкМ)	IC _{MarV} 50, (мкМ)	IC _{VSV} 50, (мкМ)	SI	SC
(-)-борнеол	-	-	>3000	203	>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
Амиодарон	-	-	2,6±0,3	2,9±0,5	>100	>50	>50

Можно выявить некоторые закономерности влияния строения гетероциклического фрагмента на свойства исследуемого вещества. Например, присоединение к борнеолу кислородсодержащего гетероцикла (7 и 8) незначительно меняет токсичность и противовирусные свойства борнеола. Токсичность незамещенных пиперазиновых производных (13 и 14) существенно выше замещенных производных. Соединения 9, 10, 11 и 12 обладают высоким SI, т.е. относительно небольшой токсичностью и высокой активностью в отношении VSV-ΔG-MarV. Соединения 8 и 9 также эффективно подавляют инфекцию контрольного псевдовируса VSV-ΔG-G, с коэффициентами специфичности SC50 равным 3 и 4, соответственно, т.е. не являются специфическими ингибиторами опосредованных поверхностным гликопротеином вируса Марбург стадий инфекции. Соединения 4, 6, 10, 11, 12 являются специфичными ингибиторами инфекции VSV-ΔG-MarV (SC>10). Кроме того, была выявлена зависимость индекса селективности полученных соединений от длины алифатической цепочки. Соединения с большей длиной цепочки оказались более активными в отношении VSV-ΔG-MarV и имели больший индекс селективности. При этом не наблюдается непосредственной связи между длиной линкера и токсичностью соединения. Вдобавок к этому, в парах 6-членных гетероциклических соединений (содержащих 1 атом азота) 3-6, изменение длины линкера повышает не только IS, но и более чем в 10 раз увеличивает специфичность ингибирования VSV-ΔG-MarV. Так, способность соединения 6 ингибировать вход псевдовируса с поверхностным гликопротеином GP вируса Марбург (IC_{MarV}50 = 4 мкмоль/мл), сравнима с активностью известных ингибиторов филовиральной инфекции – блокаторов ионных каналов амиодарона (IC50 = 2 мкмоль/мл) и верапамила (IC50 = 13 мкмоль/мл) (Таблица 3). Большая часть исследуемых соединений является сравнительно малотоксичными (SI порядка или >10). 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 MarV-GP – опосредованной инфекции ($SC > 10$). Остальные вещества, вне зависимости от их токсичности, либо подавляют обе псевдовирусные инфекции, VSV-ΔG-MarV и VSV-ΔG-G, либо вовсе не проявляют ингибирующих свойств (Таблица 3).

По длительности временного интервала, исчисляемого от начала входа вируса в клетку-мишень, в течение которого возможно добавление к клеткам, зараженным вирусом, противовирусного средства без потери его активности, можно косвенно оценить стадию вирусного жизненного цикла, в отношении которой действует данное противовирусное средство.

Производные борнеола 4, 6, 10, 12, показавшие наибольшую активность в отношении VSV-ΔG-MarV, добавляли к клеткам в концентрации, вызывающей 90% ингибирование псевдовирусной инфекции (IC₉₀), в различное время после инфекции VSV-ΔG-MarV. В качестве референсных веществ были выбраны ингибиторы заведомо известных стадий филовирусной инфекции: гепарин - ингибитор адгезии вирусов к клеткам, имипрамин - ингибитор NPC-1 –зависимого входа, рибавирин - ингибитор РНК-полимеразы. Обнаружено, что производные борнеола 4, 6, 10, 12 эффективны при добавлении к клеткам в течение часа от момента начала инфекции псевдовирусом VSV-ΔG-MarV (Рис. 9). Таким образом, полученные данные подтверждают, что исследуемые производные борнеола действуют на ранних стадиях инфекции, после адгезии частиц к клеткам (т.е. позже, чем заканчивает действие гепарин), но до начала репликации капсида ВВС (раньше, чем рибавирин).

