

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

на правах рукописи

Зыбкина Анастасия Владимировна

**Псевдовirusы как инструменты изучения поверхностных гликопротеинов
филовirusов и поиска ингибиторов проникновения**

1.5.3 – молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
Щербаков Дмитрий Николаевич

Кольцово – 2022

Оглавление

Список используемых сокращений.....	5
Введение.....	8
1 Филовирусы и использование псевдовирuсов для изучения их поверхностных белков	14
1.1 Филовирусы	14
1.1.1 Структура вирусных частиц.....	14
1.1.1.1 Морфология вирусного вириона	14
1.1.1.2 Структура генома	15
1.1.1.3 Структура и функция белков	17
1.1.1.3.1 Нуклеопротеиновый комплекс	17
1.1.1.3.2 Полимеразный комплекс	18
1.1.1.3.3 Матричный белок.....	19
1.1.1.3.4 Вирусный поверхностный белок	19
1.1.1.3.5 Антагонисты интерферона	19
1.1.2 Жизненный цикл и белки эболавируса	21
1.1.2.1 Проникновение.....	21
1.1.2.2 Транскрипция и репликация	22
1.1.2.3 Сборка вириона	24
1.1.2.4 Экология и эволюция вируса	25
1.2 Молекулярная биология GP эболавирусов.....	28
1.2.1 GP	32
1.2.2 sGP	38
1.2.3 ssGP.....	38
1.2.4 Shed GP.....	39
1.2.5 Δ-пептид	40
1.3 Псевдовирусы как инструмент изучения поверхностных вирусных белков....	41
1.3.1 Использование псевдовирuсов.....	44
1.3.2 Использование псевдовирuсов для изучения антител	45
1.3.3 Использование псевдовирuсов в качестве иммуногенов.....	47
2 Материалы и методы.....	51

2.1	Материалы.....	51
2.1.1	Основные компоненты для приготовления питательных сред, реактивы, реагенты и прочие материалы.....	51
2.2	Методы	54
2.2.1	ПЦР	54
2.2.2	Ферментативный гидролиз ДНК	55
2.2.3	Встраивание фрагментов ДНК в плазмидный вектор	55
2.2.4	Выделение ПЦР-продуктов из агарозного геля	55
2.2.5	Трансформация клеток <i>E.coli</i> плазмидной ДНК.....	56
2.2.6	Трансформация компетентных клеток <i>E.coli</i> NEB Stable методом heat-shock.....	56
2.2.7	Скрининг колоний.....	57
2.2.8	Электрофоретическое фракционирование ДНК	57
2.2.9	Выделение ДНК из геля.....	57
2.2.10	Выделение плазмидной ДНК с помощью набора (miniprep).....	58
2.2.11	Анализ нуклеотидных последовательностей	59
2.2.12	Культивирование культур клеток.....	59
2.2.13	Катионно-липидная трансфекция.....	59
2.2.14	Кальций-фосфатный метод трансфекции	59
2.2.15	Функциональный анализ псевдовирусных частиц	60
2.2.16	Очистка псевдовирусных частиц на сахарозной подушке	60
2.2.17	Определение цитотоксичности соединений на культуре клеток НЕК 293Т методом МТТ-теста.....	60
2.2.18	Определение ингибирующей активности соединений	61
2.2.19	Изоэлектрическое осаждение антител	61
2.2.20	Аффинная хроматография.....	62
2.2.21	Определение ингибирующей и полуингибирующей доз селективного антибиотика блеомицина.....	63
2.2.22	Статистический анализ результатов	63
2.2.23	Иммунизация кур	63
3	Результаты и обсуждение	65

3.1 Конструирование плазмид, содержащих ген GP EBOV	65
3.2 Получение псевдовирюсов EBOV и исследование комплекса свойств	67
3.2.1 Изучение трансдуцирующей активности псевдовирюсов EBOV	69
3.2.2 Изучение иммунохимических свойств псевдовирюсов EBOV	70
3.2.3 Изучение иммуногенности псевдовирюсов EBOV	71
3.3 Использование псевдовирюсов EBOV для поиска соединений, способных блокировать проникновение вируса в клетку-мишень	74
3.4 Изучение сайта связывания веществ с поверхностным гликопротеином эболавируса Заир	84
3.4.1 Конструирование плазмид, содержащих ген GP EBOV с внесёнными мутациями	87
3.4.2 Изучение ингибирующей активности соединений в отношении мутантных вариантов псевдовирюсов GP EBOV	89
Заключение	91
Выводы	95
Список литературы	96
Приложение 1. Структуры исследуемых соединений.....	124
Благодарности.....	128

Список используемых сокращений

- а. о. – аминокислотный остаток
- БВВЭ – болезнь, вызванная вирусом эбола
- ВВС – вирус везикулярного стоматита
- ВГС – вирус гепатита С
- ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека 1
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- Ед. акт. – единицы активности
- мРНК – матричная РНК
- ОП – оптическая плотность
- ОРТ – открытая рамка трансляции
- п. н. – пар нуклеотидов
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- дцРНК – двухцепочечная рибонуклеиновая кислота
- т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов
- BDBV (Bundibugyo virus) – эболавирус Бундibuгио
- CC50 (cytotoxic concentration of 50%) – 50% цитотоксичность
- EBOV (Ebola virus) – эболавирус заир
- GFP (green fluorescent protein) – зелёный флуоресцентный белок
- GP (glycoprotein) – гликопротеин
- sGP – растворимый гликопротеин
- ssGP – малорастворимый гликопротеин
- HCV (hepatitis c virus) – вирус гепатита С
- HIV-1 (Human immunodeficiency virus 1) – вирус иммунодефицита человека
- HR1A – сегмент гептадного повтора 1А
- HR1B – сегмент гептадного повтора 1В
- HR1C – сегмент гептадного повтора 1С
- HR1D – сегмент гептадного повтора 1 D
- HSV-1 (Herpes simplex virus) – вирус простого герпеса 1 типа

HTLV-1 (Human T-lymphotropic virus) – Т-лимфотрофный вирус человека

HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) – эндотелиальные клетки пупочной вены человека

IC50 (inhibitory concentration of 50%) – 50% ингибирующая концентрация

IFN (interferon) – интерферон

LLOV (Lloviu virus) – вирус Лловиу

LTR (long terminal repeats) – длинные концевые повторы

MARV (Marburg virus) – Марбургвирус Марбург

MERS (Middle East respiratory syndrome) – ближневосточный респираторный синдром

MHC I (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости 1 типа

MLAV (Mengla virus) – вирус Менгла

MLD (mucin-like domain) – муциноподобный домен

MLV (Murine leukemia virus) – вирус мышиноного лейкоза

MoMLV (Moloney murine leukemia virus) – вирус мышиноного лейкоза Молони

MRCА (most recent common ancestor) – ближайший общий предок

PV (pseudotyped virus) – псевдотипированный вирус

RNP – рибонуклеопротеидный комплекс

RAVV (Ravn virus) – вирус Ravn

RESTV (Reston virus) – эболавирус Рестон

scFv (single-chain variable fragment) – одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела

SHFV (simian hemorrhagic fever virus) – вирус геморрагической лихорадки обезьян

SI (selectivity index) – индекс селективности

SUDV (Sudan virus) – эболавирус Судан

UTR (untranslated region) – нетранслируемый регион

VEP (virus envelope protein) – поверхностный белок вируса

VLP (virus like particles) – вирусоподобные частицы

VSV (vesicular stomatitis virus) – вирус везикулярного стоматита

XILV (Xilang virus) – вирус Ксилун

3'-/5' – НТО – 3'-/5' - нетранслируемая область

φ – сигнал упаковки

Введение

Болезнь, вызванная вирусом эбола (БВВЭ, *Ebola virus disease*, EVD) – острое, высококонтагиозное вирусное заболевание, смертность людей от которой может достигать 90% [1]. Возбудитель БВВЭ был открыт в 1976 году. Долгое время этот вирус напоминал о себе внезапными вспышками, которые сопровождались высокой смертностью, однако, быстро затухали. В последнее десятилетие мир столкнулся с масштабными вспышками, обусловленными эболавирусом (ЕВОВ) Заир, в Западной Африке в 2013-2016 гг. и в Демократической Республике Конго в 2017-2021 гг. По данным Всемирной организации здравоохранения, количество погибших от вспышки эболавируса за время эпидемии 2013-2016 гг. превысило 11 тысяч человек. Складывающаяся ситуация требует принятия адекватных мер противодействия, среди которых приоритетными являются разработка вакцин и специфических противовирусных препаратов.

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

Инфекционность псевдовирусных частиц ограничена лишь одним циклом. Это обеспечивает биологическую безопасность данной системы, которая может быть использована для изучения стадий вирусной инфекции, опосредуемых поверхностными белками трудно культивируемых и высокопатогенных вирусов [2]. Немаловажным преимуществом использования псевдовирусных систем является то, что стоимость работ с псевдовirusами многократно ниже, чем при использовании инфекционных вирусов.

В настоящее время для получения псевдовirusов филовirusов используют две системы: лентивирусную и рабдовирусную. Лентивирусная система достаточно толерантна к встройке гомологичных или гетерологичных (псевдотипирование) вирусных поверхностных белков [3]. Вирусные частицы

получают котрансфекцией культивируемых клеток млекопитающих пакующей плазмидой и плазмидой, кодирующей поверхностный гликопротеин (GP) эболавируса. Полученные таким образом частицы представляют собой лентивирусный капсид со всеми лентивирусными белками, а их поверхность покрыта гликопротеином филовирюсов. Для изучения эболавируса систему на основе лентивирусов начали использовать в конце 90-х годов [4]. Лентивирусная система не лишена недостатков. Плотность экспонирования поверхностного белка на поверхности таких псевдовирюсных частиц низка, а морфология значительно отличается от филовирюсной [5]. Отличается и иммунологическое поведение таких частиц.

В основе второй системы получения псевдовирюсов эболавирусов лежит система почкования вирюса везикулярного стоматита (VBS). Если для почкования лентивирусов важен комплекс gag и gag-pol (то есть капсидные белки), то в случае VBS почкование определяется системой матриксный белок – нуклеопротеиновый комплекс, поэтому реализация этого подхода невозможна с использованием только плазмид. Для упрощения системы псевдотипирования VBS, разработана оригинальная система, позволяющая проводить быструю "смену" поверхностного гликопротеина. Для этого используют вирюсные частицы, содержащие дефектный по гену поверхностного белка (G) геном, ими инфицируют клетки, предварительно трансфицированные рекомбинантной плазмидой, содержащей последовательность вирюсного поверхностного гликопротеина [2]. Для удобства анализа инфекционности в дефектный геном VBS была встроена последовательность, кодирующая фермент люциферазу. Сравнение результатов нейтрализации антителами, полученными с использованием этой системы, с результатами, полученными при использовании натурального вирюса, показывает, что она достаточно близко имитирует иммунологические особенности эболавируса [6].

Псевдовирюсы являются удобной моделью для поиска противовирюсных препаратов. Кроме безопасности и относительно низкой стоимости экспериментов большое значение имеет возможность быстрой смены структуры

поверхностного белка вируса. В случае использования псевдовирюсов можно достаточно быстро получить интересующий вариант/штамм, всего лишь синтезировав и встроив необходимую нуклеотидную последовательность в экспрессионный вектор. Агенты, показавшие активность в псевдовирюсной системе, могут рассматриваться как кандидаты для дальнейших работ с живым вирусом.

Цель исследования

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

Задачи исследования

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

Научная новизна

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

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

Впервые на основе вируса везикулярного стоматита с дефектом генома по гену поверхностного гликопротеина получены вирусные частицы, псевдотипированные поверхностным гликопротеином эболавируса Заир, –

варианты гена GP с заменами аминокислот в позициях Y517, D522 и M548 на остаток аланина.

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

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные псевдовirusы эболавируса Заир обладают большим потенциалом для применения. Во-первых, использование в качестве тест-системы для определения эффективности потенциальных лекарственных препаратов. Во-вторых, использование псевдовirusных частиц для активации гуморального иммунного ответа против филовirusов. В-третьих, тестирование сывороток переболевших для определения их нейтрализующей активности, а также животных, иммунизированных экспериментальными вакцинами. Кроме того, большой значимостью обладают результаты анализа потенциальных низкомолекулярных блокаторов, эти вещества могут послужить основой для создания эффективных противовirusных препаратов.

Основные положения, выносимые на защиту

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

2. Внутримышечное введение смеси лентивirusных и рабдовirusных псевдовirusных частиц, несущих на своей поверхности GP эболавируса Заир, в дозе 3×10^9 частиц на животное, в комплексе с неполным адьювантом Фрейнда обеспечивает индукцию нейтрализующих антител с максимальным титром 1:4096.

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

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

Степень достоверности и апробация результатов

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

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

Личный вклад автора

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

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

Работа выполнена в 2015–2021 гг.

Структура и объем диссертации

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

1 Филовирусы и использование псевдовирусов для изучения их

поверхностных белков

1.1 Филовирусы

1.1.1 Структура вирусных частиц

1.1.1.1 Морфология вирусного вириона

Частицы филовируса длинные и нитевидные. Они могут образовывать удлиненные стержни или изгибаться один или несколько раз, придавая им вид струны или тора. Эти особенности морфологии дали начало названию *Filoviridae* от латинского *filum*, что означает нить. Хотя волокна вириона имеют диаметр около 80 нм, длина частиц может быть разной. Было установлено, что средняя длина вириона для инфекционной частицы составляет около 800 и 1000 нм для MARV и EBOV соответственно [7]. Семь основных белков филовируса входят в состав вириона (рисунок 1). От их белок-белкового, белок-РНК и белок-мембранного взаимодействия формируется сложная морфология филовируса. Нуклеопротеин (NP) и белок VP30 обладают высоким сродством к РНК, этот комплекс вместе с белками L и VP35 образует рибонуклеопротеидный комплекс (RNP, РНП).

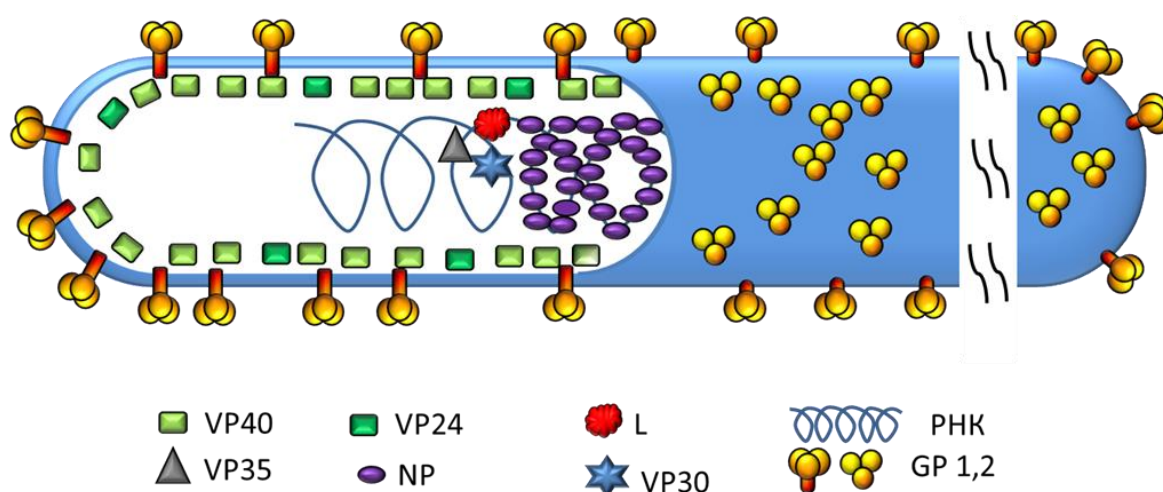


Рисунок 1. Структура вирусной частицы. Филовирусы представляют собой оболочечные РНК-вирусы с отрицательной полярностью. Геном содержит семь генов 3'-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-5'. NP – нуклеопротеин, VP35 – кофактор полимеразы, VP40 – матриксный белок, GP – гликопротеин, VP30 – транскрипционный фактор, VP24 – нуклеокапсид-ассоциированный белок, L – полимеразы.

Он, в свою очередь, окружен внешней оболочкой, полученной из плазматической мембраны клетки-хозяина, выстланной матричным белком VP40. Поверхность вириона представлена тримерами белка GP.

1.1.1.2 Структура генома

Члены семейства *Filoviridae* продуцируют вирионы характерной формы, часто нитевидные, оболочечные, содержащие линейный несегментированный (-) РНК-геном размером 15-19 т.п.н. [8]. Геномы вирусов всех шести родов имеют схожую геномную архитектуру (рисунок 2).

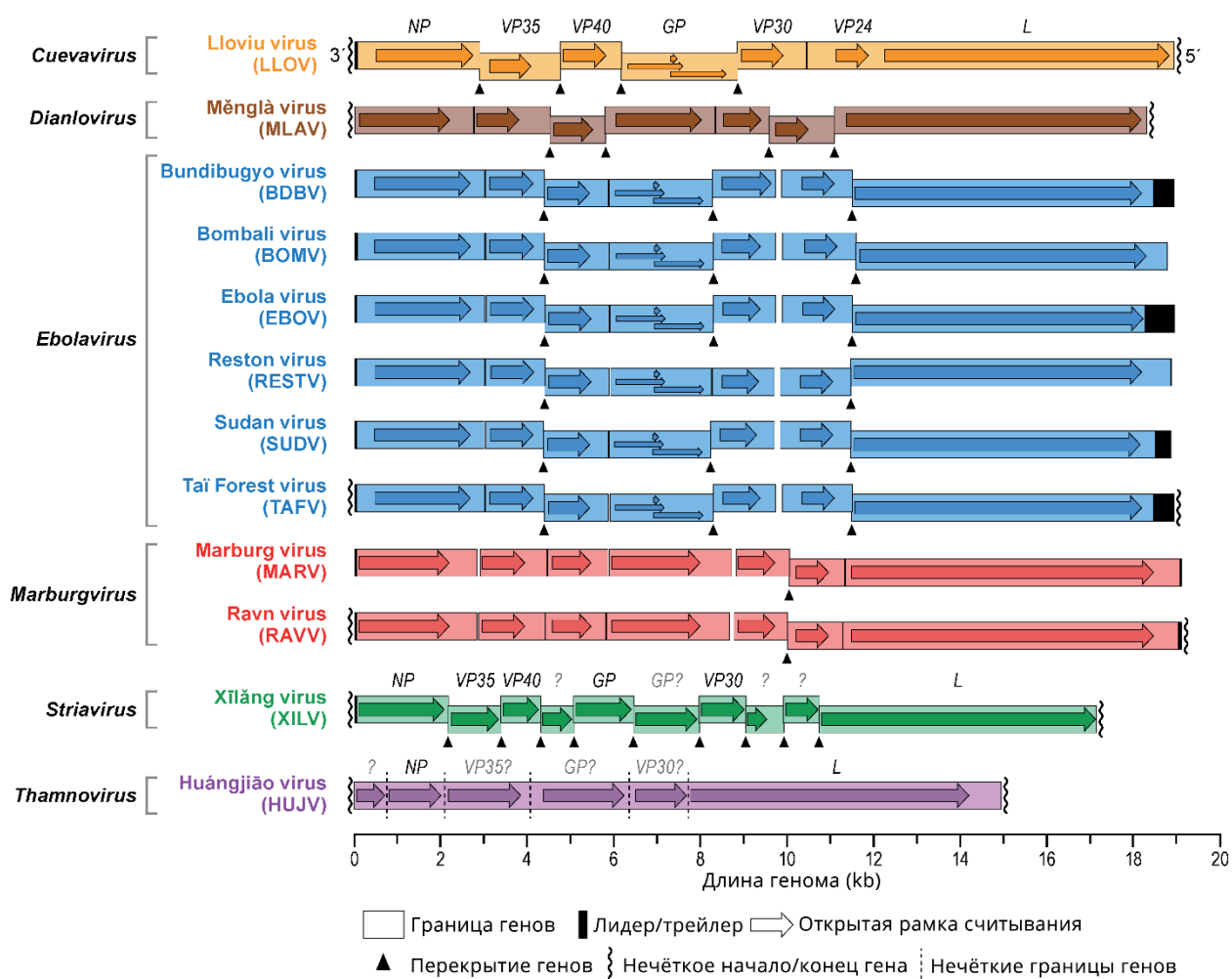


Рисунок 2. Схематическое изображение организации генома филовирусов. Адаптировано из статьи Kuhn J. H. [8].

Филовирусы обычно кодируют семь генов, расположенных в последовательном порядке: NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24 и L [9]. Исключением является *Cuevavirus*, который, как полагают, кодирует только шесть транскриптов мРНК, включая один бицистронный транскрипт, который обеспечивает синтез как VP24, так и L [10]. Каждый ген фланкирован консервативными сайтами инициации и терминации транскрипции с минимальными вариациями [1,11–13]. Одна длинная межгенная область была отмечена как у рода *Ebolavirus* (между VP30 и VP24), так и у рода *Marburgvirus* (между GP и VP30) [14,15]. Другие гены либо разделены короткими межгенными участками, содержащими от четырех до семи высококонсервативных нуклеотидов, либо перекрываются [1,11,12]. Перекрывающиеся гены различаются в зависимости от вида вируса и могут использоваться для идентификации конкретных изолятов [9].

Помимо межгенных регионов, существуют еще и нетранслируемые регионы (UTR), расположенные на 3' и 5' концах геномов всех филовирусов. 3'UTR содержит лидерную последовательность длиной примерно 60 п.н., а 5'UTR содержит концевую последовательность, длина которой варьируется у разных видов, но может достигать 676 п.н. в случае EBOV. Терминальные концы генома имеют консервативные последовательности с высокой комплементарностью, которые образуют структуры «стебель-петля» [14,15]. Вторичная структура РНК в 3'-UTR области опосредует специфичность связывания вирусного фактора транскрипции VP30 и необходима в EBOV для активации транскрипции [16,17].

Каждый ген содержит одну открытую рамку трансляции (ОРТ), кроме LLOV VP24 / L, которая является бицистронной, и GP эболавирусов, которые содержат три перекрывающиеся рамки считывания [10,13,18]. ОРТ филовируса фланкированы нетранслируемыми областями длиной от 57 до 684 нуклеотидов [1,13,19]. Наличие длинных нетранслируемых участков является необычной характеристикой генома филовируса, присущей только для генипавирусов семейства *Paramyxoviridae* [20]. Точная важность этих нетранслируемых элементов в настоящее время неизвестна, но их значительный размер и

распределение среди всех филовировусов может указывать на их функциональную роль.

Организация геномов дианловировусов очень напоминает геномы марбургвирусов, но они содержат не один, а четыре участка перекрытия генов (рисунок 2) [21].

Стриавирусы отличаются геномами, которые содержат девять перекрытий генов, кодируют по крайней мере три белка без очевидных гомологов в других родах филовировусов и не кодируют белок VP24 (рисунок 2) [22,23].

Тамновирусы отличаются геномом, который кодирует по крайней мере один белок без очевидных гомологов в других родах филовировусов и не кодирует матричный белок (VP40) или VP24 (рисунок 2) [22,23].

1.1.1.3 Структура и функция белков

1.1.1.3.1 Нуклеопротеиновый комплекс

Филовировусы содержат основной (NP) и минорный (VP30) нуклеопротеины, которые взаимодействуют с вирусной геномной РНК и образуют RNP [24]. При синтезе в клетках млекопитающих рекомбинантный NP образует цитоплазматические тельца включения и неспецифически связывается с РНК клетки-хозяина, образуя спирали [25]. Показано, что 450 аминокислот, расположенных на N-конце EBOV NP, способствуют спонтанной сборке трубок из NP, формирующих каркас для RNP [25,26].

Белок VP30 также напрямую связывает РНК, при этом предпочтительно взаимодействуя с геномной вирусной РНК. В составе VP30 идентифицированы два домена гомоолигомеризации, обеспечивающие образование гексамеров через N-концевой домен [27]. С-концевая область этого белка играет роль в транскрипции и образовании нуклеокапсида [28]. VP30 также содержит мотив цинковых пальцев, являющийся высококонсервативным для всех филовировусов, и легче связывается с РНК в присутствии ионов Zn^{2+} [29]. Вероятно, VP30 играет роль моста между NP и L в RNP [30]. Исследования *in vitro* с использованием

системы искусственной репликации первоначально показали, что коэкспрессия NP, VP35 и L необходима и достаточна для транскрипции и репликации генома MARV, тогда как VP30 дополнительно требуется для транскрипции EBOV [31,32]. Совсем недавно была определена кристаллическая структура комплекса NP-VP30, и было показано, что этот комплекс важен для транскрипции геномной РНК EBOV [33]. Экспрессия гена VP30 в клетках млекопитающих не приводит к образованию включений, подобных NP, белок распределяется по цитоплазме [30]. EBOV VP30 также служит трансдействующим фактором для редактирования РНК гена GP. У VP30 EBOV показана зависимость от фосфорилирования активность активатора транскрипции и ингибитора репликации [16], тогда как MARV VP30, по-видимому, лишен этого свойства [32].

1.1.1.3.2 Полимеразный комплекс

Белок L, РНК-зависимая РНК-полимераза, является ферментативным компонентом RNP, в то время как VP35 является кофактором [13]. При индивидуальной экспрессии в клетках млекопитающих белок L образует небольшие перинуклеарные включения. Белок L не взаимодействует напрямую с NP. Было показано, что связующим фактором между этими двумя компонентами в RNP является VP35 [30]. В настоящее время идентифицированы участки полимеразного комплекса, отвечающие за связывание с матрицей, так и участвующие в катализе [34]. Как и следовало ожидать, части белка L, обеспечивающие ферментативную активность, являются высококонсервативными, так как важны для поддержания соответствующих функций полимеразы. Однако, некоторые части последовательности, особенно рядом с С-концом, демонстрируют некоторую межвидовую изменчивость. Например, длина гена L MARV (около 7,7 т.п.н.) значительно больше, чем длина гена EBOV (6,8 т.п.н.) или LLOV L (6,6 т.п.н.).

1.1.1.3.3 Матричный белок

Матричный белок VP40 является наиболее представленным белком в частицах филовирусов [35]. VP40 не обладает трансмембранными доменами, но проявляет сильное сродство к мембранам и ассоциируется с вирусной оболочкой. VP40 непосредственно способствует охвату RNP клеточной мембраной и важен для образования почкующихся вирусов [36]. VP40 является первичным структурным компонентом матрикса и образует гексамерные и октамерные кольцевые структуры *in vitro* [37,38]. Олигомеризация, как было установлено, является предпосылкой для почкования VP40 [39]. В последнее время биохимические и биофизические исследования продемонстрировали способность VP40 проникать в липидные бислои и инициировать искривление мембран, приводящее к образованию вирусных частиц [40,41].

1.1.1.3.4 Вирусный поверхностный белок

Все филовирусы содержат на поверхности вирионов тримерный гликопротеин GP, играющий ключевую роль в проникновении вируса и патогенезе. Из всех белков филовирусов именно GP лучше всего охарактеризован, отчасти из-за его функциональной важности и его роли в качестве мишени протективного иммунитета [42,43].

1.1.1.3.5 Антагонисты интерферона

Было обнаружено, что и эболавирусы, и марбургвирусы способны противодействовать защитным реакциям организма, опосредуемым интерфероном (IFN). Установлено, что VP35 и VP24 способны блокировать механизмы врожденного иммунного ответа хозяина во время инфицирования EBOV, аналогичная функция была отмечена для белков VP35 и VP40 MARV.

EBOV и MARV VP35 противодействуют врожденному иммунному ответу хозяина путем активного блокирования IFN посредством взаимодействия с регуляторным фактором 3 IFN (IRF3) и IRF7 [44,45]. Кристаллизация комплекса

РНК-связывающего домена VP35 EBOV и двухцепочечной (дц) РНК показали, что VP35 покрывает дцРНК во время репликации, тем самым препятствуя распознаванию рецепторами пути RIG-I, участвующими в активации клеточного ответа [46,47]. Интересно, что VP35 аналогичен фосфопротеину, присутствующему у *Pneumoviridae* и *Paramyxoviridae*, однако VP35 менее фосфорилирован [24].

EBOV VP24 связан с внешней стороной RNP в вирусной частице и блокирует накопление в ядре тирозин-фосфорилированного STAT1 за счет связывания с кариоферином $\alpha 1$, сигналом ядерной локализации для STAT1 [47]. Кроме того, VP24 способен ингибировать стимулированное IFN фосфорилирование p38- α в определенных клеточных линиях; данный иммуносупрессивный механизм обнаружен и у других вирусов [48,49].

Кроме способности блокировать клеточный иммунитет, было показано, что VP24 локализуется вблизи клеточной мембраны и перинуклеарной области, где он регулирует синтез вирусной РНК. N-концевой домен придает VP24 способность олигомеризоваться *in vitro* [35]. Было продемонстрировано, что нокадаун VP24 препятствует образованию сборки нуклеокапсида [50]. Было также показано, что VP24 участвует в упаковке генома [51], вероятно, через взаимодействие с NP [52].

MARV VP40 напрямую ингибирует фосфорилирование тирозина Jak1 и STAT и, следовательно, эффективно блокирует передачу сигналов IFN и интерлейкина 6 [53].

1.1.2 Жизненный цикл и белки эболавируса

1.1.2.1 Проникновение

Механизм проникновения филовирюсов изучается в течение нескольких десятилетий в основном с использованием EBOV (рисунок 3).

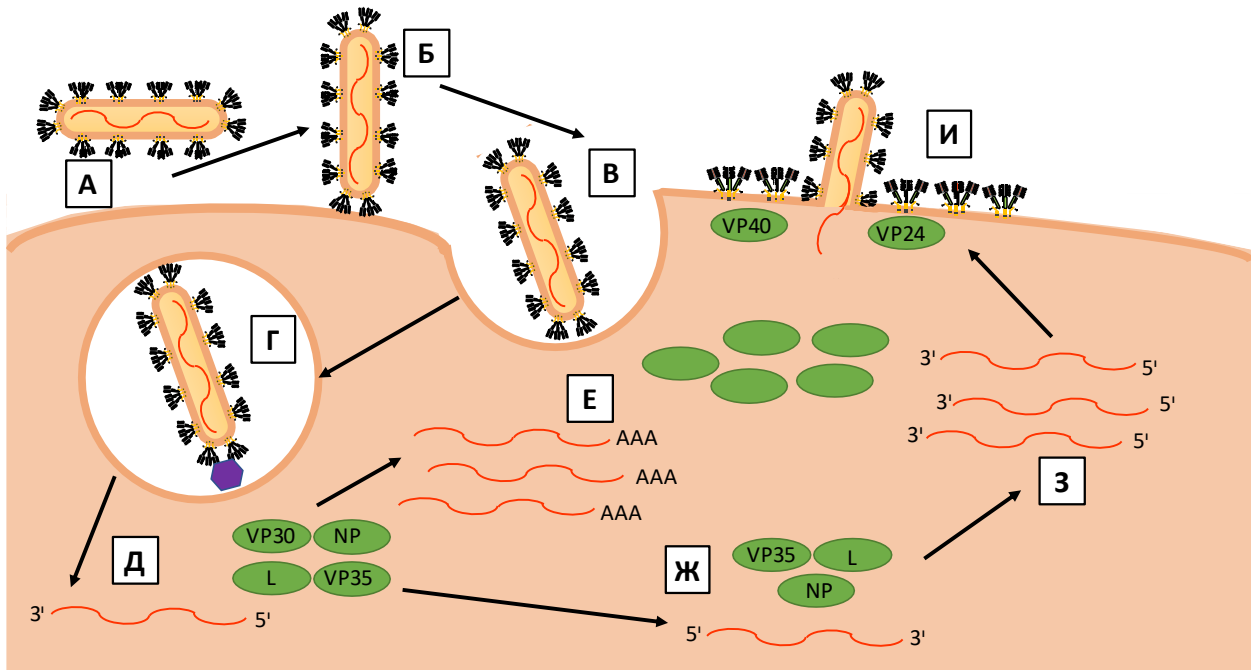


Рисунок 3. Цикл репликации филовирюсов. Адаптировано из статьи Emanuel J. [54].

(А) Зрелая вирусная частица вне клетки. (Б) Вирус прикрепляется к клетке посредством связывания GP с факторами прикрепления, например, лектинами С-типа. (В) Вирус поглощается клеткой в основном посредством макропиноцитоза. (Г) Формируется эндосома. GP расщепляется цистеиновыми протеазами и взаимодействует со своим первичным рецептором NPC1 (фиолетовый), инициируя слияние мембран. (Д) Геном направляется в цитозоль. Полимеразный комплекс обеспечивает синтез положительно-смысловых транскриптов и антигеномов. (Е) Транскрипты вирусной РНК транслируются рибосомами хозяина. (Ж) Репликативный комплекс использует антигеномы в качестве матрицы для синтеза геномов потомства. (З) Геномы потомства сформированы. (И) VP40 и VP24 стимулирует сборку вирионов и их отпочкование. Филовирюс GP включается в оболочку вируса, и зрелый вирус высвобождается из клетки.

На первом этапе вирусная частица прикрепляется к поверхности клетки, связываясь с лектинами С-типа, такими как DC-SIGN [55] и другими белками, которые ранее ошибочно считались универсальными рецепторами EBOV. Связывание с этими молекулами увеличивает проникновение вируса, по крайней мере, в определенные типы клеток, но они не функционируют как рецепторы EBOV. После того, как вирусная частица прикрепляется к поверхности клетки,

она поглощается в основном посредством макропиноцитоза [56–58], хотя показаны и другие пути проникновения [56,57,59]. В любом случае вирусные частицы попадают в кислую среду эндосом. Было показано, что для проникновения вируса требуется протеолиз EBOV GP1. В экспериментах *in vitro* была установлена роль катеписина В и вероятная вспомогательная роль катеписина L (обе эндосомальные цистеиновые протеазы хозяина) [60]. Эксперименты *in vivo* показали, что мыши с нокаутом катеписина В и L не проявляли фенотипа отсроченного заболевания [61], что указывает на то, что в отсутствие этих специфических протеаз другие функционально подобные протеазы, такие как термолизин, могут расщеплять GP1 [62]. Однако протеолитическое расщепление является необходимым этапом, поскольку оно обнажает структурно скрытую петлю слияния, которая приобретает способность взаимодействовать с первичным рецептором филовирюсов, транспортером холестерина Niemann-Pick C1 (NPC1) [63,64]. Специфические последовательности в структуре NPC1 были идентифицированы как существенные для связывания GP и проникновения вируса [65]. Кристаллическая структура комплекса NPC1-GP выявила несколько представляющих интерес областей, таких как область взаимодействия между NPC1 и спиралью GP $\alpha 1$ [66]. Это согласуется с выводом о том, что аминокислотные вариации, окружающие последовательность спирали GP $\alpha 1$, как было показано, вносят вклад в различия в тропизме видов-хозяев [67–69]. Наконец, расщепленный GP1 связывается с NPC1 и запускает слияние между вирусной и эндосомальной мембранами. Впоследствии вирусный RNP высвобождается в цитоплазму, и начинается процесс формирования вирусного потомства [70].

1.1.2.2 Транскрипция и репликация

Механизм репликации филовирюсов подробно изучен с использованием искусственной систем репликации, таких как минигеномы [71,72]. Все филовирюсы кодируют белки, необходимые для образования полимеразного комплекса, который продуцирует (+)-антигеном, который служит матрицей для

репликации (-)-генома. Как в MARV, так и в EBOV было показано, что NP, VP35 и L необходимы и достаточны для репликации генома. Механизм репликации филовирuсов схож с таковым у парамиксовирусов и рабдовирусов и обеспечивается участием трех белков NP, P и L [73]. Было показано, что белки, участвующие в репликации генома, изменяют локализацию в ходе клеточной инфекции: сначала они распределяются в цитоплазматических включениях, которые локализуются около ядра, затем разбиваются на более мелкие части и впоследствии локализуются возле плазматической мембраны [74]. В EBOV репликация начинается в двухкомпонентной промоторной области, которая подчиняется правилу шести и фланкирует последовательность инициации транскрипции для гена NP [75].

Филовирuсы кодируют семь моноцистронных транскрипционных единиц (генов), за исключением LLOV, который, как считается, имеет только шесть, включая один бицистронный блок. Каждая единица связана с соответствующей областью промотора транскрипции. Существует разница в строении репликативного аппарата MARV и EBOV. Для MARV для инициации транскрипции достаточным является участие NP, VP35 и L [71], для EBOV, однако, важным кофактором является четвертый белок, VP30, который действует, обходя петлю шпильки в некодирующей области генома [75].

За последнее десятилетие проведено большое количество исследований, посвященных изучению механизмов регуляции транскрипции и репликации генома, в частности роли белков VP30 и VP24. Известно, что VP30 стабилизирует связывание VP35 – L РНК. В результате было выдвинуто предположение, что фосфорилирование VP30 модулирует конформацию RNP с образованием либо транскриптазы, либо комплекса репликазы [16]. Предположительно, аналогично VP24 регулирует синтез РНК, влияя на конформацию RNP. Электронно-микроскопический анализ VP24 показывает, что он ассоциируется с внешней поверхностью RNP и что эта ассоциация переводит RNP в форму, обнаруженную в вирусных частицах [76,77]. В экспериментах *in vitro* было показано, что сверхэкспрессия VP24 ингибирует синтез РНК [77]. Таким образом, считается,

что присутствие VP24 изменяет RNP из формы, совместимой с транскрипцией/репликацией, на упаковочно-компетентную форму [52,53].

1.1.2.3 Сборка вириона

В то время как синтез вирусной РНК происходит в тельцах включения [39,74], сборка вирионов происходит в цитозоле. При экспрессии *in vitro* только VP40 образует вирусоподобные частицы (VLP). Эти VLP имеют меньший диаметр (53–80 нм), чем инфекционные частицы (около 80 нм), что указывает на то, что другие вирусные белки вносят вклад в морфологию вируса [79,80]. VP40 образуется в виде мономера и впоследствии олигомеризуется в гексамерные и октамерные кольца посредством N-концевого домена [39,81]. Конформация метастабильной мономерной формы VP40 определяет взаимодействия с липидной мембраной, опосредованные С-концевым доменом [37,82]. Гексамерная форма VP40 возникает, когда С-концевой домен экспонируется через гибкий линкер из кольцевой структуры, обеспечивая стабильное связывание VP40 [82,83]. Октамерная форма зависит от четырех гомодимеров, связывающих тринуклеотиды РНК последовательности 5'-UGA-3', и не может образовываться в отсутствие РНК [38,84]. В EBOV октамеризация VP40 важна для инфекционности [39].

VP24 также важен для правильной сборки, так как он играет роль регулятора синтеза вирусной РНК. Хотя на раннем этапе предполагалось, что VP24 функционирует как минорный матричный белок из-за его расположения в матричном пространстве, недавние исследования с помощью электронной микроскопии показали, что VP24 действительно связан с внешними вирусными RNP, что приводит к жесткой форме RNP, наблюдаемых в частицах EBOV [76,85]. Эти и другие результаты предполагают, что VP24 необходим для продукции RNP, способной к репликации, поскольку он контролирует конденсацию RNP из гибкой формы, которая может подвергаться транскрипции и репликации в жесткую форму, упакованную в вирусные частицы [39,52].

1.1.2.4 Экология и эволюция вируса

Хорошо известно, что EBOV и, возможно, также другие эболавирусы, помимо человека поражают других приматов. Популяции диких горилл (*Gorilla gorilla*) и шимпанзе (*Pan troglodytes*) значительно сократились в результате вспышек EBOV [86–88]. Высокая патогенность EBOV у нечеловекообразных приматов и спорадический характер инфекции предполагают, что приматы являются тупиковыми хозяевами, как и люди. Начиная с обнаружения геномного материала EBOV у нескольких плодовых и насекомоядных видов летучих мышей, летучие мыши стали основным претендентом на роль переносчика филовируса [89–93]. Многочисленные свидетельства были получены при обнаружении EBOV и RESTV у множества видов летучих мышей, обитающих на территории Африки (Гана, Габон, РК, ДРК и Замбия) и Азиатского региона (Бангладеш, Филиппины и Китай).

RESTV был выделен от домашних свиней (*Sus scrofa*) на Филиппинах в 2008 году [94]. РНК RESTV была обнаружена у свиней недалеко от Шанхая, Китай [95], но домашние свиньи, скорее всего, будут служить промежуточными или усиливающими хозяевами, а не резервуаром [94,95]. У свиней, экспериментально инфицированных RESTV, не наблюдается симптомов [96]. Это контрастирует с экспериментальной инфекцией EBOV у свиней, которая может вызывать тяжелые респираторные симптомы и вирусное выделение [97]. RESTV вызывает тяжелые заболевания у нечеловекообразных приматов [98], но, как известно, не вызывает серьезных заболеваний у людей. Как и в случае EBOV, есть свидетельства того, что RESTV также присутствует у летучих мышей [99,100].

MARV, RAVV, BDBV, TAFV, EBOV и SUDV циркулируют в тропических регионах Африки к югу от Сахары, тогда как RESTV был идентифицирован на Филиппинах, а LLOV – в Испании. Хотя EBOV не был изолирован за пределами Африки, специфические к филовирусам антитела, перекрестно реагирующие с EBOV, были обнаружены у летучих мышей *Rousettus leschenaulti* в Бангладеш и у орангутанов *Pongo pygmaeus* на Борнео [101,102].

Что касается MLAV, представителя рода дианловирусов, обнаруженного на территории КНР, то можно предположить, что он циркулирует в популяции китайских летучих мышей *Rousettus sp.*, работа с этими животными позволила выявить это возбудитель. На эту гипотезу наталкивает и аналогия с другими филовирусами, также циркулирующими в популяции рукокрылых.

Совсем иную картину можно наблюдать для XILV и HUV. В отличие от других филовирусов, их генетические последовательности были обнаружены при работе с образцами рыб *Antennarius striatus* и *Thamnaconus septentrionalis* в Восточно-Китайском море в 2011 г. Каким образом происходит циркуляция и каков резервуар этих филовирусов в настоящее время говорить очень трудно.

До последнего времени все филовирусы считались серьезными патогенами человека, за исключением RESTV, который считается апатогенным. Однако, в связи с открытием новых представителей семейства, таких как LLOV, MLAV и особенно XILV, HUV, представление о структуре патогенности этой группы вирусов сильно изменилось.

За последние несколько десятилетий прилагаются всё большие усилия по выявлению зоонозного происхождения филовирусов. Эта задача осложняется из-за удаленных и экологически богатых местообитаний в джунглях, где, как известно, происходят вспышки, поскольку разнообразие видов млекопитающих в этих регионах затрудняет выявление предполагаемых резервуарных хозяев. Точный механизм передачи зоонозов человеку неизвестен, но возможными путями являются незащищенное обращение с зараженным мясом диких животных и укусы инфицированного животного [103,104]. Общепринято мнение, что случаи передачи вируса от животного к человеку чрезвычайно редки, но вирус распространяется между людьми эффективно после первоначального заноса. Результаты, полученные в ходе эпидемии EBOV с 2013 по 2016 год, подтверждают эту гипотезу, поскольку геномные данные показывают, что причиной эпидемии была единичная передача вируса от животного к человеку [105]. Считается, что вспышка Kikwit EBOV в 1995 году также вызвана единичной передачей патогена, но в отличие от эпидемии 2013–2016 годов не

было обнаружено изменений последовательности гена гликопротеина EBOV (GP). Возможно, причиной стало более ограниченное количества случаев передачи у людей [106]. Другие вспышки, включая серию повторяющихся вспышек в Габоне и Республике Конго (РК), также характеризовались более короткими цепочками передачи множественных линий EBOV, которые затронули как людей, так и нечеловекообразных приматов [107]. Наконец, вспышка MARV в Дурбе / Ватсе в 1998–2000 гг. Характеризовалась множественными одновременными интродукциями различных генетических линий MARV в человеческую популяцию с более короткими цепями передачи в конечном хозяине [108].