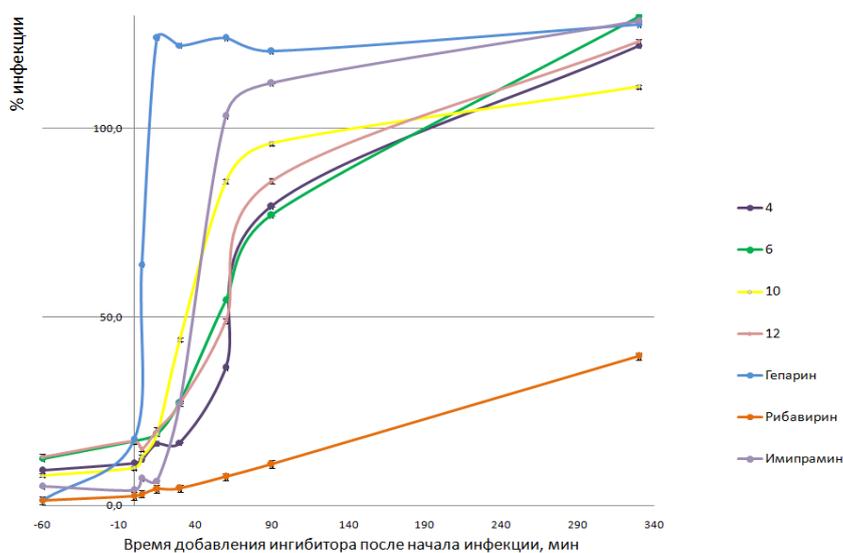


Рис. 9. Влияние различных режимов добавления ингибиторов на эффективности псевдовирусной инфекции VSV-ΔG-MarV. Соединения 4, 6, 10, 12 использовались в концентрациях 15 мкМ, 25 мкМ, 15 мкМ и 30 мкМ, соответственно; гепарин, имипрамин, рибавирин в концентрациях 10 мкг/мл, 12,5 мкМ и 40,9 мкМ, соответственно.

Ингибирующие свойства наиболее активных веществ были подтверждены также на клетках линии Vero. Цитопатический эффект, наблюдаемый при добавлении VSV-ΔG-MarV к клеткам, нивелируется при применении исследуемых веществ в концентрации 15мкМ (Рис. 10).