Эволюционное происхождение филовирюсов вызывает некоторые споры, поскольку временные рамки вирусной эволюции широко обсуждаются [109–112]. По некоторым оценкам, филовирюсы появились несколько тысяч лет назад [43,44]. Другие оценки предполагают гораздо более древнее появление – порядка нескольких миллионов лет назад, о чем свидетельствуют филовирюсоподобные элементы, включенные в геномы млекопитающих, причем дивергенция родов *Ebolavirus* и *Cuevavirus* от рода *Marburgvirus* произошла в раннем миоцене [115]. Если это так, то остается неизвестным, какое влияние могли иметь филовирюсы на эволюцию млекопитающих в далеком прошлом. Гипотеза о долгосрочной коэволюционной связи с летучими мышами была выдвинута на основе избирательного давления на структуру NPC1 и присутствия эндогенных вирусных элементов [115]. Также были отмечены различия во внутривидовой разнообразии филовирюсов, измеренные с помощью оценок времени для самого недавнего общего предка (MRCA).

Представители вида *Marburg marburgvirus* демонстрируют значительное разнообразие последовательностей и, как считается, MRCA около 700 лет назад. Иная ситуация наблюдается для эболавируса Заира и эболавируса Рестона, которые, как полагают, прошли генетическое бутылочное горлышко в течение последних нескольких десятилетий [110]. В любом случае современная скорость эволюции филовирюсов колеблется примерно от $4,6 \times 10^5$ замен нуклеотидов на сайт в год для суданского эболавируса и до $8,2 \times 10^4$ замен нуклеотидов на сайт в

год для эболавируса Рестона [110]. Разница в скорости изменения отражает разницу в селекционном давлении, поскольку это относится к экологической нише каждого вида вирусов. Что касается патогенных филовирюсов, события, связанные с распространением на популяцию человека, кажется, встречаются нечасто. Генетически разнообразная популяция филовирюсов циркулирует в практически неизвестных природных резервуарах и, по-видимому, колеблется со временем [92].

В результате усовершенствованной технологии секвенирования становится все более возможным отслеживать изменения вирусных геномов в течение одной вспышки [116]. Это позволяет легко идентифицировать видоспецифические адаптации и поднимает вопрос о том, адаптируются ли филовирюсы к человеку с течением времени или ослабляются. Что касается адаптации хозяина, *in vitro* было показано, что аминокислотные замены, наблюдаемые во время вспышки болезни в Западной Африке, изменили GP EBOV, увеличив тропизм для клеток человека и уменьшив тропизм для клеток летучих мышей за счет изменения N-гликозилирования, сигнального пептида GP, связывания NPC1 и различных эпистатических взаимодействий [117,118]. Относительно передачи от человека к человеку, некоторые исследователи указали, что конкретные изменения в геноме EBOV Макона отражают адаптивную эволюцию [119], тогда как другие группы не нашли доказательств [104,120,121]. Несмотря на некоторые первоначальные опасения по поводу увеличения частоты мутаций [106], расширенный анализ показал, что частота мутаций западноафриканского изолята EBOV Макона демонстрирует ту же частоту мутаций, что и те изоляты, которые вызывали предыдущие центральноафриканские вспышки [118], однако широкая передача от человека к человеку привела к накоплению синонимичных и несинонимичных мутаций с неизвестной до сих пор важностью.

1.2 Молекулярная биология GP эболавирусов

Поверхностный гликопротеин (GP) филовирюсов играет особую роль. Являясь единственным поверхностным белком, именно он отвечает за

проникновение вируса в клетку, и антитела против этого белка способны защитить организм от проникновения.

GP всех филовирусов синтезируется как нерасщепленный предшественник GP₀ длиной примерно 680 аминокислот (а.о.). В ходе транслокации от эндоплазматического ретикулума (ER) до аппарата Гольджи происходит котрансляционное отщепление N-концевого сигнального пептида и внутримолекулярное замыкание дисульфидных связей по ключевым остаткам цистеина. В ходе транслокации GP также происходит его гликозилирование N- и O-связанными гликанами, которые потенциально маскируют антигенные эпитопы, в частности, в муциноподобном домене [122,1223]. Затем GP₀ перемещается в транс-Гольджи, где клеточная протеаза фурин (или фурин-подобные протеазы) расщепляет GP₀ в консервативном сайте расщепления на N-концевой GP₁ (примерно 470 аминокислотных остатков) и C-концевой GP₂ (примерно 175 аминокислотных остатков) [123]. Интересно, что это расщепление не является критичным для проникновения вируса [124,125]. GP₁ содержит муциноподобный домен в районе C-конца и область с несколькими консервативными остатками цистеина на N-конце, а также рецепторсвязывающий домен. GP₂ также содержит консервативные остатки цистеина, пептид слияния, гептадные повторы, трансмембранный домен альфа-спирального типа [34,123] и участок, гомологичный консервативному иммуносупрессивному мотиву, обнаруженному в онкогенных ретровирусах [126]. Исследования *in vitro* показали, что этот мотив способен ингибировать CD4 и CD8 клетки человека [127]. После расщепления GP₁ и GP₂ остаются связанные дисульфидными мостиками и ориентируются так, что N-концевые участки соприкасаются друг с другом [128]. Три гетеродимера GP_{1,2} тримеризуются с образованием пепломера GP, шипа на поверхности вириона. Процессу тримеризации способствуют спиральные последовательности гептадных повторов, присутствующие в GP₂, а тримерный GP закрепляется в мембраны посредством трансмембранного домена, также входящего в состав GP₂ [129,130]. Несмотря на то, что большая часть GP связана с мембраной, были обнаружены его свободные формы: диссоциированная из-за

нестабильности дисульфидной связи субъединица GP₁ [123], GP_{1,2}ΔTM (shed GP), а также тримерный GP без трансмембранного домена из-за расщепления металлопротеазой TACE (TNF-α-конвертирующий фермент) [131]. Хотя предполагается, что все GP филовирсов подвергаются процессингу, описанному выше, по LLOV имеется мало данных [132].

Интересной особенностью Эболавируса является наличие дополнительных неструктурных белков, синтезируемых на матрице гена GP, это растворимый гликопротеин (sGP), Δ-пептид, малорастворимый гликопротеин (ssGP) [133,134] (рисунок 4). Синтез различных форм GP является результатом транскрипционного редактирования (редактирования мРНК гена GP путем добавления или удаления нуклеотидов в конкретном сайте, опосредованных вирусной полимеразой) [41,135] и посттрансляционного процессинга предшественников GP (рисунок 4).

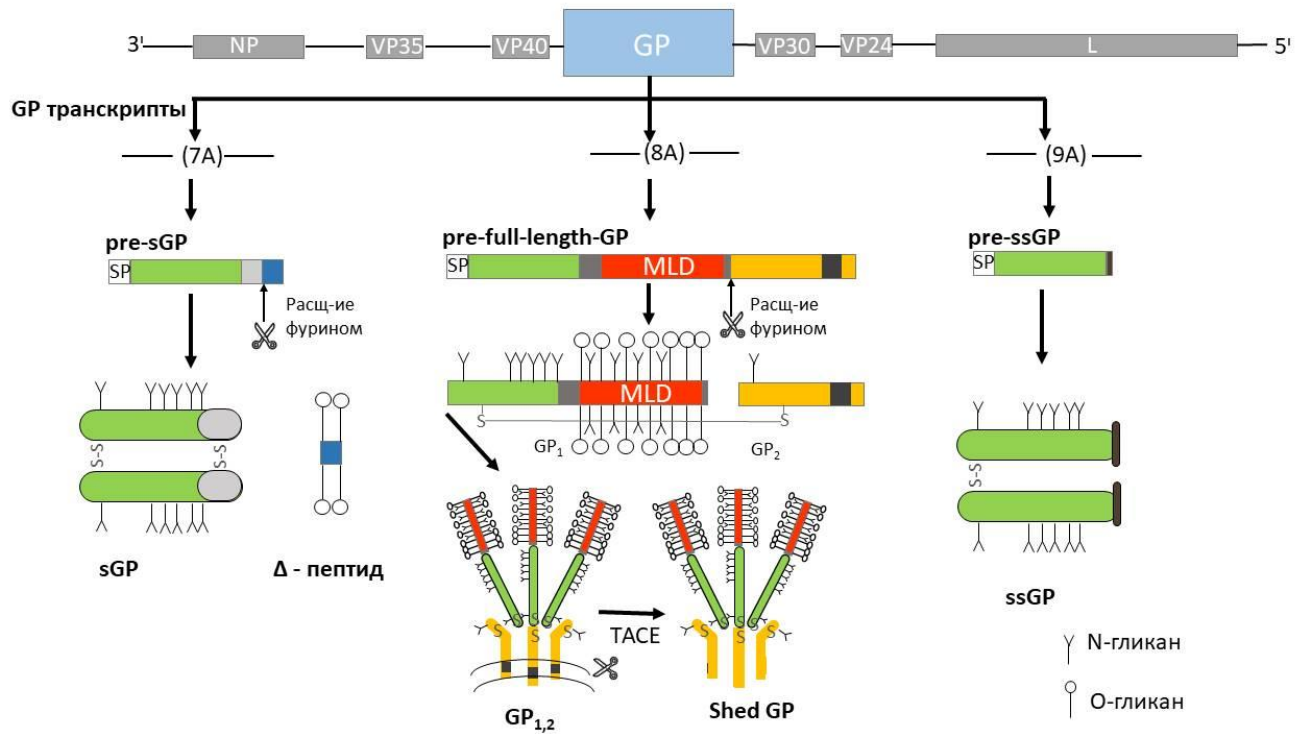


Рисунок 4. Стратегия кодирования GP эболавирусов. Адаптировано из статьи Ning Y. J. [136]. Геном эболавируса содержит семь генов (3'-NP-VP35-VP40-GP-VP30-VP24-L-5'), среди которых ген GP кодирует три предшественника GP, в результате чего образуются несколько белковых продуктов GP. Первичным продуктом гена GP является пре-sGP, который составляет большинство в пуле продуктов синтеза (например, примерно 71% всех транскриптов в EBOV-инфицированных клетках Vero E6) без сдвига ОРТ и может расщепляться, давая N-гликозилированный димер sGP и O-гликозилированный Δ-пептид. Редактирование транскрипции может происходить на участке, включающем семь остатков уридина в гене GP, что приводит к соответствующим изменениям количества остатков аденозина (A) в транскриптах. Сдвиг +1 приводит к расширенной ОРТ, кодирующей полноразмерный GP (примерно 24% транскриптов), в то время как сдвиг +2 приводит к синтезу ssGP из усеченной ОРТ (примерно 5% транскриптов). Добавление большего количества остатков A или делеция одного нуклеотида A также наблюдается, хотя транскрипты, содержащие 7A, 8A или 9A на сайте редактирования транскрипции, являются наиболее распространенными и кодируют sGP, полноразмерный GP или ssGP соответственно. Полноразмерный предшественник GP расщепляется фурином с образованием дисульфидно-связанного димера GP₁-GP₂, который впоследствии собирается в тример GP_{1,2} и располагается на плазматической или вирусной мембране. Тримеры GP_{1,2} на вирусной мембране действуют как шипы на поверхности вириона, облегчая проникновение вируса. Особенностью GP_{1,2} является то, что он содержит не только N-гликаны, но также обширные O-гликаны, сгруппированные в муциноподобном домене (MLD) субъединицы GP₁. Как показано на диаграмме, в нативной структуре GP₁ MLD (красный) находится над N-концевым доменом. Некоторая часть поверхности GP_{1,2} может быть дополнительно расщеплена TNF-α-конвертирующим ферментом (TACE) в проксимальной к мембране внешней области с высвобождением shed GP. Подобно sGP, зрелый ssGP также образует димер и является N-гликозилированным. ssGP, полноразмерный GP (в частности, GP₁) и sGP имеют общий N-конец (зеленый), но различаются по своим С-концам, таким образом проявляя различные функции.

1.2.1 GP

В гене GP присутствует участок с предсказанной шпилечной структурой, содержащий семь последовательных аденозиновых нуклеотидов [41,137]. Вирусная полимераза делает «остановку» на этом сайте во время транскрипции, что приводит к вставке дополнительного аденозинового нуклеотида в 20% транскриптов. Эта вставка вызывает сдвиг рамки считывания кодирующей РНК и обуславливает синтез продукта, содержащего 676 аминокислотных остатков (677 аминокислот в REBOV), GP₀ [138]. В результате сдвига рамки считывания GP и sGP имеют идентичный N-конец из 295 аминокислот, но разные C-концы. Различие C-концевых последовательностей является причиной разного количества дисульфидных связей и различия структур. В то время как sGP является димером, конечный GP является тримером. Исходный pre-GP EBOV расщепляется фурином в области, содержащей несколько остатков основных аминокислот (аргинин, лизин) на две субъединицы: GP₁ и GP₂, которые остаются связанными дисульфидной связью между Cys53 GP₁ и Cys609 GP₂ [123,139]. Этот гетеродимер (GP₁ + GP₂) собирается в тример 450 кДа на поверхности почкующихся вирионов.

GP ответственен за критические патогенные различия между вирусными видами. Экспрессия аденовирусом ZEBOV GP вызывает повреждение эндотелиальных клеток как в эксплантах сосудов человека, так и у обезьян, в то время как REBOV проявляет цитотоксичность только для сосудов обезьян. ZEBOV и REBOV также различаются по чувствительности к расщеплению фурином [123] и аминокислотной последовательностью в сайте расщепления TACE [131]. В экспериментах на клетках HEK293T показано, что сверхэкспрессия GP вызывает цитотоксичность и подавляет регуляцию ряда белков клеточной поверхности, включая несколько белков, участвующих в клеточной адгезии (β 1-интегрин, α 5-интегрин и α V-интегрин) и иммунном надзоре (MHC I) [140–144]. Цитотоксичность, вызываемая GP, зависит от муциноподобного домена [141,142]. Однако, роль цитотоксичности GP в патогенезе EBOV остается плохо изученной,

поскольку конститутивный умеренный синтез GP EBOV не вызывает округления клеток и не оказывает цитотоксичности [141].

Субъединица GP₁ отвечает за клеточное прикрепление и содержит предполагаемую рецепторсвязывающую область, а также муциноподобный домен. GP₁ можно разделить на три субдомена: основание (I), головка (II) и гликановый колпачок (III) (рисунок 5). Субдомен I содержит четыре участка (а.о. 33–69, 95–104, 158–167 и 176–189), образующих гидрофобную полукруглую поверхность, которая взаимодействует с внутренней петлей слияния и участком гептадного повтора GP₂. Этот субдомен образует зажим, который, вероятно, стабилизирует конформацию преслияния GP₂, тем самым предотвращая его преждевременное «разворачивание». Также в субдомene I находится Cys53, который образует межмолекулярную дисульфидную связь с Cys609 субъединицы GP₂. Головка GP₁ представляет собой центральный субдомен, расположенный между основанием и гликановым колпачком, состоящий из четырех участков (а.о. 70–94, 105–157, 168–175 и 214–226). Гликановый колпачок GP₁ состоит из полипептидной цепи, включающей а.о. 227–310, которая формирует α/β -укладку над субдоменом II. Внутри субдомена III обнаружен кластер по крайней мере четырех N-связанных олигосахаридов (связанных с Asn228, Asn238, Asn257 и Asn268). С C-концевой области к гликановому колпачку примыкает муциноподобный домен GP₁, состоящий примерно из 150 аминокислотных остатков. Предполагается, что этот домен не обладает упорядоченной вторичной структурой, однако содержит множество сайтов гликозилирования (4 N- и примерно 13 O-связанных гликанов). Кристаллизация GP потребовала вырезания муциноподобного домена, чтобы улучшить химическую и конформационную гомогенность образца [145].

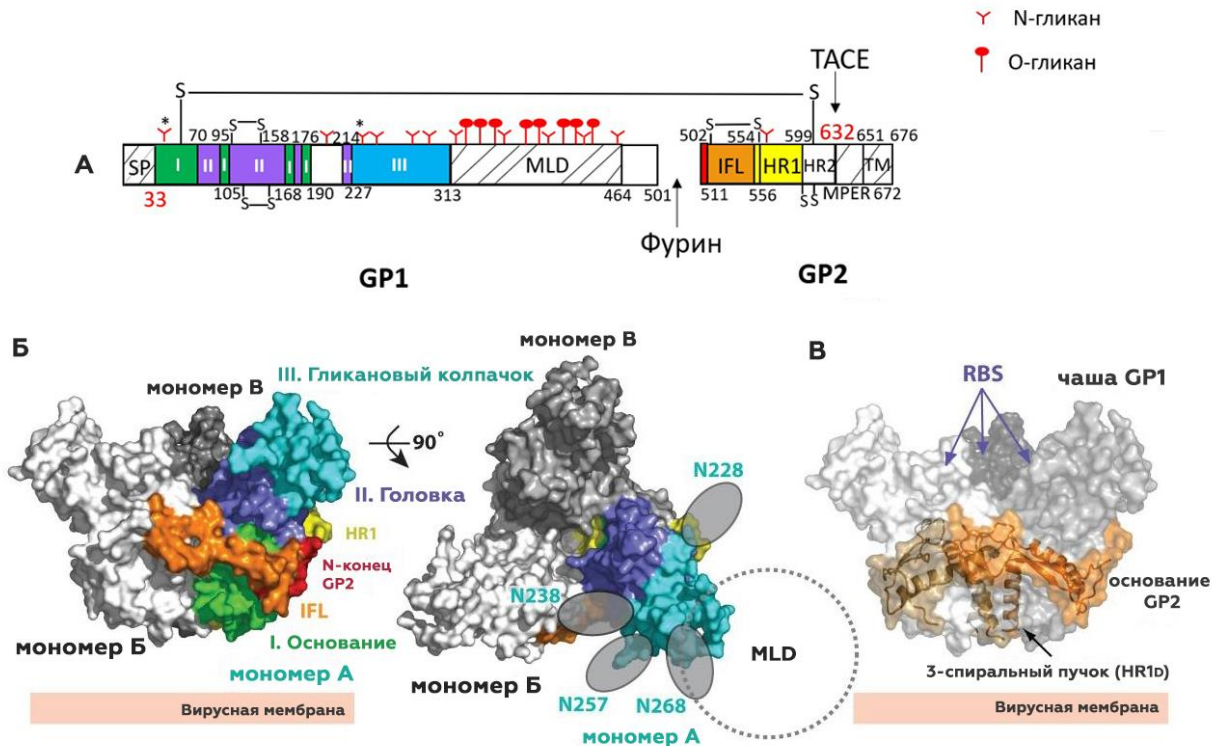


Рисунок 5. Структура GP эболавируса заир. Адаптировано из статьи Lee J. E. [146].

А. Схема доменов GP. Белые и заштрихованные области обозначают кристаллографически неупорядоченные области и участки, удаленные из белка для проведения анализа. SP – сигнальный пептид; I – основание GP₁; II – головка GP₁; III – гликановый колпачок GP₁; MLD – муциноподобный домен; IFL – внутренняя петля слияния; HR1 – гептадный повтор 1; HR2 – гептадный повтор 2; MPER – проксимальная к мембране наружная область; и TM – трансмембранный домен.

Б. Молекулярная поверхность тримера GP, если смотреть сбоку (слева) и сверху (справа), если смотреть вниз по оси третьего порядка. Мономер А окрашен в соответствии со схемой А, а мономеры Б и В тримера показаны белым и серым цветом соответственно. Предсказанные N-связанные олигосахариды (N228, N238, N257 и N268), входящие в состав гликанового колпачка мономера А, показаны серыми овалами.

В. Основание EBOV GP. Три субъединицы GP₁, образующие чашу, показаны разными оттенками серого, а субъединицы GP₂, образующие основание, показаны в виде лент разных оттенков оранжевого цвета под прозрачной молекулярной поверхностью. Предполагаемые сайты связывания рецепторов (RBS) расположены во внутренней части чаши тримера GP.

Субъединица GP₂ отвечает за слияние мембран вируса и клетки-хозяина и содержит гидрофобную внутреннюю петлю слияния, два гептадных повтора (HR1 и HR2), мотив дисульфидной связи CX6CC, проксимальную к мембране внешнюю область и трансмембранную последовательность [147]. Внутренняя петля слияния – остатки 511–556 – содержит ряд гидрофобных а.о. (Leu529, Trp531, Ile532, Pro533, Tyr534, Phe535 и Pro537), ограниченных антипараллельным, дисульфидно-связанным β-каркасом. В состоянии преслияния

внутренняя петля слияния оборачивается вокруг внешней стороны тримера GP. Гидрофобные радикалы боковых цепей а.о. оказываются изолированы от растворителя за счет упаковки в соседний мономер GP₁. Интересно, что хотя GP относится к I классу вирусных белков слияния, его внутренняя структура петли слияния сильно отличается от таковой у других вирусных белков этого класса. Например, последовательность слияния в гемагглютинине вируса гриппа (HA)[148] и вирусе парагриппа 5 F [149] образуют спирали и располагаются на свободном N-конце GP₂, высвобождаемом в результате ферментативного расщепления. Напротив, петля слияния EBOV больше напоминает петли слияния со структурой β-слоя из GP класса II и III, таких как E белок флавивирусов [148–151], G белок вируса везикулярного стоматита [152,153] и gB HSV-1 [154]. В кристаллической структуре ZEBOV GP упорядочен только первый гептадный повтор, и эту область можно структурно разделить на четыре сегмента: HR1A, HR1B, HR1C и HR1D. Первые два сегмента, HR1A и HR1B (а.о. 554–575), образуют α-спираль с изгибом приблизительно 40° на Thr565, который отделяет HR1A от HR1B. Необычная периодичность 3–4–4–3, вместо периодичности 3–4 гептадных повторов, расположена внутри изгиба между HR1A и HR1B. Было высказано предположение, что подобное расположение действует как конформационный переключатель [155], наблюдаемый также у вируса парагриппа [156]. HR1C (а.о. 576–582) образует удлиненный спиральный линкер между HR1B и сегментом HR1D из 16 а.о. (а.о. 583–598). HR1D образует амфипатическую спираль, причем гидрофобные грани трех спиралей в тримере упаковываются вместе, образуя поверхность раздела пепломера.

Смесь гликанов сложного, олигоманнозного и гибридного типа обнаруживается в составе муциноподобного домена GP₁. Гликаны в основной структуре GP (без MLD) за пределами муциноподобного домена, вероятно, имеют сложную природу, поскольку GP с удаленным MLD чувствителен к дегликозильрованию пептид-N-гликозидазой F, но не эндогликозидазой H [157]. Молекулярное моделирование N-связанных гликанов сложного типа в структуре GP выявляет плотное покрытие ими поверхности GP. Это покрытие затрагивает

интактную часть GP, а муциноподобный домен содержит примерно 17 дополнительных олигосахаридных цепей. Гликокаликс, окружающий GP, вероятно, образует щит, который защищает его от гуморального иммунного ответа и/или придает стабильность вирусной частице в целом [144].

По мере того, как на поверхности вириона появляются шипы, тримерные комплексы GP_{1,2} опосредуют процессы проникновения эболавируса, начальные этапы вирусной инфекции, при этом GP₁ действует как рецепторсвязывающая субъединица, а GP₂ – как субъединица слияния мембран [134,158,159]. Благодаря своей способности связываться с различными молекулами клеточной поверхности, GP_{1,2} в значительной степени определяет широкий клеточный тропизм эболавирусов, которые могут инфицировать широкий спектр типов клеток, включая иммунные клетки (моноциты, макрофаги и дендритные клетки) и многие другие типы тканевых клеток (эндотелиальные клетки, гепатоциты, клетки коры надпочечников и некоторые эпителиальные клетки) [160–162].

Заражение этих клеток эболавирусами и связанное с этим нарушение нормальной физиологии клеток, несомненно, играет важную роль в сложном патогенезе эболавируса. Например, помимо нарушений иммунных/воспалительных реакций хозяина, вызванных инфекцией иммунных клеток, инфицированные моноциты, макрофаги и дендритные клетки, вероятно, способствуют распространению вируса от начального очага инфекции к региональным лимфатическим узлам и печени, селезенке и другим тканям/органам через кровеносную и лимфатическую системы, особенно потому, что эти иммунные клетки являются ранними и предпочтительными сайтами репликации эболавирусов [163,164,165]. Кроме того, инфекции в печени и, как следствие, гепатоцеллюлярный некроз могут нарушать синтез факторов свертывания и других белков плазмы, что способствует геморрагическим тенденциям, наблюдаемым у инфицированных людей, в то время как адренкортикальная инфекция и некроз могут нарушать функцию надпочечников и ингибировать синтез стероидов, способствуя развитию гипотонии, гиповолемии и шока, которые часто наблюдаются при БВВЭ.

Компоненты врожденной иммунной системы и особенно ответ, включающий интерферон I типа (IFN), обеспечивают устойчивую линию защиты от вирусных инфекций. Индукция IFN и передача сигналов приводят к установлению противовирусного состояния хозяина за счет индукции экспрессии более 300 IFN-стимулированных генов, которые могут ограничивать репликацию и распространение вируса, воздействуя на несколько аспектов жизненного цикла вируса [166–170]. Однако вирусы, особенно высокопатогенные вирусы геморрагической лихорадки, обладают различными стратегиями противодействия этим противовирусным реакциям [171–176]. Полноразмерный GP проявляет антагонистическую активность против врожденной иммунной системы за счет взаимодействия с тетерином, IFN-индуцированным противовирусным фактором [176–178]. Тетерин представляет собой трансмембранный белок II типа [180]. Тетерин ограничивает высвобождение некоторых оболочечных вирусов из инфицированных клеток, удерживая вирионы на поверхности клетки за счет одновременного прикрепления как к плазматической мембране, так и к оболочке вируса [179,181–186]. Полноразмерный GP эболавируса может противодействовать противовирусной активности тетерина, облегчая завершение почкования вируса [178]. Таким образом, в дополнение к своей важной роли в проникновении вируса, полноразмерный GP также вносит вклад в почкование вируса, не только участвуя в сборке вируса в качестве структурного гликопротеина шипа, но также путем антагонизма противовирусной активности, опосредованной тетерином. Хотя механизм, лежащий в основе антагонизма тетерина со стороны полноразмерного GP, еще четко не определен, показано, что GP эболавируса не оказывает заметного влияния на уровень экспрессии тетерина на поверхности клетки и не препятствует ассоциации тетерина с липидными рафтами, но может блокировать взаимодействие тетерина с VP40, первичным матриксным белком, играющим ключевую роль в сборке вируса и почковании, и это может способствовать наблюдаемой антагонистической активности [178,187–191].

1.2.2 sGP

Первичная открытая рамка трансляции консервативна среди всех генов GP эболавирусов. Она кодирует неструктурный белок, включающий 364 аминокислотных остатка и названный секретлируемым GP (sGP) [125,192]. Посттрансляционное протеолитическое расщепление pre-sGP фурином дает зрелый sGP и гликозилированный, небольшой, неструктурный секретлируемый белок, называемый Δ -пептидом [139]. Мономеры sGP соединены в параллельной ориентации двумя дисульфидными связями между парными остатками Cys53-Cys53 и Cys306-Cys306 с образованием гомодимера размером 110 кДа [192–194,138]. Зрелый sGP имеет шесть предсказанных сайтов N-гликозилирования, однако остатки углеводов обнаруживаются только в пяти, sGP также содержит редкую модификацию, в которой атом углерода индол-С2 Trp288 присоединен к α -маннопиранозильной группе [143].

При естественном инфицировании EBOV в крови инфицированных пациентов обнаруживаются большие количества sGP [137]. Антитела, которые содержатся в сыворотке выживших, по-видимому, предпочтительно распознают sGP, а не GP [144]. Следовательно, sGP может играть роль в уклонении от гуморального иммунного ответа путем поглощения вызванных антител. Также предполагается, что sGP играет противовоспалительную роль, индуцируя восстановление функции эндотелиального барьера [195].

1.2.3 ssGP

В то время как добавление дополнительного аденозина приводит к продукции GP, удаление одного или добавление двух аденозинов во время транскрипционного редактирования приводит к экспрессии третьего продукта – неструктурного небольшого sGP, называемого ssGP [140]. Также как и sGP и GP, ssGP содержит общие 295 N-концевых остатков, но отличается на С-конце и считается мономерным. Сходные молекулярные массы sGP и ssGP, низкая представленность ssGP (кодируется <5% транскриптов GP) (рисунок 4) и

отсутствие ssGP-специфических антител затрудняют обнаружение ssGP с помощью традиционной методологии [18]. ssGP, по сути, является усеченной формой sGP, и два белка имеют идентичную N-концевую последовательность (295 аминокислотных остатков) (рисунок 4). Более того, зрелый ssGP в значительной степени гликозилирован и образует гомодимеры таким же образом, как sGP [18] (рисунок 4). Однако, несмотря на сходство в биохимических свойствах и первичной последовательности sGP и ssGP, ssGP не демонстрирует противовоспалительную активность, проявляемую sGP, которая устраняет вызванную TNF- α потерю функции эндотелиального барьера [17,196].

1.2.4 Shed GP

Shed GP является продуктом протеолитического расщепления GP_{1,2} ферментом TACE [131] (рисунок 4). Shed GP высвобождается с поверхности клетки в значительных количествах в растворимой тримерной форме [131]. Протеолитическое расщепление приводит к отщеплению от трансмембранного якоря субъединицы GP₂ (рисунок 4). Благодаря сохранению своих антигенных свойств, Shed GP может распознаваться анти-GP_{1,2}-антителами и проявлять ложную функцию, уменьшая количество анти-GP_{1,2}-антител, которые в противном случае связывались бы с GP_{1,2} и потенциально индуцировали элиминацию вирусов и инфицированных клеток [131].

Недавно было показано, что Shed GP запускает активацию неинфицированных дендритных клеток и макрофагов, что приводит к обильной экспрессии воспалительных цитокинов аналогично GP_{1,2} [197]. Интересно, что антитела против TLR4 могут эффективно блокировать активацию иммунных клеток, опосредованную shed GP; более того, обработка shed GP дегликозилазами или маннозосвязывающим лектином может ингибировать активность shed GP [197]. Эти результаты наталкивают на предположение, что клеточная передача сигналов TLR4 и поверхностные гликаны shed GP, вероятно, вовлечены в воспалительную активацию, связанную с эболавирусной инфекцией. Кроме того,

подобно GP_{1,2}, shed GP может также активировать передачу сигналов LSECtin и запускать секрецию провоспалительных цитокинов дендритными клетками [198]. Более того, обработка монослоев HUVEC с помощью shed GP увеличивает их проницаемость, указывая на прямое влияние shed GP на повреждение эндотелиального барьера [198]. В сочетании со значительной активностью некоторых воспалительных цитокинов, в частности TNF- α [193], при нарушении целостности эндотелиального барьера, эти данные указывают на то, что нарушение эндотелиальных барьеров может быть опосредовано самим shed GP, по неизвестному механизму или опосредованно через выделение вызванных GP воспалительных цитокинов [197].

1.2.5 Δ -пептид

Δ -пептид был впервые описан Volchkoва и др. в ходе исследования процессинга и созревания sGP. sGP является N-гликозилированным, тогда как Δ -пептид является O-гликозилированным [139] (рисунок 4). Продукция Δ -пептида является консервативной для всех видов эболавирусов, что предполагает важную роль (или роли) для этого пептида.

Radoshitzky и др. сообщили, что Δ -пептиды нескольких патогенных эболавирусов (EBOV, SUDV и TAFV) могут эффективно связываться с клетками, в которых происходит репликация филовирюсов, и ингибировать MARV и вход в клетки, опосредованный GP_{1,2} [199], хотя MARV не продуцирует Δ -пептиды. Напротив, Δ -пептид RESTV проявляет меньшую эффективность связывания с клетками и не оказывает очевидного ингибирующего действия на проникновение филовирюсов в клетки, что указывает на потенциальную роль Δ -пептида в определении вирулентности вируса [199]. Подавление проникновения эболавируса с помощью Δ -пептида, который является продуктом, появляющимся после инфицирования клетки, может предотвратить суперинфекцию вируса и тем самым способствовать распространению вируса и систематической инфекции. Хотя механизм опосредованного Δ -пептидом ингибирования филовирюсной инфекции остается неясным, нарушение проникновения в клетки как MARV, так

и эболавирусов Δ-пептидами предполагает, что эти пептиды, вероятно, препятствуют общему пути проникновения филовирuсов [199].

Gallagher и Garry выполнили анализ последовательностей и компьютерное моделирование для идентификации консервативной амфипатической области в Δ-пептидах филовирuсов (особенно EBOV) с высоким сходством с цитолитическим пептидным мотивом неструктурного белка 4 (NSP4) ротавирuса [200]. Авторы предположили, что Δ-пептиды могут служить виropоринами, повреждающими мембраны, тем самым внося свой вклад в патогенез эболавируса [200]. Накопление Δ-пептидов в клетках можно объяснить их удержанием после того, как произошла секреция основной части sGP [200].

1.3 Псевдовирuсы как инструмент изучения поверхностных вирусных белков

В 1911 году Rous опубликовал первый отчет о неклеточном фильтруемом агенте, который мог вызвать рак – саркому кур [201]. Этот агент позже был назван вирусом саркомы Рауса (RSV) и был использован для создания первых псевдотипов вирусa [202].

Rubin и его коллеги [203] обнаружили, что инфекционные частицы RSV не высвобождались из клеток саркомы во время инфицирования только RSV. Однако, коинфекция вспомогательным Rous-ассоциированным вирусом (RAV) птичьего лейкоза клеток зараженных RSV приводила к формированию инфекционного потомства RSV и RAV (поскольку RSV и RAV являются антигенно неродственными птичьими ретровирuсами С-типа, и их можно дифференцировать). Важно отметить, что также было показано: полученные частицы RSV включали геном RSV, но только внешнюю «оболочку» RAV; это подтверждалось серологически, а также по разному профилю клеточного тропизма [202,203]. Подобные гибридные частицы были названы «псевдотипами».

Удивительным свойством ретровирuсов, таких как RSV, является их естественная способность включать другие клеточные белки, в том числе белки оболочки других вирусa [204–206]. Обнаружение того, что вирус

иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1) эффективно включает белки оболочки Т-лимфотрофного вируса человека (HTLV-1) [204], позволило рассматривать этот вирус как удобную платформу для создания рекомбинантных псевдовирuсов. Независимо было обнаружено, что вирус мышиногo лейкоза (MLV или вирус мышиногo лейкоза Молони, MoMLV) способен обеспечивать формирование инфекционных частиц с белками оболочки HTLV-1 [207].

В настоящее время для обозначения белкового нуклеокапсида, заключающего в себе геном (РНК), используют термин «ядро» (core), а внешняя мембрана подобных вирусных частиц, полученная из мембраны клетки-хозяина во время выхода вируса путем «почкования», называется «оболочкой» (envelope). Таким образом, встроенные в мембрану белки включаются в вирусную оболочку и определяют антигенность частиц и клеточный тропизм. Термин «псевдотипированный вирус» (pseudotyped virus, PV) или «псевдовирuс» (pseudovirus) обозначает вирусную частицу, содержащую ядро первого вируса, окруженное клеточной мембраной, несущей белок (белки) оболочки второго, чужеродного вируса. Генетический материал, упакованный в PV, не содержит функциональных генов поверхностных белков. Следовательно, псевдовирuсы способны только проникать в клетку-мишень и обеспечивать процесс трансляции, инициируя репликацию нуклеиновой кислоты без образования инфекционных частиц. Существует ряд терминов, обозначающих псевдовирuсы: псевдотипы, псевдовирuсы, псевдочастицы, вирусные псевдотипы, ленти- или ретровирuсные вектора, транскомплементированные вирусy, вектора для переноса генов и вирусоподобные частицы. Чаще всего используют термин поверхностный вирусный белок, а не «гликопротеины вируса», так как не все поверхностные белки вирусy гликозилированы (например, белок М флавивирuсов).

Функциональные псевдовирuсы могут быть получены путем трансфекции клеток двумя или тремя плазмидами. «Основой» (backbone) псевдовирuса является вирусная частица, включающая как белки, так и рекомбинантный геном (рисунок 6). Это сочетание важно, потому что упаковка генома опосредована специфическими взаимодействиями между последовательностями в геноме и

вирусными белками (капсидными, матриксными и др.). Наиболее часто используемой «основой» псевдовирuсов являются ретровирусы (ВИЧ или MLV), для которых коровая экспрессионная плазмида кодирует гены gag и pol без сигнала упаковки. Рекомбинантный геном обычно включает репортерный ген, такой как ген люциферазы, фланкированный ретровирусными длинными концевыми повторами (LTR) и сигналом упаковки (ψ). Третья плазмида обеспечивает синтез поверхностного белка интересующего вируса.

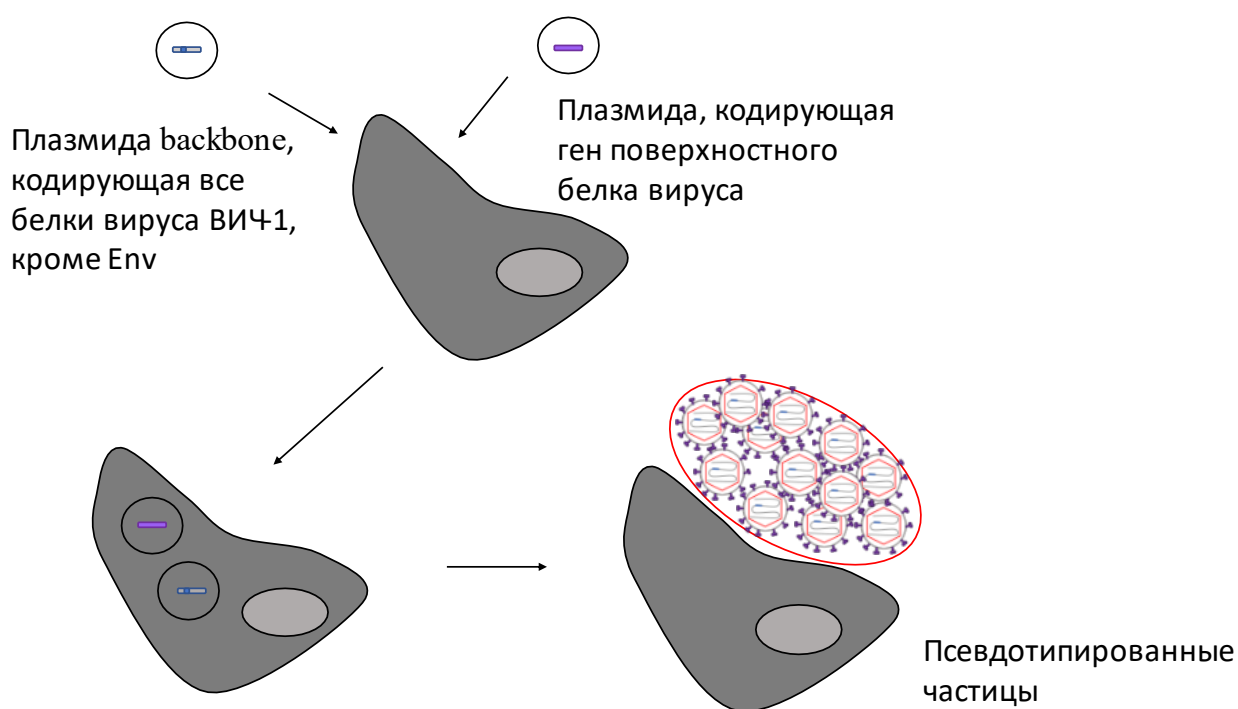


Рисунок 6. Схема сборки псевдовирuсов на основе лентивирuсов.

В последние годы не меньшую популярность приобрели псевдовирuсы на основе системы почкования вируса везикулярного стоматита. Если для почкования лентивирuсов важен комплекс gag и gag-pol (то есть капсидные белки), то в случае ВВС почкование определяется системой матриксный белок – нуклеопротеиновый комплекс, поэтому реализация этого подхода невозможна с использованием только плазмид. Для преодоления этой сложности Whitt разработал оригинальную систему, позволяющую проводить быструю «смену» поверхностного гликопротеина. Для этого используют вирусные частицы, содержащие дефектный по белку G геном, ими инфицируют клетки,

предварительно трансфицированные рекомбинантной плазмидой, содержащей последовательность вирусного поверхностного гликопротеина (рисунок 7) [2]. Для удобства анализа инфекционности в дефектный геном ВВС встраивают репортерные последовательности (люцифераза, GFP и др.) [208].

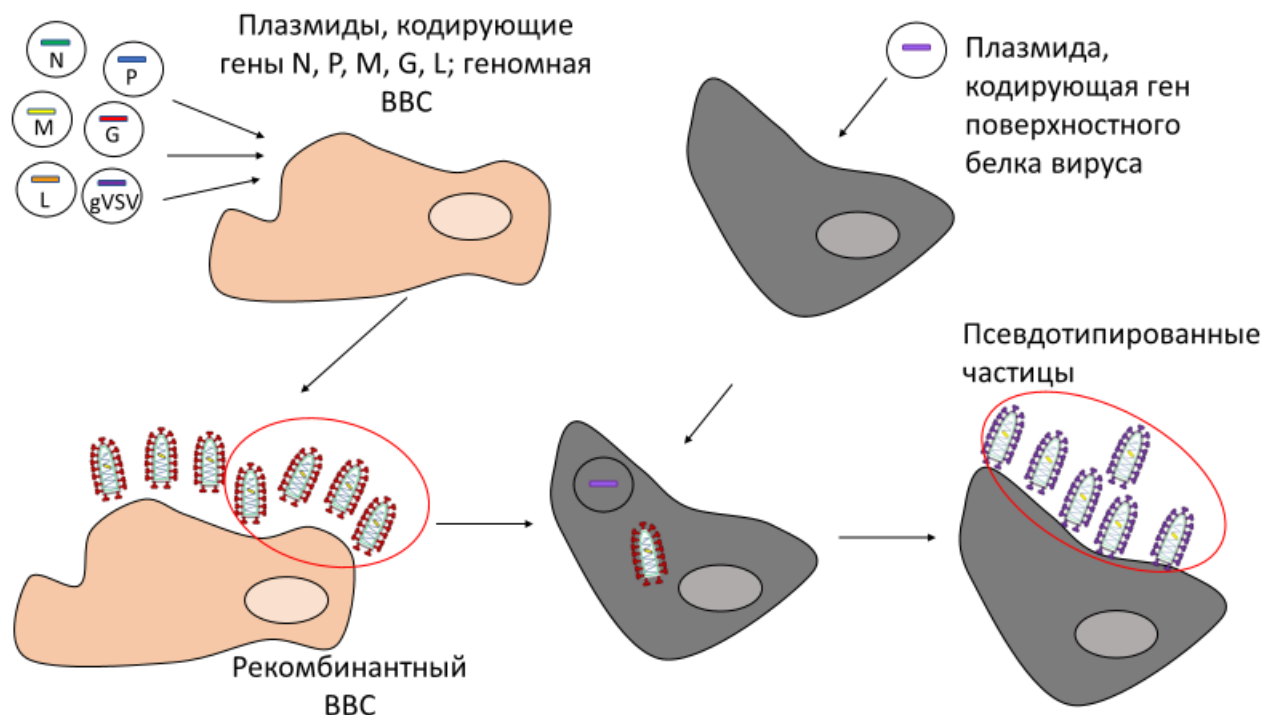


Рисунок 7. Схема сборки псевдовирuсов на основе рабдовирусов.