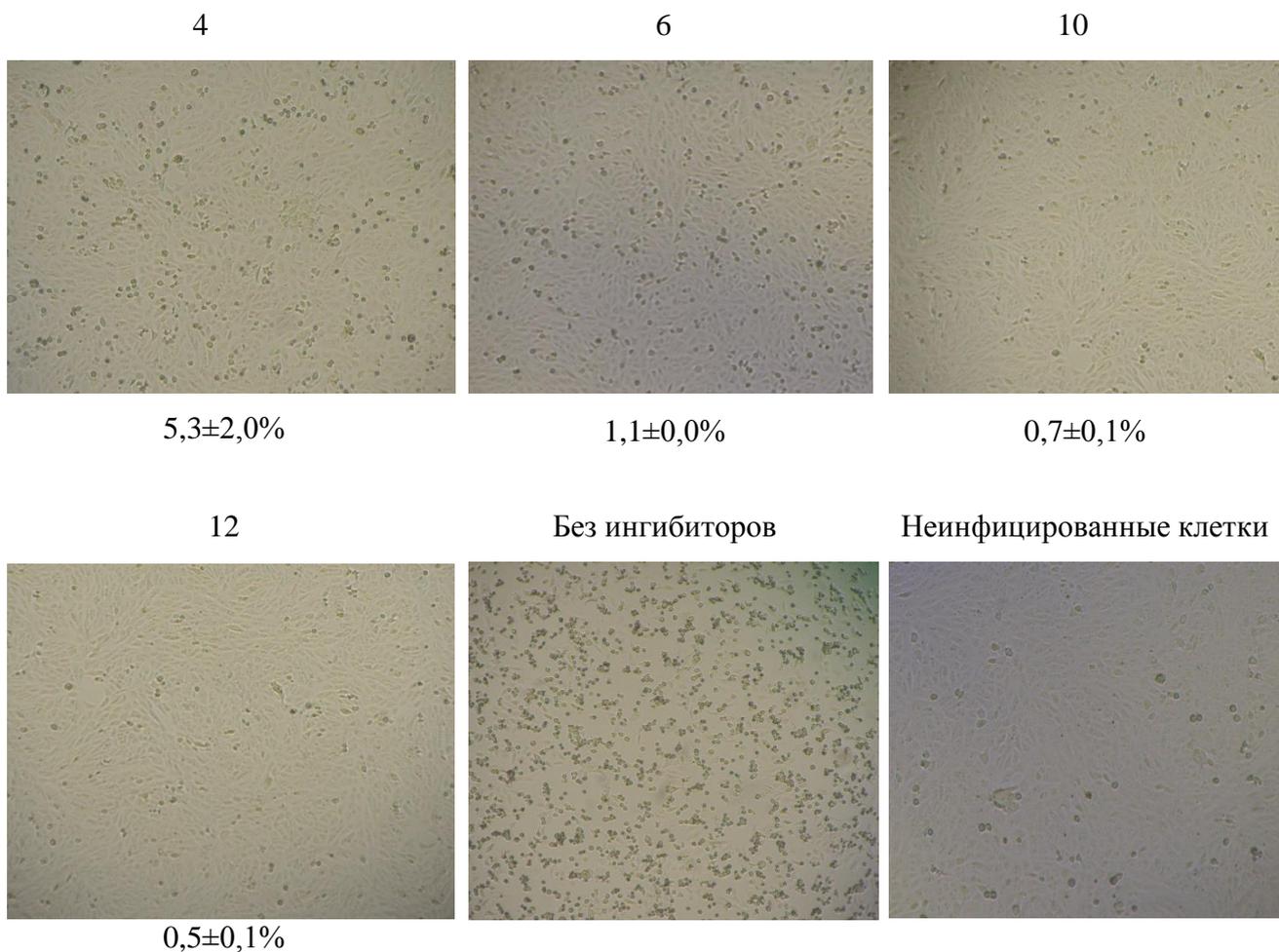


Рис. 10. Подавление псевдовиральной инфекции терпеноидами 4, 6, 10, 12 в клетках линии Vero. Клетки инфицировали псевдовиром VSV-ΔG-MarV в присутствии соединений 4, 6, 10, 12 в концентрации 15мкМ, либо без ингибиторов. В скобках указан % инфекции по отношению к положительному контролю (по результатам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

Инфицированные псевдовиром 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе данной работы впервые были получены псевдовirusы на основе рекомбинантного ВВС, несущие одновременно оба поверхностных белка вируса гриппа А (гемагглютинина 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.

Впервые выполнено моделирование многоцикловая инфекция VSV-ΔG для поверхностного гликопротеина вируса Марбург. В дальнейшем планируется моделирование инфекции для псевдовirusов гриппа, экспрессирующие 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 псевдовirusной инфекции).

С использованием псевдовirusов на основе капсида ВВС изучена активность оригинальных химических соединений. Среди N-содержащих гетероциклических производных борнеола найдены соединения, специфически подавляющие инфекцию VSV-ΔG-MarV. Дальнейшие исследования должны выявить молекулярные механизмы, ответственные за ингибирование инфекции, а полученные данные могут быть полезны для создания более активных и менее токсичных ингибиторов филовирусной инфекции на основе производных борнеола.

ВЫВОДЫ

1. Впервые сконструированы и получены псевдовирусные препараты на основе репликационно–дефектного капсида рекомбинантного вируса везикулярного стоматита (pVBC) с инактивированным 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 НЕК293, возрастает линейно и превышает фоновый более 1000 раз, таким образом, псевдовирс 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 – гемагглютинина и нейраминидазы.
4. Впервые создана модель многоциклового инфицирования псевдовирс 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 псевдовирс 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.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

- 1) A vesicular stomatitis pseudovirus expressing the surface glycoproteins of influenza A virus. Cheresiz S.V., **Kononova A.A.**, Razumova Y.V., Dubich T.S., Pokrovsky A.G., Chepurnov A.A., Kushch A.A., Davey R. Archives of Virology. - 2014. - Т. 159. - № 10. - С. 2651-2658. doi: 10.1007/s00705-014-2127-y.
- 2) Сравнительное исследование фузогенной активности гемагглютининов Н1 и Н5 субтипов вируса гриппа. **А.А. Кононова**, С.В.Чересиз, А.В.Чечушков, Ю.В.Разумова, А.Г.Покровский БЭБиМ. – 2017.- Т. 164. - № 1. – С. 85-89 doi: 10.1007/s10517-017-3930-8.
- 3) **A. Kononova**, A. Sokolova, S. Cheresiz, O. Yarovara, R. Nikitina, A. Chepurnov, A.G. Pokrovsky, N. Salakhutdonov N-Heterocyclic borneol derivatives as the inhibitors of Marburg virus glycoprotein-mediated VSIV pseudotype entry Med. Chem. Commun.- 2017.- Т. 8. - N 12. - С. 2233-2237. doi:10.1039/C7MD00424A