1.3.1 Использование псевдовирuсов

Ключевой особенностью псевдовирuсов является то, что они являются дефектными по репликации и поэтому могут быть широко использованы в лабораториях, не обладающих уровнем BSL3-4 (независимо от происхождения поверхностного вирусного белка) и являются особенно привлекательными при изучении высокопатогенных вирусoв.

Псевдовирuсы позволяют быстро получать ключевые данные для характеристики взаимодействий вирус-хозяин. Эффективность использования псевдовирuсов была подтверждена во время работ по изучению вспышки ближневосточного респираторного синдрома (MERS) [209,210–212]. Во время недавней вспышки БВВЭ псевдовирuсы были успешно использованы в высокопроизводительных скрининговых исследованиях, что помогло

идентифицировать потенциальные противовирусные препараты и ингибиторы проникновения филовируса [213–215], а также при изучении жизненного цикла вируса и взаимодействия вирусных рецепторов [216].

Псевдовirusы широко использовались для исследования каскада проникновения вируса гепатита С (ВГС, HCV), для которого до недавнего времени не существовало надежной системы культивирования. Два гликопротеина ВГС, E1 и E2, удалось успешно экспонировать на поверхности псевдовirusных частиц, первоначально как модифицированные гликопротеины системы псевдотипирования VSV [217], а затем как немодифицированные конструкции с использованием систем псевдотипирования MLV [206] и HIV [217]. Путь проникновения генетически разнообразных штаммов ВГС был проанализирован с использованием этих экспериментальных систем, выявив потребность в множестве рецепторов [206,219–222]. И E1, и E2 необходимы для сборки инфекционных псевдовirusов, при этом E2 действует как шаперон для включения E1, взаимодействуя как с E1, так и с ретровirusными белками [223]. Использование псевдовirusов для исследования влияния конкретных точечных мутаций на проникновение ВГС также позволило выявить ключевые аминокислоты, участвующие во взаимодействиях с рецепторами [224–226]. Тем не менее сравнение с натуральными virusами ВГС показало, что псевдовirusы менее устойчивы к изменениям *in vitro*.

1.3.2 Использование псевдовirusов для изучения антител

Псевдовirusы широко используются в качестве замены натуральных virusов в анализах нейтрализации (или микронейтрализации). Для большинства тестов нейтрализации серийные разведения сывороток инкубируют с заранее определенным количеством псевдовirusов (количественно определенным путем измерения экспрессии репортерного гена) в течение одного часа при 37 °С. Затем добавляется фиксированное количество чувствительных к virusу клеток-мишеней и измеряется экспрессия репортерного гена после соответствующего периода инкубации (например, 48 часов). Титр антител обычно выражается как

максимальное разведение образца, которое снижает экспрессию репортерного гена либо на 50% (IC50), либо на 90% (IC90) по сравнению с контролем [227]. Использование псевдовирuses для реакции нейтрализации обычно экономит количество образца, а включение ряда различных репортерных генов позволяет адаптировать псевдовирuses к различным форматам высокопроизводительного скрининга [228,229].

Сравнительные серологические исследования высокопатогенного птичьего гриппа подтипа H5 подтвердили, что результаты более традиционных серологических анализов, таких как торможение гемагглютинации, микронейтрализация и единичный радиальный гемолиз, хорошо коррелируют с результатами, полученными с помощью реакции нейтрализации [230]. Считается, что более низкая плотность дисплея гемагглютинина на поверхности псевдовирuses гриппа по сравнению с натуральным вирусом обеспечивает лучшую доступность для кроссреактивных антител, реагирующих с основанием поверхностного белка. Таким образом, реакцию нейтрализации можно использовать для измерения антител, генерируемых прототипом «универсальных вакцин», состоящих из фрагментов ствола гемагглютинина. Эти антитела нельзя измерить с помощью классического теста ингибирования гемагглютинации, поскольку он основан на измерении блокирования антител против рецепторсвязывающего сайта на глобулярной головке гемагглютинина [231,232].

Псевдовирuses также широко использовались для создания теста нейтрализации против различных штаммов ВГС как сыворотками крови [206,233,234], так и моноклональными антителами [235–239]. Это позволило обнаружить существование широко нейтрализующих антител, генерируемых во время естественной инфекции [240,241] и после иммунизации вакцинами [242,243]. Исследования с использованием псевдовирuses показали, что сыворотка содержит факторы, отличные от антител, которые могут нейтрализовать проникновение ВГС [212,244,245], в то время как аполипротеиновые компоненты сыворотки могут повышать инфекционность ВГС и защищать от нейтрализации, опосредованной антителами [219,246]. Прямое

сравнение псевдовирuсов ВГС и натурального вируса показало, что псевдовирuсы более устойчивы к нейтрализации, опосредованной антителами [238], что позволяет предположить, что реакция вируснейтрализации может завышать количество антител, необходимых для клинического применения.

Сравнение результатов нейтрализации, полученных с использованием псевдовирuсов на основе ВВС и лентивирuсов, несущих белки филовирuсов, с результатами, полученными при использовании натурального вируса, показывает, что первая ближе имитирует иммунологические особенности филовирuсов. Эта система была успешно использована не только для филовирuсов и ареновирuсов [6], но и для буньявирuсов [247].

Система получения псевдовирuсов HIV-1 на лентивирuсной основе успешно используется для оценки поствакцинального иммунитета в вакцинных исследованиях уже больше 20 лет. Однако, сравнение множества различных анализов в нескольких лабораториях показало, что псевдовирuсы, как правило, более чувствительны к нейтрализации, чем натуральный вирус [248,249]. Таким образом, псевдовирuсы позволяют не только определять эффективность нейтрализации ингибиторов против одного штамма вируса, но и представляют собой мощный и быстрый метод сравнения чувствительности к нейтрализации множества различных штаммов или вариантов.

1.3.3 Использование псевдовирuсов в качестве иммуногенов

Продукция нейтрализующих антител является признаком успешной вакцинации, приводящей к защите от вирусных инфекций [250]. Поскольку поверхностные белки являются ключевыми мишенями гуморального иммунитета, псевдовирuсы, способные экспонировать различные белки, могут быть очень полезной платформой для разработки вакцины. Действительно, было показано, что иммунизация псевдовирuсами на основе ВВС защищает мышей от заражения гриппом [251]. В качестве вакцинной платформы псевдовирuсы можно сравнивать с вирусоподобными частицами [252].

1.4 Заключение

В настоящее время к *Filoviridae* относят несколько родов: *Ebolavirus*, *Marburgvirus*, *Cuevavirus*, *Dianlovirus*, *Striavirus*, *Thamnovirus*. В 2019 г. обнаружен *Mengla dianlovirus*, выделенный в отдельный род – *Dianlovirus*. В 2011 г. обнаружены филовирусы рыб – *Xilang striavirus*, *Huangjiao thamnovirus*, *Thamnovirus kanderense*, *Thamnovirus percae*, выделенные в два отдельных рода – *Striavirus* и *Thamnovirus*. Считается, что резервуаром описанных филовирусов являются несколько видов летучих мышей (*Mops condylurus*, *Chaerephon pumilus*, *Rousettus aegyptiacus*, *Miniopterus schreibersii*, *Rousettus sp.*) и рыб (*Antennarius striatus*, *Thamnaconus septentrionalis*). Среди обширного семейства *Filoviridae*, относящегося к 1 группе патогенности, самым опасным является *Zaire ebolavirus*. Вспышка БВВЭ в 2013-2016 годах не только привела к разрушительным последствиям для здоровья и явным социально-экономическим последствиям в Западной Африке, но и вызвала глобальную угрозу в связи с появлением завозных случаев за пределами Африки. Для борьбы с этим вирусом необходимы эффективные профилактические и терапевтические методы.

Принимая во внимание важную роль поверхностного гликопротеина GP в проникновении вируса и его многогранную функцию в вирусном патогенезе, этот белок является важной и привлекательной мишенью для поиска терапевтических препаратов и индукции специфического иммунитета. GP ответственен за критические патогенные различия между вирусными видами. В экспериментах на клетках НЕК293Т показано, что сверхэкспрессия GP вызывает цитотоксичность и подавляет регуляцию ряда белков клеточной поверхности, включая несколько белков, участвующих в клеточной адгезии и иммунном надзоре. Субъединица GP₁ отвечает за клеточное прикрепление и содержит предполагаемую рецепторсвязывающую область, а также муциноподобный домен. GP₁ можно разделить на три субдомена: основание, головка и гликановый колпачок. Головка GP₁ представляет собой центральный субдомен, расположенный между основанием и гликановым колпачком. Гликановый колпачок GP₁ содержит кластер по крайней мере четырех N-связанных олигосахаридов. С С-концевой

области к гликановому колпачку примыкает муциноподобный домен GP₁, состоящий примерно из 150 аминокислотных остатков и содержащий смесь гликанов сложного, олигоманнозного и гибридного типов. Гликаны в основной структуре GP (без MLD) за пределами муциноподобного домена, вероятно, имеют сложную природу. Гликокаликс, окружающий GP, вероятно, образует щит, который защищает его от гуморального иммунного ответа и/или придает стабильность вирусной частице в целом. Субъединица GP₂ отвечает за слияние мембран вируса и клетки-хозяина и содержит гидрофобную внутреннюю петлю слияния, два гептадных повтора (HR1 и HR2), проксимальную к мембране внешнюю область и трансмембранную последовательность. Интересно, что хотя GP относится к I классу вирусных белков слияния, его внутренняя структура петли слияния сильно отличается от таковой у других вирусных белков этого класса. Нуклеотидная последовательность, кодирующая GP, является матрицей для синтеза еще ряда белков, таких как sGP, ssGP и shed GP. Считается, что эти варианты гликопротеина помогают маскировке эболавируса от факторов гуморального иммунитета, тем самым внося свой вклад в неконтролируемое заражение и распространение вируса.

Термин «псевдотипированный вирус» (pseudotyped virus, PV) или «псевдовирус» (pseudovirus) обозначает вирусную частицу, содержащую ядро первого вируса, окруженное клеточной мембраной, несущей белок (белки) оболочки второго, чужеродного вируса. Генетический материал, упакованный в псевдовирус, не содержит функциональных генов поверхностных белков. Следовательно, псевдовирусы способны только проникать в клетку-мишень и обеспечивать процесс трансляции, инициируя репликацию нуклеиновой кислоты без образования инфекционных частиц. Наиболее распространенные системы псевдотипирования основаны на использовании дефектных ретровирусов, чья система почкования толерантна к типу поверхностных белков и включает полипептид gag-pol.

В последние годы все большее распространение приобрели псевдовирусы на основе рабдовирусной системы почкования. В случае рекомбинантного ВВС,

который чаще всего используется в подобных системах, почкование определяется системой матриксный белок – нуклеопротеиновый комплекс, поэтому реализация этого подхода невозможна с использованием только плазмид. Для этого используют вирусные частицы, содержащие дефектный по белку G геном.

Ключевой особенностью псевдовирусов является то, что они дефектны по репликации, и поэтому могут быть широко использованы в лабораториях уровня BSL1-2. Псевдовirusы позволяют быстро получать ключевые данные для характеристики взаимодействий вирус-хозяин. Эффективность использования псевдовирусов уже была подтверждена во время работ по изучению ряда особо опасных вирусов.

2 Материалы и методы

2.1 Материалы

2.1.1 Основные компоненты для приготовления питательных сред, реактивы, реагенты и прочие материалы

Дрожжевой экстракт (Difco, США); агар (Difco, США); агароза (Helicon, Россия); селективный антибиотик для бактериальных культур ампициллин натриевая соль (Биосинтез, Россия); триптон (Difco, США); бромфеноловый синий (Helicon, Россия); глицерин (Merck, США); натрия хлорид (Helicon, Россия); трипановый синий (Helicon, Россия).

Наборы для выделения ДНК

Набор для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Clean up Standard («Евроген», Россия), набор для выделения и очистки плазмидной ДНК из культуры *E. coli* Plasmid Miniprep («Евроген», Россия).

Наборы для выделения и очистки плазмидной ДНК из культуры *E. coli* QIAprep Spin Miniprep, Midiprep, Giga («Qiagen», Германия).

Питательные среды и компоненты для работы с эукариотическими клетками

Питательная среда DMEM/F12 без L-глутамина (Вектор, Россия); L-глутамин (Sigma, США; Вектор, Россия); фетальная бычья сыворотка (Gibco, США); раствор трипсина-версена (1:1) (Вектор, Россия); Lipofectamin 3000 (Invitrogen, США); 5×буфер для лизиса клеточной культуры (Promega, США); субстрат для анализа активности люциферазы, LAR (Promega, США); диметилсульфоксид (PanReas AppliChem, Испания); МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (AppliChem, Германия); селективный антибиотик блеомицин сульфат (European Pharmacopoeia, Франция); сульфат гентамицина (Gibco, США).

Питательные среды для работы с бактериями

LB-среда, на 1 л: триптон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 5 г, pH 7,5 – 7,6.

LB-агар, на 1 л: триптон – 10 г, дрожжевой экстракт – 5 г, NaCl – 5 г, агар – 15 г, pH 7,5 – 7,6.

SOC-среда, на 1 л: триптон – 20 г, дрожжевой экстракт – 5,5 г, 0,01 М NaCl, 0,01 М KCl, 0,02 М глюкозы, 0,02 М MgCl₂.

SOB-среда, на 1 л: триптон – 20 г, дрожжевой экстракт – 5,5 г, 0,01 М NaCl, 0,01 М KCl, 0,02 М MgCl₂.

Все питательные среды стерилизовали автоклавированием при 1,2 атм (127 °С) в течение 30 мин.

Буферы и растворы

ТАЕ: Трис-HCl – 40 мМ; ацетат натрия – 20 мМ; ЭДТА – 2 мМ; pH 8,0.

CaCl₂: 50 мМ CaCl₂, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0.

Раствор для нанесения ДНК: 0,25%-й бромфеноловый синий, 0,25%-й ксиленианол, 50%-й водный раствор глицерина.

Раствор бромистого этидия (10 мг/мл).

0,4%-ный раствор трипанового синего в буферном изотоническом солевом растворе, pH 7,2- 7,3.

При необходимости растворы стерилизовали путем фильтрации через мембранный фильтр 0,22 мкм (TRP, Швейцария).

Ферменты и маркеры молекулярных масс ДНК и белков

Маркер длин фрагментов ДНК M12 (СибЭнзим, Россия); 2× реакционная смесь БиоМастер HS-Тaq ПЦР-Color для ПЦР (Биолабмикс, Россия).

РНКаза А (Thermo Fisher Scientific, США); Тaq ДНК-полимераза (Сибэнзим, Россия); ДНК-лигаза фага Т4 (Сибэнзим, Россия).

Эндонуклеазы рестрикции

AfeI, BamHI, AsuNI, XmaI, NotI, BseXI, CcinI (Сибэнзим, Россия).

Бактерии, плазмиды

Штаммы *Escherichia coli*, использованные в работе (получены из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»):

NEB Stable (F' *proAB lacIq Δ(lacZ)M15 zzz::Tn10 (TetR)/Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- ø80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC).*

Плазмиды, использованные в работе:

phMGfp (Promega, США); pSG3ΔEnv (получена по программе NIH AIDS Reagent Program, США); pCMV(CAT)T7-SB100 (любезно предоставлена канд. биол. наук Кулемзиным С.В.)

Эукариотические клеточные линии

В работе использовали культуры клеток:

TZM-bl (JC53-bl) – линия HeLa/CD4/CCR5 (получена по программе NIH AIDS Reagent Program, США).

НЕК 293Т – перевиваемая линия клеток почки эмбриона человека; получена из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия).

Vero – перевиваемая линия клеток почки зеленой мартышки; получена из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия).

MDCK – перевиваемая линия клеток Мадин-Дарби почки собаки; получена из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия).

СПЭВ (SPEV) – перевиваемая культура клеток почки эмбриона свиньи; получена из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия).

Tb1.lu – перевиваемая линия клеток лёгкого летучей мыши; получена из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия).

Mv1.lu – перевиваемая линия клеток лёгкого эмбрионов алеутской норки; получена из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия).

СНО-К1 – перевиваемая линия клеток яичника китайского хомячка; получена из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия).

Лабораторные животные

Куры *Gallus domesticus* породы Леггорн белый в количестве 12 особей, массой 1,5-2 кг. Куплены на птицефабрике «Комсомольская» (Барнаул,

Алтайский край). Их содержали на стандартном рационе питания и свободном доступе к воде в виварии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

2.2 Методы

2.2.1 ПЦР

ПЦР проводили на приборе БИС М-111-05-60 (Россия). 25 мкл реакционной смеси содержало 10xBuffer, 200 мкМ dNTP, 5 мМ MgCl₂, 20 pM каждого праймера, 0,5 ед. taq-полимеразы, 50 нг раствора ДНК.

Аmplification последовательностей гликопротеинов проводили по следующему алгоритму: 95 °С – 5 мин (1 цикл); 95 °С – 15 сек, 56 °С – 40 сек, 72 °С - 1 мин (30 циклов); 72 °С – 8 мин (1 цикл). Амплифицированный фрагмент наносили на агарозный гель и очищали с помощью Gel Extraction Kit производства фирмы QIAGEN.

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованные в работе

Наименование	Последовательность, 5'- 3'
R-EBOV-2	gtcgactcattaccggagacagggaga
F-EBOV-1	tccggagacaaaactcacacatgccac
Mut-F	cgactcactataggctagccg
Mut-R	accctcactaaaggaagcg
Ebola MPD(-)1	tagcccgccaccccaaggatagctcttactgcgaattttctagt
Ebola MPD(-)2	ctatccttgggggtggccgggctaatacaggcgggagaagaactcga
517-F	ccaatgcaaccctaattfacatgcctggactactcagg
517-R	cctgagtagtccaggcatgtaattagggtgcatgg
F-EBOLAphMGFP	tttgctagccgccaccatggcggttacaggaatattgcagtt
R-EBOLAphMGFP	tttttcggccgaaactaaaagacaaattgcatatac
522-F	attfacattactggactactcagcttgaaggtgctgcaatcgg
522-R	ccgattgcagcacctcaagctgagtagtccagtaattgtaaat
548-F	gggaattfacatagaggggctcgcgcacaatcaagatggttta
548-R	taaaccatcttgattgtgcgcgagccctctatgtaaattccc
V19-ADI-F	aaaaacacgtgggaagccctggccccggccgccaccatgatgaggcccatc gtgctggtgctgctgttcgccacctcagcgtggccggcgaggtgcagctggtgga gtc
V19-ADI-L-R	cagagccgccgccgctaccaccaccaccaagctcacagt gaccaggg

Окончание Таблицы 1

V19-ADI-L-F	tagcggcgggcgggcggtctggtggtggtggatccgatattgtgct gacacagtctcct
V19-ADI-R	aaaaaagtcgacaactctctccggagccacccttgattccac cttggtccc

2.2.2 Ферментативный гидролиз ДНК

Реакционная смесь содержит 0,2-10 мкг ДНК в буфере, рекомендованным фирмой-изготовителем, и соответствующую эндонуклеазу рестрикции из расчета 10 ед. акт. на 1 мкг ДНК. Гидролиз проводился в условиях, рекомендованных производителем. ДНК осаждали этанолом из рестрикционной смеси добавлением ацетата натрия 3М 1/10 объема и 3 объема перегнанного абсолютного этанола. Осадок осторожно промывается чистым спиртом и высушивается. Высушенный осадок растворяется в необходимом объеме воды.

2.2.3 Встраивание фрагментов ДНК в плазмидный вектор

Для встройки фрагментов в плазмидный вектор в лигазную смесь вносили ДНК плазмидного вектора, расщепленного соответствующей эндонуклеазой рестрикции, и эквимольные количества фрагментов, обработанные соответствующими рестриктазами. При необходимости использовали пяти- или десятикратный избыток фрагментов ДНК, или пятикратный избыток синтетических олигонуклеотидов. Лигирование проводили в течение 12-16 часов при 4 °С в буфере, содержащем 66 мМ Tris-HCl, pH 7,68, 25 мМ MgCl₂, 5 мМ ДТТ и 1 мМ АТФ. На 1 мкг ДНК использовалось 1-2 ед. акт. ДНК-лигазы фага T4.

2.2.4 Выделение ПЦР-продуктов из агарозного геля

Выделение ПЦР-продуктов из агарозного геля проводили с использованием набора реагентов Cleanup Standard (Евроген, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя.

2.2.5 Трансформация клеток *E.coli* плазмидной ДНК

Данный метод трансформации бактерий плазмидной ДНК применяется наиболее часто. Выход трансформантов составляет 10^5 - 10^7 на 1 мкг интактной ДНК плазмиды при использовании штамма *E.coli* NEB Stable.

В колбе на 500 мл смешивается 100 мл бульона LB и 1 мл ночной культуры бактерий. Выращиваются при 37 °С с перемешиванием 180 об/мин в течение 2-4 часов. Полученная культура охлаждается во льду в течение 10 мин, полученная суспензия центрифугируется при 4000 g в течение 5 мин при 4 °С. Надосадочная жидкость удаляется, оставшийся осадок ресуспендируется в половине начального объема охлажденного во льду стерильного раствора 50 мМ CaCl₂+10 мМ трис-НСl, рН 8,0. Полученная суспензия клеток помещается в ледяную баню на 15 мин, а затем суспензия центрифугируется при 4000 g в течение 5 мин при 4 °С. Удаляется надосадочная жидкость, ресуспендируются клетки в 1/15 начального объема охлажденного во льду стерильного раствора 50 мМ CaCl₂+10 мМ трис-НСl, рН 8,0. Аликвоты переносятся объемом по 0,2 мл в предварительно охлажденные пробирки. Добавляется ДНК в буфере, применяемом в реакции с лигированием. Перемешивается и инкубируется во льду 30 мин. Пробы переносятся в водяную баню (42 °С) на 2 мин. К пробе добавляется 1 мл LB и инкубируется 30-60 мин при 37 °С. За это время происходит восстановление и начинается экспрессия генов устойчивости к антибиотикам. Необходимый объем переносится на плотную агарозную среду и равномерно распределяется по поверхности шпателем досуха. Чашки инкубируются при 37 °С в течение 12-16 часов.

2.2.6 Трансформация компетентных клеток *E.coli* NEB Stable методом heat-shock

К 50 мкл компетентных клеток NEB Stable добавляли 5 мкл лигирующей смеси. Инкубировали на льду 30 минут. Далее проводили тепловой шок при 42 °С в течение 30 секунд на водяной бане. После этого инкубировали на льду 2 минуты и добавляли 1 мл LB-среды. Инкубировали 1 час при 37 °С в термошейкере. Затем

культуру осаждали центрифугированием 6000 об/мин на центрифуге (Eppendorf) в течение 2 минут, отбирали супернатант, ресуспендировали биомассу в 100 мкл LB и высевали на чашки с LB-агаром (100 мг/мл ампициллин). Инкубировали всю ночь при 37 °С.

2.2.7 Скрининг колоний

Отбор клонов, содержащих плазмиду с геном поверхностного гликопротеина, проводили при помощи амплификации с фланкирующими праймерами. Для этого часть колонии брали микробиологической петлей, погружали в ПЦР-смесь (БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×)), затем пробирки с реакционной смесью ставили в ПЦР-амплификатор. Результаты ПЦР оценивали с помощью электрофоретического разделения образцов в 1% агарозном геле.

2.2.8 Электрофоретическое фракционирование ДНК

Фракционирование фрагментов ДНК проводилось с помощью электрофореза. Использовался 1% агарозный гель в TAE-буфере. В лунки приготовленного агарозного 1% геля наносится ДНК-маркер и бромфеноловый синий, аликвота исследуемой ДНК и бромфеноловый синий, также наносится исходная ДНК с бромфеноловым синим для контроля.

2.2.9 Выделение ДНК из геля

После проведения электрофореза в 1% агарозном геле, с помощью скальпеля вырезается необходимый участок и помещается в заранее взвешенную пробирку. В пробирку добавляется буфер для связывания с гелем в количестве 1:1 (объем : вес, 100 мкл на каждые 100 мг геля). Пробирка инкубируется при 50-60 °С в течение 10 мин (до полного растворения агарозного геля), при периодическом переворачивании пробирки для равномерного нагревания и полного растворения. После полного растворения геля нужно недолго перемешать на шейкере. Растворенный гель переносится на колонку и

центрифугируется в течение 1 мин при 7000 g. Удаляется колонка и сливается раствор из пробирки, колонка помещается в эту же пробирку. В колонку приливается 700 мкл буфера для промывки и центрифугируется в течение 1 мин при 7000 g. Удаляется колонка и сливается раствор из пробирки, колонка помещается в эту же пробирку. Колонка центрифугируется в течение 1 мин при 7000 g для полного удаления моющего буфера. Колонка помещается в чистую пробирку и в центр мембраны добавляется 25 мкл буфера для элюции, инкубируется 1 мин и центрифугируется при 7000 g, данная процедура повторяется дважды.

2.2.10 Выделение плазмидной ДНК с помощью набора (miniprep)

Выделение ДНК проводилось из ночной культуры бактериальных клеток *E.coli* штамма NEB Stable, трансформированной GP. Отбирается аликвота и переносится в пробирку. Центрифугируется при 6000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. Надосадочная жидкость сливается, к осадку добавляется Resuspension solution и перемешивается быстрым переворачиванием. Добавляется Lysis solution и перемешивается переворачиванием 4-6 раз. Далее к раствору добавляется Neutralization solution и при помощи быстрого переворачивания пробирки перемешивается раствор. Раствор центрифугируется в течение 5 мин при 10000-14000 об/мин. Надосадочная жидкость переносится в колонку и центрифугируется 1 мин при 10000-14000 об/мин. Извлекается колонка, жидкость, прошедшая через колонку, удаляется, и колонку помещают в эту же пробирку. В колонку приливается Wash solution и центрифугируется в течение 30-60 сек, сливается жидкость, как описано выше, и добавляется снова Wash solution и центрифугируется в течение 30-60 сек и сливается жидкость. Для удаления остатков растворов центрифугируется 1 мин. Колонка переносится в чистую пробирку и в центр мембраны добавляется раствор Elution buffer и инкубируется 2 мин при комнатной температуре, а после центрифугируется 2 мин.

2.2.11 Анализ нуклеотидных последовательностей

Секвенирование проводили сотрудники ЦКП "Геномика" ИХБФМ СО РАН (Новосибирск). Использовался набор CEQ2000Dye Terminator Cycle Sequencing Kit и 16-капиллярный автоматический секвенатор ABI 3130xl.

2.2.12 Культивирование культур клеток

В исследованиях были использованы перевиваемые культуры клеток почки человека (НЕК 293Т и НЕК 293FT), полученные из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Монослой клеток выращивали в т75 культуральных флаконах и 96-луночных планшетах в среде DMEM (Вектор, Новосибирск) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, США) в присутствии гентамицина (50 мкг/мл). В качестве поддерживающей среды при культивировании клеток с псевдовирусами использовали ту же среду, содержащую 2% сыворотки.

2.2.13 Катионно-липидная трансфекция

В пробирку с бессывороточной средой вносится необходимое количество плазмидной ДНК, добавляется компонент P3000 (2 мкл на 1 мкг плазмидной ДНК), во вторую пробирку с бессывороточной средой вносится компонент Lipofectamine 3000. Содержимое пробирок тщательно пипетируется и объединяется. Инкубируется при комнатной температуре 15-20 минут, затем переносится по каплям в культуральный флакон. Флакон помещается на 48-72 часов в CO₂-инкубатор. По истечению времени культуральную среду собирают и центрифугируют при 5000 об/мин для избавления от клеточного дебриса.

2.2.14 Кальций-фосфатный метод трансфекции

В отдельные стерильные пробирки вносят растворы А и В. Раствор А содержит: 23,5 мкг плазмидной ДНК, 74,5 мкл 2,5 М CaCl₂, стерильной водой доводят до 0,75 мл; раствор В содержит: 0,75 мл 2X HBS (NaCl 0,28 М, HEPES (N-

2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid; 0,05 M), Na₂HPO₄ (1,5 mM) pH 7,05). Раствор А постепенно по каплям добавляется к раствору В. Инкубируется при комнатной температуре 20 минут. Преципитат переносится по каплям в культуральный флакон. Флакон помещается на 16 часов в CO₂-инкубатор. Затем среду с фосфатом кальция заменяют на ростовую. Флакон помещается на 48 часов в CO₂-инкубатор. По истечению времени культуральную среду собирают и центрифугируют при 5000 об/мин для избавления от клеточного дебриса.

2.2.15 Функциональный анализ псевдовиральных частиц

В 96-луночный плоскодонный планшет вносят 50 мкл суспензии клеток (100 тыс./мл), затем в лунки добавляют по 50 мкл псевдовиральных частиц. Инкубируют 48 часов в CO₂-инкубаторе. По истечению времени из лунок планшета удаляют ростовую среду, промывают 100 мкл PBS, добавляют 40 мкл 1х лизирующего буфера, 10 минут инкубируют при комнатной температуре, суспензируют и переносят по 35 мкл в оптический планшет, добавляя 35 мкл LAR (Promega), и считывают результаты на люминометре (LuMate).

2.2.16 Очистка псевдовиральных частиц на сахарозной подушке

Полученные псевдотипированные частицы наслаивали на 20% сахарозу и центрифугировали при 25000 об/мин 4 °C 4 ч. Затем супернатант удаляется, осадок растворяется в PBS, хранить на -80 °C.

2.2.17 Определение цитотоксичности соединений на культуре клеток НЕК

293Т методом МТТ-теста

В 96-луночном плоскодонном планшете к монослою клеток НЕК 293Т вносятся тестируемые соединения методом последовательной разлитровки в 3-кратном повторе. После 72 часов инкубации в каждую лунку добавляется по 20 мкл рабочего раствора МТТ (5 мг/мл). Инкубируется еще 2 часа в условиях

СО₂-инкубатора. Через 2 часа проводится замена среды на раствор ДМСО в каждой лунке. Аккуратно встряхивается планшет до растворения кристаллов формазана. С помощью планшетного ридера определяется оптическая плотность каждой лунки при 530 нм, вычитается измеренное фоновое поглощение при 620 нм.

Выживаемость клеток НЕК 293Т в присутствии исследуемого вещества рассчитывается по формуле: $(\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}) / (\text{ОП контр. лунок} - \text{ОП среды}) \times 100\%$, где ОП — оптическая плотность.

2.2.18 Определение ингибирующей активности соединений

В 96-луночный планшет вносятся последовательные 2-х кратные разведения соединений в 3-х кратном повторе, затем в лунки добавляют по 50 мкл псевдовиральных частиц (100-200 тыс. RLU) и инкубируют в течение 30 минут в СО₂-инкубаторе. По истечении времени инкубации в планшет добавляют суспензию клеток-мишеней. Через 48-72 ч детектируется сигнал люминесценции.

2.2.19 Изоэлектрическое осаждение антител

Предварительно вымытая с детергентом скорлупа яйца осторожно разбивалась и удалялась пинцетом. Содержимое яйца переносили в сепаратор для удаления большей части белка. После отделения желтков переносили на фильтровальную бумагу для удаления остатков белка, прокалывали скальпелем, переносили в пробирку и измеряли объем.

Затем готовили раствор желтка в дистиллированной воде общим объемом 160 мл. С помощью рН метра Agilent 3200P с универсальным электродом и растворов 10 М и 0,1 М HCl доводили раствор до рН 5 и замораживали в течение 12 ч при -20 °С.

В связи с тем, что клетка состоит из воды на 90%, в процессе замораживания происходит увеличение ее объема, клеточная стенка не выдерживает напряжения и разрывается. После раствор оттаивал при комнатной

температуре. При этом освобожденное содержимое клетки переходило в раствор. Так как антитела являются водорастворимыми белками, их можно отделить от липидной части фильтрацией через бумажный фильтр («белая лента»).

В полученный после фильтрации водный раствор белков добавляли хлорид натрия таким образом, чтобы его массовая доля составляла 8,8%. После полного растворения соли раствор доводили до pH 4 и оставляли на 2 ч.

Выпавший осадок отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 4 °С при 4000 об/мин.

Полученный препарат антител загрязнен хлоридом натрия, поэтому подвергается очистке. Для этого осадок IgY растворялся в минимальном объеме PBS и переносился в полупроницаемую мембрану.

Диализ раствора белка проводился в диализной мембране Medicell с размером пор 12-14 кДа против раствора PBS в течение ночи, со сменой раствора утром на свежий и повторным диализом еще в течение трех часов при постоянном перемешивании.

2.2.20 Аффинная хроматография

Очистку рекомбинантного антитела ADI-15742 проводили при помощи аффинной хроматографии с использованием сорбента MabSelect SuRe (GE Healthcare, США). Культуральная жидкость очищалась от дебриса при помощи центрифугирования при 15000 g в течение 25 мин при 4 °С.

Колонка заполнялась сорбентом MabSelect SuRe и промывалась дистиллированной водой. Далее колонка уравнивалась базовым буфером (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,1). Затем наносилась культуральная жидкость, связывание рекомбинантных белков с ионами никеля происходило при скорости 1,5 мл/мин. Далее колонку промывали от несвязавшихся белков, при скорости потока промывочного буфера (20 mM Tris-HCl, pH 6,9) 2 мл/мин. Белки элюировали при скорости потока элюирующего буфера (100 mM Glycine-HCl, pH 2,7) 1 мл/мин. Полученный препарат очищенных антител необходимо нейтрализовать при помощи водного раствора 1 M Tris до pH 6,5-7,0.

Концентрация полученных препаратов проверялась при помощи NanoPhotometer NP80 (Implen, Германия). Затем на колонку наносили промывочный буфер для полного снятия оставшихся белков. Затем колонка промывалась водой с последующим нанесением 20% этанола для консервации.

2.2.21 Определение ингибирующей и полуингибирующей доз селективного антибиотика блеомицина

К монослою культуры клеток CHO-K1 вносили селективный антибиотик блеомицин в концентрациях 0-700 мкг/мл. По истечению времени инкубации (14 суток) сравнивали, при какой концентрации антибиотика у клеток наблюдается 50% выживаемость и 100% гибель.

2.2.22 Статистический анализ результатов

Для статистического анализа данных, построения графиков и диаграмм использовались пакеты программ GraphPad Prism 6 и Microsoft Excel 2016. Данные в таблицах и на графиках представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Для построения структурных формул соединений использовали программу ChemDraw Pro 12.0.2.

2.2.23 Иммунизация кур

В работе использовали кур *Gallus domesticus* породы Леггорн белый в количестве 12 особей, массой 1,5-2 кг.

Препараты лентивирусных и рабдовирусных частиц, псевдотипированных поверхностным гликопротеином GP эболавируса Заир вводили курам внутримышечно в область грудных мышц шестикратно с интервалом в 21-28 дней. В качестве отрицательного контроля использовали кур, которым внутримышечно шестикратно вводили 1 мл физиологического раствора.

Проводили забор куриных яиц за сутки до начала иммунизации и затем с 10 суток ежедневно до окончания эксперимента.

Оценку иммунного ответа вели по IgY, которые выделяли из куриного желтка по методом изоэлектрического осаждения антител. Полученные препараты использовали для постановки реакции вируснейтрализации с псевдовirusами эболавируса Заир.

3 Результаты и обсуждение

3.1 Конструирование плазмид, содержащих ген GP EBOV

Ключевым компонентом для получения псевдовирюсов EBOV является плазида, содержащая ген поверхностного гликопротеина GP эболавирусов. На основе известных аминокислотных последовательностей, кодирующих GP эболавирусов, представленных в GenBank, был проведен дизайн экспрессионных векторов. Нуклеотидную последовательность генов оптимизировали по кодонному составу для экспрессии в клетках млекопитающих, для этого использовали сервис GeneOptimizer. В состав конструкции для увеличения эффективности синтеза белка также была включена последовательность Козак, кроме того, при проектировании учитывали особенность синтеза GP филовирюсов, а именно наличие сайта «проскальзывания» (aaастаааааасстса), для исключения этого эффекта был введен дополнительный нуклеотид (aaастааааАаасстса). Нуклеотидную последовательность синтезировали на заказ фирмой ДНК-синтез (г. Москва, Россия) и клонировали в составе промежуточного вектора рGH. Далее проводили клонирование нуклеотидной последовательности GP в составе вектора рh по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции BamHI и Sfr 274I («СибЭнзим», г. Новосибирск).

Реакция гидролиза вектора и вставки проводилась последовательно каждым ферментом в условиях, рекомендованных производителем, с последующей инактивацией фермента. После первой реакции проводилось переосаждение ДНК. После окончания второй рестрикции весь объем реакционной смеси наносили на 1% агарозный гель в буфере TAE.

После электрофоретического разделения вырезали образец ДНК, соответствующий по длине теоретическому продукту (рисунок 8). ДНК из геля агарозы выделяли с помощью набора (Qiagen gel extraction kit) по методике, описанной производителем.

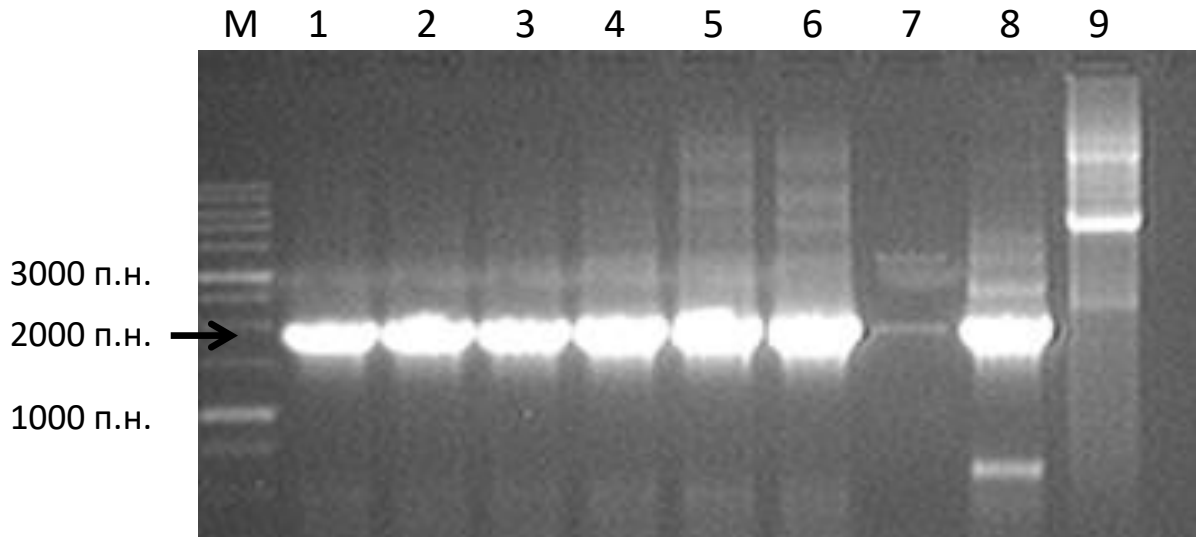


Рисунок 8. Электрофореграмма продуктов ПЦР амплификации гена GP.

М - маркер длин ДНК М12 (СибЭнзим, Россия), 1-6, 8 - положительные образцы, 7, 9 - отрицательные образцы.

Реакцию лигирования проводили с использованием лигазы T4 бактериофага, согласно рекомендациям производителя («СибЭнзим», г. Новосибирск). После этого лигирующей смесью была проведена трансформация клеток *E. coli* штамма NEB Stable. Скрининг бактериальных колоний, содержащих вставку в правильной ориентации, подтверждали ПЦР-анализом и секвенированием.

Следующим шагом стало получение вариантов GP с делецией муциноподобного домена. Поскольку муциноподобный домен может играть роль в уходе от иммунных реакций организма, его наличие мешает точному выявлению мишеней гуморального ответа. Область, кодирующая муциноподобный домен, расположена в средней части гена, примерный размер 500 п.н. Для получения вариантов GP с делецией муциноподобного домена был проведен сайт-направленный мутагенез (рисунок 9). Для проведения ПЦР с использованием плазмиды rhGP в качестве матрицы использовали праймеры: Mut-F, Mut-R, Ebola MPD(-)1 и Ebola MPD(-)2 (праймеры и условия амплификации см. в разделе «Материалы и методы»). Два ПЦР-продукта объединили в одной реакционной смеси, проводили отжиг, а затем проводили

амплификацию, используя фланкирующие праймеры: Mut-F и Mut-R. Полученный продукт Δ MLDGP встраивали в вектор ph (рисунок 9).

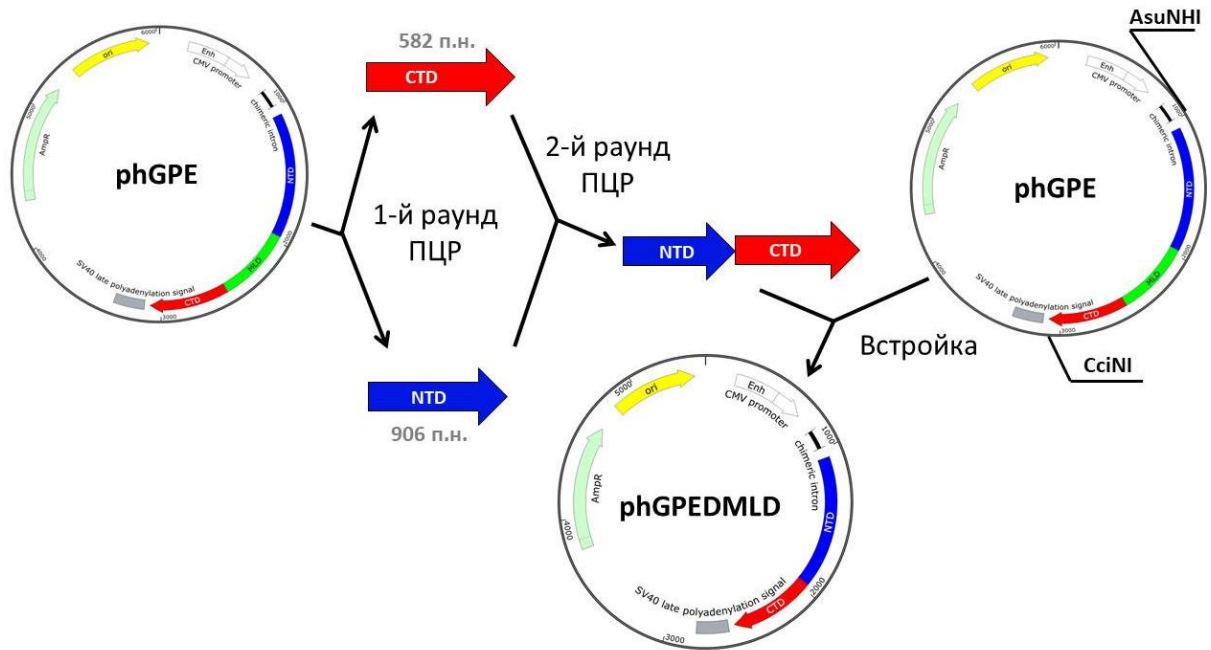


Рисунок 9. Схема получения рекомбинантной плазмиды, кодирующей ген GP без муциноподобного домена.

Скрининг бактериальных колоний, содержащих вставку в правильной ориентации, проводили с помощью ПЦР со специфичными праймерами. Положительные клоны были наработаны, из них выделена плазмидная ДНК, структуру которой подтверждали секвенированием.

3.2 Получение псевдовирусов EBOV и исследование комплекса свойств

В работе для получения псевдовирусов использовали две системы: лентивирусную и на основе вируса везикулярного стоматита.

Лентивирусные псевдовирусы представляют собой вирусные частицы, включающие капсидные белки лентивирусного происхождения, псевдотипированные GP эболавирусов. Такие псевдовирусы содержат дефектный лентивирусный геном, который не способен обеспечить формирование инфекционных дочерних вирионов. Для получения таких вирусных частиц проводили котрансфекцию клеток НЕК293Т двумя плазмидами: плазмидой, содержащей ген поверхностного белка GP, и пакующей плазмидой pSG3 Δ Env.

Через 48 ч собирали культуральную жидкость, содержащую псевдотипированные частицы.

Для получения рабдовирусных псевдовирюсов использовали рекомбинантный вирус везикулярного стоматита (ВВС) с удаленным геном поверхностного гликопротеина (G), вместо которого в геноме расположен ген люциферазы.

Для получения псевдовирюсов проводили трансфекцию культуры клеток НЕК293FT плазмидой, кодирующей поверхностный гликопротеин эболавируса, спустя сутки к этой культуре клеток добавили вирусные частицы rVSVΔG(G). Через 16 ч заменили среду, псевдовирюсы собрали через двое суток. Так как геном этого вируса дефектен по белку G, то вирусное потомство образуется за счет инкорпорации поверхностного гликопротеина, синтезированного в клетках. В результирующие частицы пакуется дефектный геном, содержащий маркерную последовательность люциферазы.

Сборку лентивирусных и рабдовирусных частиц подтверждали электронной микроскопией. Физический титр псевдовирюсных частиц составлял от 1×10^8 до 1×10^{10} частиц/мл. При исследовании препарата лентивирусных псевдовирюсов детектировались круглые частицы, в случае использования вируса везикулярного стоматита наблюдали частицы характерной пулеобразной формы (рисунок 10). Аналогичные функционально активные псевдовирюсы на основе ВВС были получены для родственного филовирюса марбургвируса Марбург [253].

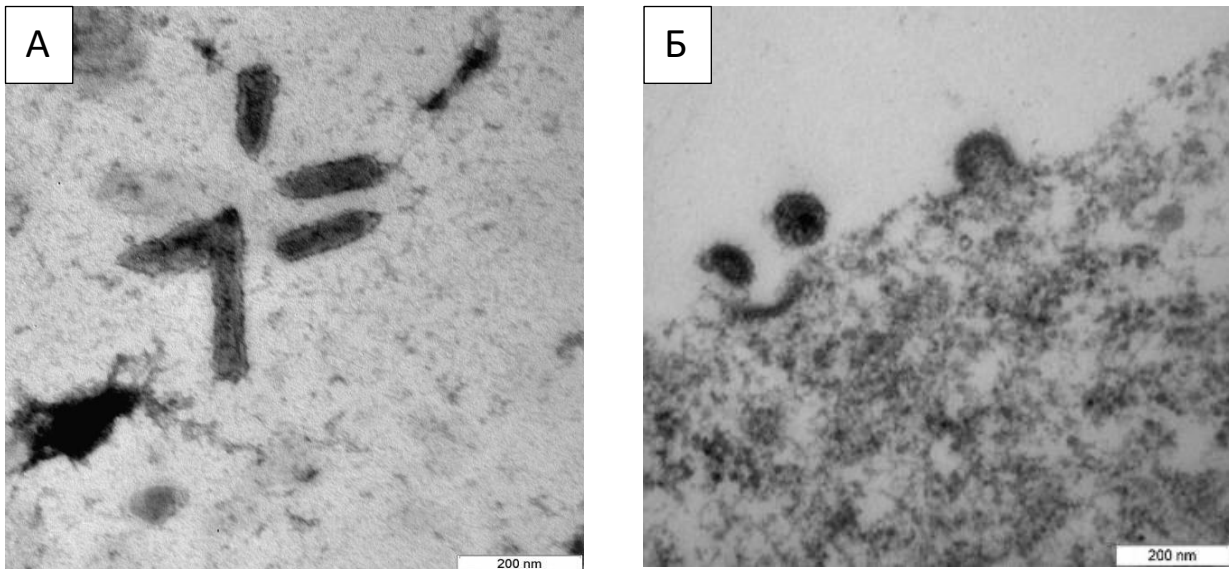


Рисунок 10. А – Электронная микрофотография псевдовирюсов rVSVΔG, псевдотипированных GP эболавируса Заир; Б – Электронная микрофотография клеток HEK293T с почкующимися лентивирусными частицами, псевдотипированными GP эболавируса Заир. Электронные микрофотографии сделаны Зайцевым Б.Н. и Тарановым О.С.

3.2.1 Изучение трансдуцирующей активности псевдовирюсов EBOV

Полученные препараты псевдовирюсных частиц использовали для изучения чувствительности различных культур клеток: HEK293T (почка, человек), Vero (почка, обезьяна), MDCK (почка, собака), СПЭВ (почка, свинья), Tb1.lu (лёгкое, летучая мышь), Mv1.lu (лёгкое, норка). Вариант частиц, псевдотипированных гликопротеином без муциноподобного домена, обладает более высокой трансдуцирующей активностью, зачастую на несколько порядков выше по сравнению с частицами, псевдотипированными полноразмерным гликопротеином (рисунок 11).

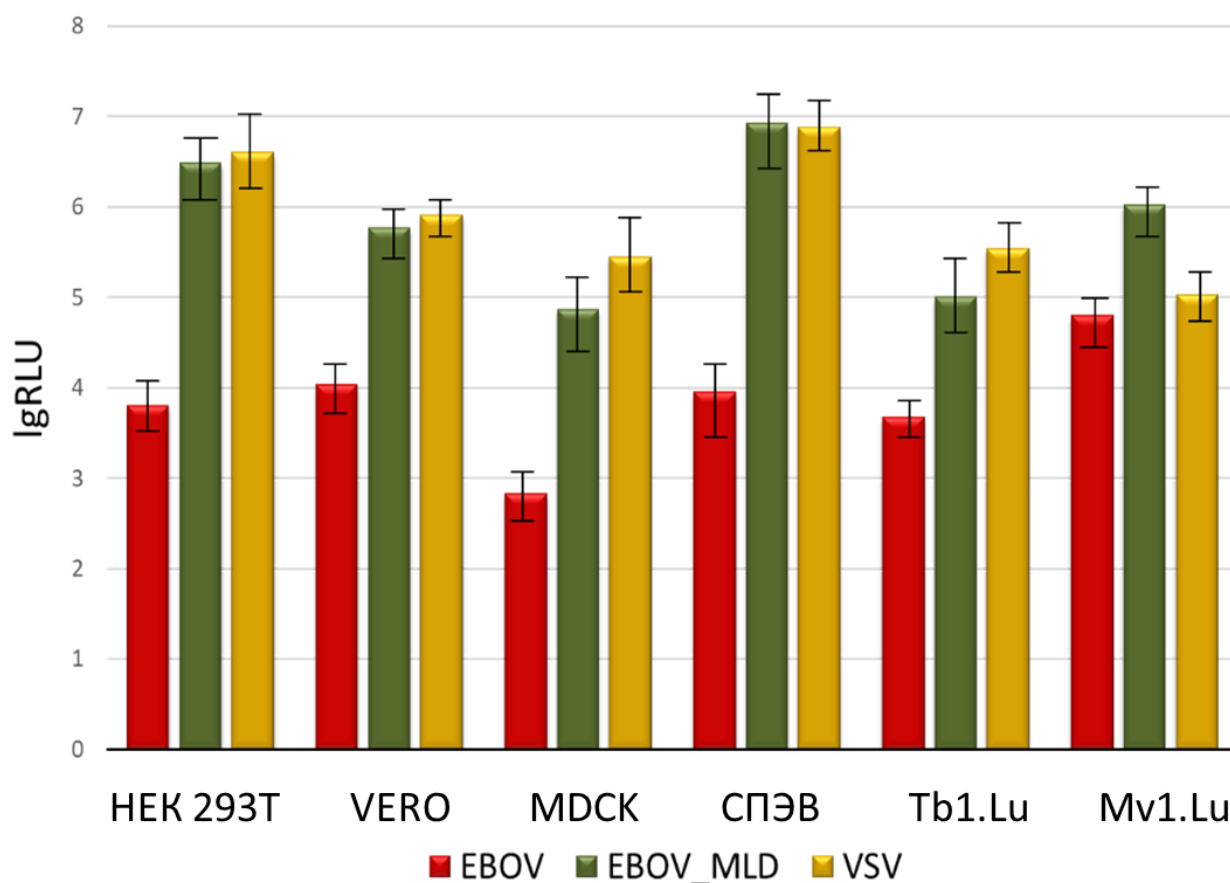


Рисунок 11. Уровень люминесценции, детектируемый для различных клеточных линий после проникновения вирусных частиц, псевдотипированных GP эболавируса Заир. EBOV – частицы, содержащие GP эболавируса, EBOV_MLD – частицы, содержащие GP эболавируса без муциноподобного домена, VSV – частицы, содержащие G BBC.

Наиболее чувствительными были культуры клеток СПЭВ и HEK293T, наименее – MDCK.

3.2.2 Изучение иммунохимических свойств псевдовирюсов EBOV

Для подтверждения антигенных свойств полученных псевдовирюсных частиц, были выбраны два антитела – ADI-15742 и ADI-15999, способные нейтрализовать эболавирусы за счет взаимодействия с консервативным эпитопом, расположенным в петле слияния GP EBOV, описанные ранее [253]. Нуклеотидные последовательности, кодирующие переменные домены легкой и тяжелой цепей этих антител, были синтезированы ООО «ДНК-синтез» (Москва, Россия). Синтезированные последовательности были амплифицированы и клонированы в составе интеграционного вектора pVEAL.

Для получения клеток-продуцентов антител ADI-15742 и ADI-15999 проводили котрансфекцию методом катионно-липидной трансфекции (Lipofectamine 3000, Invitrogen) клеток CHO-K1 двумя плазмидами – pVEAL-15742 (pVEAL-15999) и pCMV(CAT)T7-SB100. Первая содержала последовательность выбранных антител в формате scFv-Fc, вторая содержала последовательность транспозазы SB100.

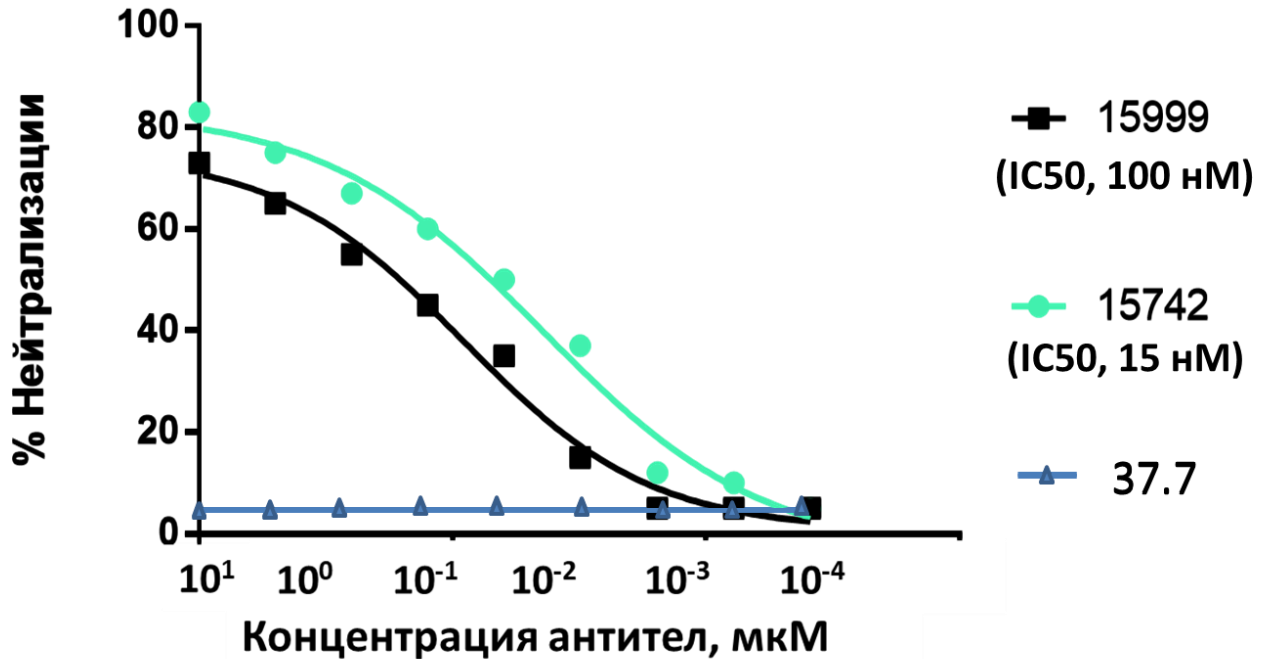


Рисунок 12. Кривые нейтрализации рабдовирусных частиц, псевдотипированных GP эболавируса Заир без муциноподобного домена, рекомбинантными антителами ADI-15742 и ADI-15999. В качестве отрицательного контроля использовали антитело 37.7, нейтрализующее вирус Ласса.

После проведения селекции получили клоны клеточной культуры, продуцирующие рекомбинантный аналог антител ADI-15742 и ADI-15999.

Полученные антитела нейтрализовали псевдовirusы эболавирусов с IC50 в диапазоне 15 - 100 нМ (рисунок 12). Данный результат подтверждает антигенные свойства полученных псевдовirusов эболавируса.

3.2.3 Изучение иммуногенности псевдовirusов EBOV

Анализ иммуногенности псевдовirusов эболавируса Заир проводили на модели кур. Выбор именно этой модели обусловлен рядом преимуществ.

Выделение антител IgY из желтка яиц не требует травмирующей процедуры забора крови и может проводиться многократно. Это позволяет вести подробный контроль динамики уровня специфических антител после иммунизации. Процедура выделения из желтка позволяет получать препараты IgY высокой степени чистоты без использования хроматографических методов и сложного оборудования. При этом количество IgY после выделения достаточно для проведения необходимых измерений (ИФА, вируснейтрализация и т.д.).

Кур – *Gallus domesticus* породы Леггорн белый – иммунизировали очищенными препаратами лентивирусных и рабдовирусных частиц, псевдотипированных поверхностным гликопротеином эболавируса Заир без муциноподобного домена. Доза псевдовирусных частиц составляла 3×10^9 частиц/мл на одно животное. Птицы были разделены на три экспериментальные группы и одну контрольную (3 животных в группе) (рисунок 13).

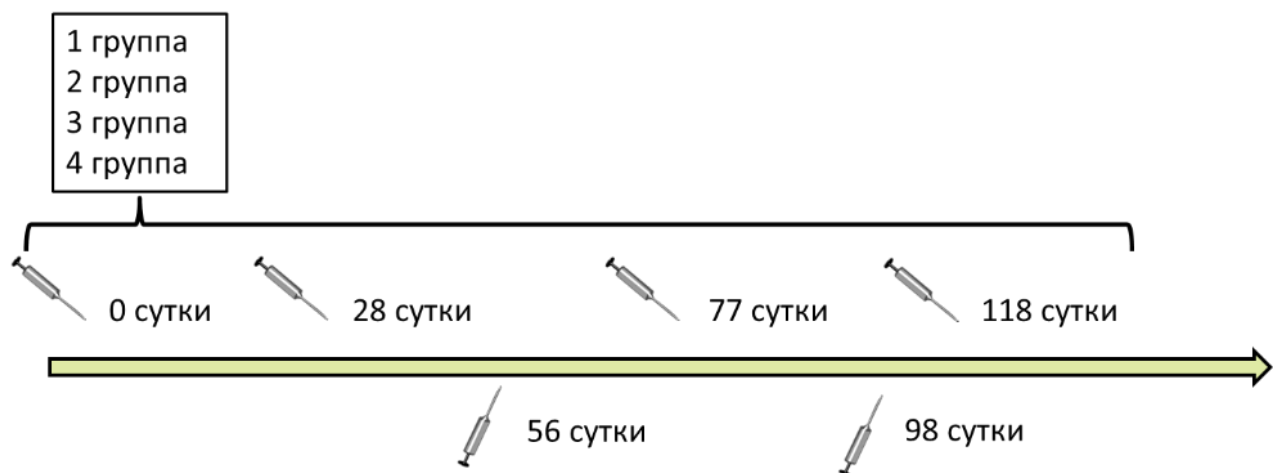


Рисунок 13. Схема иммунизации кур псевдовирусами эболавируса Заир. 1 группа – 3×10^9 лентивирусные частиц; 2 группа – 3×10^9 частицы на основе ВВС; 3 группа – 3×10^9 лентивирусных частиц и 3×10^9 частиц на основе ВВС в комплексе с неполным адьювантом Фрейнда; 4 группа – физ. раствор.

Для каждой группы использовали разный состав иммуногена. Первую иммунизировали лентивирусными частицами в физ. растворе, вторую частицами на основе ВВС в физ. растворе, а третью смесью лентивирусных частиц и частиц на основе ВВС в комплексе с неполным адьювантом Фрейнда. Препараты вводили курам внутримышечно в область грудных мышц шестикратно с интервалом в 21-28 дней (рисунок 13). Выбор именно таких схем иммунизации

(состава, доз и времени) опирался на опыт автора по иммунизации кур рабдовирусными частицами, псевдотипированными поверхностным гликопротеином марбургвируса Марбург [254]. Оценку иммунного ответа вели по IgY, которые выделяли из куриного желтка по методом изоэлектрического осаждения антител. Полученные препараты использовали для постановки реакции вируснейтрализации с псевдовirusами эболавируса Заир.

Появление антител, нейтрализующих псевдовirusы эболавируса Заир, в желтках иммунизированных птиц было отмечено после третьей иммунизации (рисунок 14).

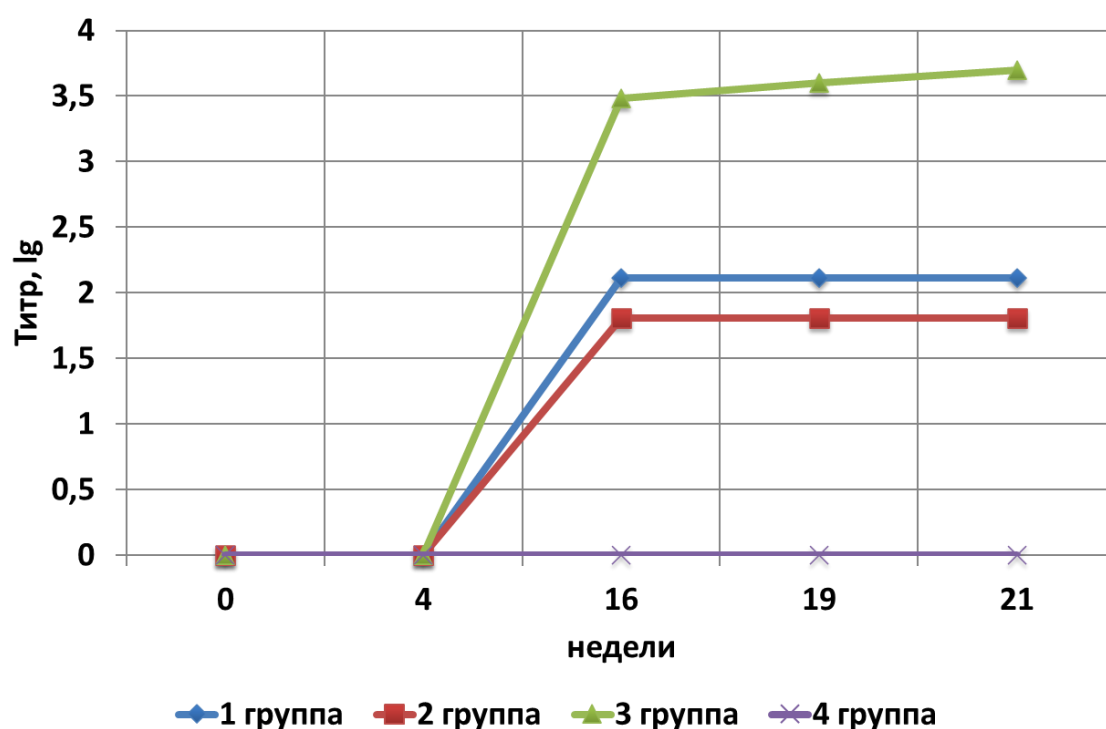


Рисунок 14. Изменение титров антител, нейтрализующих псевдовirusы эболавируса Заир.

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

3.3 Использование псевдовирюсов EBOV для поиска соединений, способных блокировать проникновение вируса в клетку-мишень

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

В качестве объекта исследования были выбраны производные терпеноидов, которые обладают ингибирующей активностью против ряда вирусов. В частности, было установлено, что производные терпеноидов блокируют процессы проникновения вируса гриппа [255], обладают высокой активностью против марбургвируса Марбург [256] и ортопоксвирусов [257].

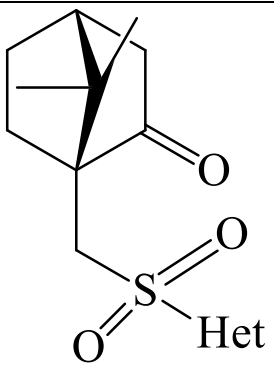
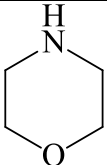
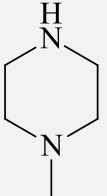
В работе был проведен анализ противовирусной активности библиотеки соединений, полученных на основе природных терпеноидов и их производных, любезно предоставленных Яровой О.И. (д-р хим. наук) и сотрудниками лаборатории физиологически активных веществ Новосибирского института органической химии (НИОХ СО РАН). В библиотеку соединений было включено 70 соединений, которые являются производными (1S)-(+)-камфора-10-сульфо кислоты, (-)-борнеола, (+)- и (-)- изоборнеола, и производными борниламина и изоборниламина. Чистота тестируемых соединений была подтверждена при помощи ГЖ ХМС, структура доказана с помощью физико-химических и спектральных методов.

Для всех соединений с помощью МТТ-теста определена 50% цитотоксичность (CC50) для культуры клеток НЕК293Т. Выбрана стартовая концентрация для раститровки, при которой сохраняется 90% выживаемость клеточной культуры для каждого соединения. Были определены IC50 синтезированных соединений для вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного поверхностным белком эболавируса Заир (VSVΔGGPE) и везикулярного стоматита (VSVΔGG). Для каждого соединения рассчитывался

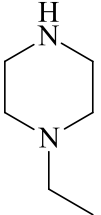
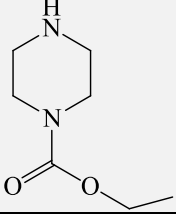
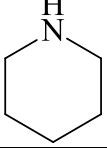
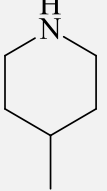
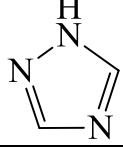
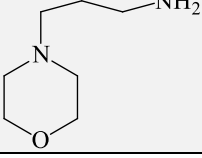
индекс селективности (SI) – отношение токсичности соединения и ингибирующей активности (CC50/IC50). Полученные значения для исследуемых веществ приведены в таблицах 2-10.

Первой изученной группой веществ были производные **(1S)-(+)-камфора-10-сульфокислоты**. В качестве вещества сравнения в работе использовали сертралин, обладающий ингибирующей активностью в отношении эболавируса Заир [258]. Вещества, взятые для анализа, проявили разную активность, наиболее эффективными ингибиторами оказались соединения **1** и **7**, несущие фрагменты морфолина и триазола соответственно (IC50 = 0,9 ± 0,5 мкМ (**1**) и 1,0 ± 0,4 мкМ (**7**)). Более того, эти соединения проявили низкую токсичность, в результате для соединений **1** и **7** были получены высокие значения индекса селективности (SI) (921 и 1764 соответственно) (таблица 2). Производное **8**, содержащее алифатический линкер между сульфамидной группой и морфолиновым фрагментом, также продемонстрировало высокую ингибирующую активность, значение SI составило 232. Высокое значение SI (134) также было обнаружено для производного пиперазина **4**, несущего N-этоксикарбонильный заместитель в пиперазиновом кольце (таблица 2).

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

Вещ-во	Het	IC50 (мкМ)	CC50 (мкМ)	SI	
1		0,9±0,5	829±24	921	
2		540±20	795±25	1,5	

Продолжение Таблицы 2

3		91±4	761±32	8	
4		5±1	671±18	134	
5		60±8	835±40	14	
6		49±7	797±19	16	
7		1±0,4	1764±59	1764	
8		3±1	697±21	232	
Сертралин		0,7±0,3	408±26	543	

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

На втором этапе была проанализирована активность производных (-)-борнеола, (+)- и (-)- изоборнеола, борниламина и изоборниламина. Производные (-)-борнеола, включающие радикалы пиперидина и 4-метилпиперидина **9-17**, которые имели длинный линкер ($n \geq 2$), продемонстрировали высокую эффективность ингибирования с высокими

значениями SI 162-956. Гидрохлоридные соли **13** и **18** показали многообещающую противовирусную активность (IC₅₀ 0,8 и 0,4 мкМ соответственно), но были значительно более токсичны (CC₅₀ 87,0 и 69,8 мкМ соответственно) по сравнению со свободными основаниями **10** и **15** (CC₅₀ 289,7 и 279,7 мкМ соответственно) (таблица 3).

Таблица 3. Ингибирующая активность производных (-)-борнеола

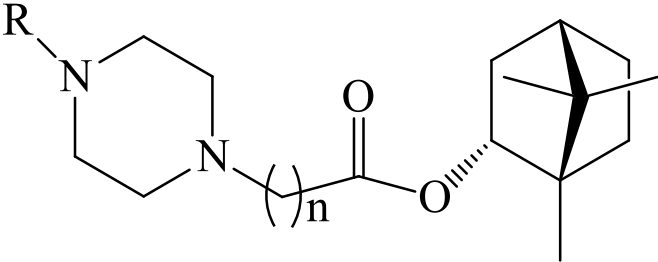
Вещ-во, n	X	CC ₅₀ (мкМ)	IC ₅₀ (мкМ)		SI	SI EBOV
			GPE	VSV-G		
9, n=1	CH ₂	141,4±14,1	15,7± 0,8	122,5±13,5	9	
10, n=2	CH ₂	289,7±22,6	1,7±0,1	93,0±9,3	170	9
11, n=3	CH ₂	74,8±6,1	0,30±0,01	50,1±4,5	230	
12, n=4	CH ₂	100,9±12,1	0,60±0,05	105,4±8,4	162	
13, n=2	CH ₂ , HCl	87,0±7,8	0,80±0,06	89,4±6,3	112	31
14, n = 1	CHCH ₃	71,6±6,4	8,5±1,1	35,0±2,4	8	
15, n = 2	HCH ₃	279,7±28,3	0,30±0,04	289,7±19,7	956	1,3
16, n = 3	HCH ₃	171,1±12,8	9,3±1,1	276,4±13,5	18	
17, n = 4	HCH ₃	73,0±3,1	0,20±0,02	83,5±7,3	408	
18, n = 2	HCH ₃ , HCl	69,8±5,6	0,40±0,03	71,5±5,4	171	2,2
19, n = 1	O	326,9±45,8	24,9±1,1	290,7±26,5	13	
20, n = 2	O	304,7±19,5	8,5 ± 0,7	319,8±30,1	36	
21, n = 3	O	210,1±14,3	6,5±0,5	287,7±14,4	33	
Сертра лин		408,0±35,9	0,70±0,07	NT	582	2

Введение морфолинового кольца неблагоприятно для ингибирующей активности, хотя производные **19-21** проявляют низкую токсичность ($CC_{50} = 210-326$ мкМ) (таблица 3).

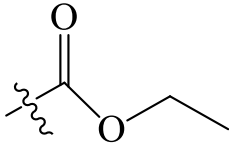
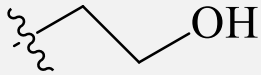

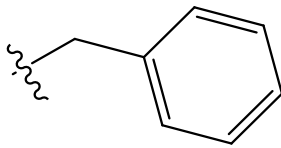
Некоторые из соединений были также проверены на способность блокировать натуральный эболавирус Заир. При этом соединение **13** ингибировало вирус с SI (EBOV), равным 31 (таблица 3).

Почти все 4-замещенные производные пиперазина показали хорошую противовирусную активность, за исключением производных этилпиперазин-1-карбоксилата **28-30**, которые проявляли слабое ингибирование. Производные **22-27** и **32-33**, содержащие алкильные или гидроксиэтиленовые группы в пиперазиновом кольце с длиной линкера $n \geq 2$, были значительно более активными, показывая значения IC_{50} от 0,1 до 1,8 мкМ и значения CC_{50} от 99,2 до 282 мкМ.

Таблица 4. Ингибирующая активность производных (-)-борнеола

Вещ-во, n	R	CC ₅₀ (мкМ)	IC ₅₀ (мкМ)		SI
			GPE	VSV-G	
					
22, n =1	CH ₃	312,5±30,6	6,8±0,8	484,7±48,0	46
23, n =2	CH ₃	282,0±25,7	0,3±0,03	173,2±15,7	870
24, n =3	CH ₃	99,2±8,8	0,6±0,04	97,3±8,7	160
25, n =1	C ₂ H ₅	129,7±11,5	1,6±0,1	263,6±21,9	80
26, n =2	C ₂ H ₅	263,6±24,3	1,6±0,1	80,5±5,9	170
27, n =3	C ₂ H ₅	130,8±10,5	0,1±0,01	165,3±11,4	880

Продолжение Таблицы 4

28, n = 1		227,0±13,6	19,9±2,1	112,9±8,9	11
29, n = 2		109,7±9,5	28,3±1,9	NT	4
30, n = 3		60,4±4,7	2,6±0,2	49,1±3,8	23
31, n = 1		295,9±32,8	13,9±1,0	394,2±38,2	21
32, n = 2		271,8±32,6	1,8 ± 0,1	258,9±25,9	153
33, n = 3		224,1±28,0	0,3±0,02	192,0±19,2	658
34, n = 1		247,3±23,0	2,2±0,2	24,1±2,4	114
35, n = 3		71,1±5,7	0,6±0,1	50,4±5,1	125
36, n = 1		59,4±5,6	1,3±0,1	39,8±3,4	44
37, n = 2		39,0±3,7	0,3±0,03	27,0±2,4	150
38, n = 3		30,1±2,0	0,3±0,03	26,0±2,3	100
Сертралин		408 ± 35,9	0,7±0,07	NT	582

Производное пиперазина **35**, содержащее 2-аминоэтильное замещение у атома азота, показало низкое значение IC₅₀ и высокую токсичность, в то время как соединение **34** имело значение CC₅₀, равное 247 мкМ, и значение SI, равное 114. Интересно, что липофильная бензильная группа у атома азота значительно увеличивает токсичность соединений **36-38**, значения CC₅₀ которых варьируются от 30 до 59 мкМ (таблица 4).

Кроме того, производные азапана **39** и **41** продемонстрировали высокую токсичность, тогда как соединение **40** с длиной линкера $n \geq 2$ показало высокое значение CC₅₀, равное 182 мкМ, и умеренную активность, со значением IC₅₀, равным 5,1 мкМ (таблица 5).

Таблица 5. Ингибирующая активность производных (-)-борнеола

Вещ-во, n	CC50 (мкМ)	IC50 (мкМ)		SI
		GPE	VSV-G	
39, n = 1	71,6±7,9	1,0±0,1	NT	70
40, n = 2	182,5±16,2	5,1±0,4	191,2±11,1	36
41, n = 3	62,2±5,7	0,20±0,02	NT	250

Производные с симметричными группами N, N-диалкиламинов не проявили заметной противовирусной активности, при этом, исключением является (1S,2S,4S)-1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-ил 4-(диэтиламино) бутаноат (**47**), демонстрирующий высокую активность против rVSDGGPE с IC₅₀, равным 0,3 мкМ, и низкую токсичность (CC₅₀ 165 мкМ) (таблица 6).

Таблица 6. Ингибирующая активность производных (-)-борнеола

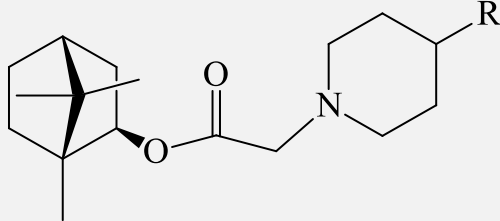
Вещ-во, n	R	CC50 (мкМ)	IC50 (мкМ)		SI
			GPE	VSV-G	
42, n = 1	CH ₃	388,6 ± 38,1	250,7 ± 22,3	522,6 ± 63,2	2
43, n = 2	CH ₃	505,2 ± 34,9	30,0 ± 2,6	NT	17
44, n = 3	CH ₃	100,6 ± 7,0	1,5 ± 0,1	NT	67

Продолжение Таблицы 6

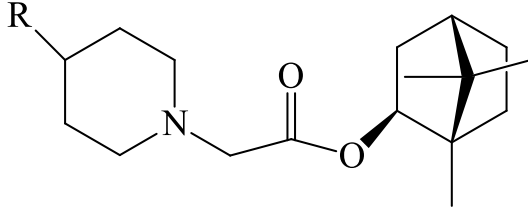
45, n = 1	C₂H₅	344,0 ± 33,0	5,6 ± 0,5	560,9 ± 66,7	61
46, n = 2	C₂H₅	326,9 ± 31,7	12,4 ± 1,1	411,4 ± 48,9	26
47, n = 3	C₂H₅	165,8 ± 12,8	0,30 ± 0,03	195,4 ± 23,1	490

Полученные результаты показали, что пиперидиновый, 4-метилпиперидиновый и 4-алкил- или -гидроксиалкилзамещенный пиперазиновый цикл могут быть более предпочтительными, чем морфолиновые, азепановые или 4-бензилзамещенные пиперазиновые группы. Таким образом, мы подтвердили, что длина линкера сильно влияет на токсичность. Производные пиперидина, 4-метилпиперидина, N-этилпиперазина и азепана были наименее токсичными с длиной линкера $n \geq 2$ по сравнению с соединениями, у которых $n \geq 1$ или 3,4 (таблицы 3, 4, 5, 6).

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

Вещ-во	R	CC50 (мкМ)	GPE		
			IC50 (мкМ)	SI	SI
					
48	H	80,5 ± 9,9	2,9 ± 0,3	28	3,99
49	CH ₃	34,1 ± 4,0	3,1 ± 0,3	11	4,36

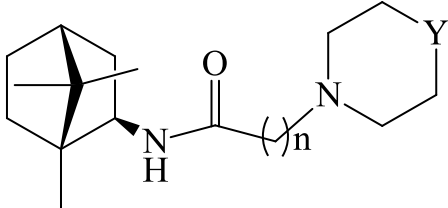
Продолжение Таблицы 7

					
50	H	89,5 ± 8,0	3,6 ± 0,3	25	3,72
51	CH ₃	34,1 ± 2,7	4,4 ± 0,4	8	4,36

Сравнение соединений с одинаковыми заместителями **9-18**, **48** и **50**, (+)- и (-)-изоборнеола **49** и **51** показали более низкие значения IC₅₀, чем производные (-)-борнеола **9** и **14**. Однако, производные (+)- и (-)-изоборнеола были более токсичными, чем аналоги в серии (-)-борнеола (таблица 7).

В ряду соединений **52-54**, **61-63** все исследованные соединения обладали противовирусной активностью от хорошей до отличной, со значениями IC₅₀ от 0,6 до 27 мкМ, и пять из них имели значения SI более 100 (таблица 8).

Таблица 8. Ингибирующая активность производных (-)-изоборниламина

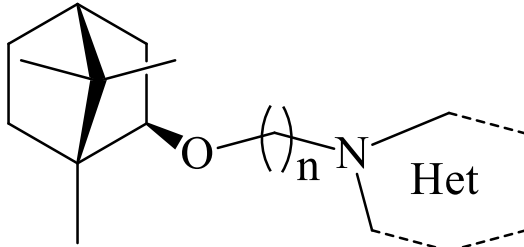
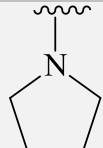
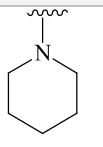
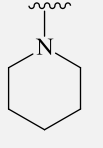
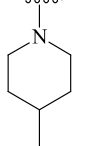
Вещ-во, n	Y	CC ₅₀ (мкМ)	IC ₅₀ (мкМ)		SI
			GPE	VSV-G	
					
52, n =1	O	838,1 ± 71,2	5,7 ± 0,7	838,1 ± 74,6	147
53, n =2	O	312,5 ± 37,8	22,1 ± 2,2	312,5 ± 21,9	14
54, n =3	O	171,8 ± 21,1	9,4 ± 0,7	171,8 ± 10,3	18
55, n =1	NCH ₃	853,3 ± 101,5	13,3 ± 1,1	853,3 ± 42,7	64
56, n =2	NCH ₃	485,6 ± 55,4	2,6 ± 0,3	485,6 ± 19,4	187
57, n =3	NCH ₃	474,7 ± 51,7	2,5 ± 0,3	474,7 ± 21,4	191

Продолжение Таблицы 8

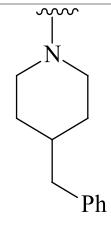
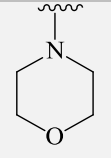
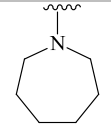
58, n = 1	NC ₂ H ₅	660,2 ± 71,3	8,5 ± 0,8	660,2 ± 30,4	78
59, n = 2	NC ₂ H ₅	564,9 ± 49,7	0,60 ± 0,04	564,9 ± 49,7	908
60, n = 3	NC ₂ H ₅	268,2 ± 17,9	2,10 ± 0,14	268,2 ± 23,6	129
61, n = 1	CHCH ₃	78,0 ± 6,9	27,0 ± 1,6	78,0 ± 6,9	2,9
62, n = 2	CHCH ₃	93,6 ± 10,0	2,6 ± 0,1	93,6 ± 7,3	36
63, n = 3	CHCH ₃	141,6 ± 14,3	3,4 ± 0,3	141,6 ± 12,7	41

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

Таблица 9. Ингибирующая активность производных изоборнеола

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

Продолжение Таблицы 9

68, n=3		148,5±5,4	67,5±2,7	-	2	-
69, n=2		860,1±22,4	0,6±0,2	934,9±26,2	1433	10
70, n=2		721,4±14,4	112,5±3,6	360,7±10,8	6	-

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

3.4 Изучение сайта связывания веществ с поверхностным гликопротеином эболавируса Заир

На основе структурного сходства между производными терпеноидов, использованными в работе, и сертралином, веществом с доказанной способностью ингибировать эболавирус Заир, было высказано предположение, что производные терпеноидов, использованные в работе, могут взаимодействовать с регионом GP EBOV, с которым связывается сертралин. Для

проверки этой гипотезы был проведен теоретический докинг соединений в регионе взаимодействия сертралина. Регион взаимодействия сертралина с GP EBOV известен из результатов рентгеноструктурного анализа [258]. На основании полученной модели были выявлены ключевые аминокислотные остатки: тирозин в позиции 517, аспарагиновая кислота в позиции 522 и метионин в позиции 548, потенциально участвующие в образовании комплекса с производными терпеноидов (рисунок 15).

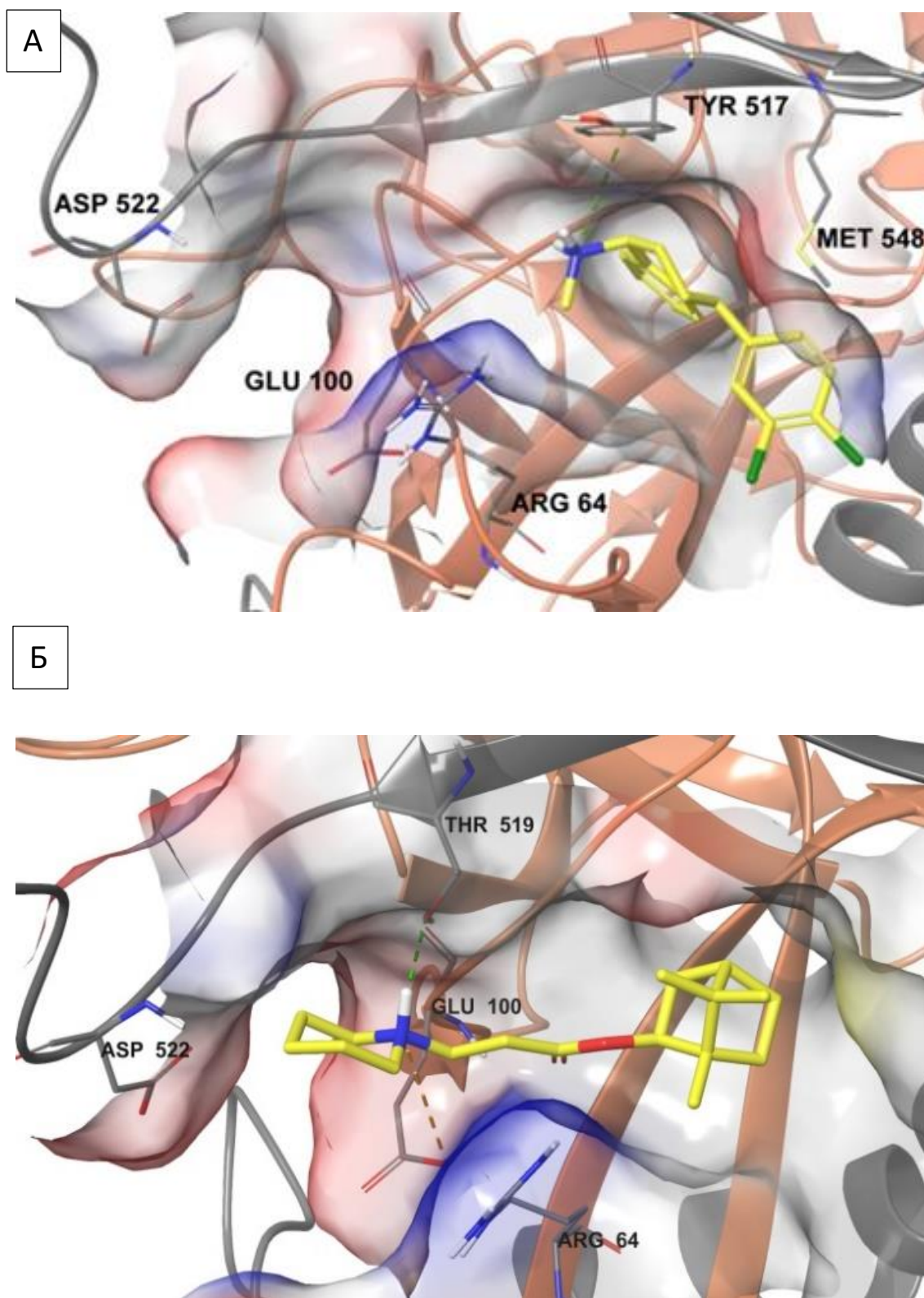


Рисунок 15. Модель взаимодействия низкомолекулярных соединений с участком GP эболавируса Заир. А – сертралин; Б – (1S,4S)-1,7,7-триметилбicyclo[2.2.1]гептан-2-ил-3-(4-метилпиперидин-1-ил)пропаноат. Моделирование проведено Баевым Д.С.

3.4.1 Конструирование плазмид, содержащих ген GP EBOV с внесёнными мутациями

Для получения вариантов гена GP, кодирующих белок с заменами остатков аминокислот – тирозина в позиции 517, аспарагиновой кислоты в позиции 522 и метионина в позиции 548 на аланин, – был проведен сайт-направленный мутагенез (рисунок 16). Для этого использовали следующие праймеры: 517-F, 517-R, 522-F, 522-R, 548-F, 548-R для проведения ПЦР с плазмиды pHGPEDMLD. Олигонуклеотиды, использованные в работе, представлены в таблице 1.

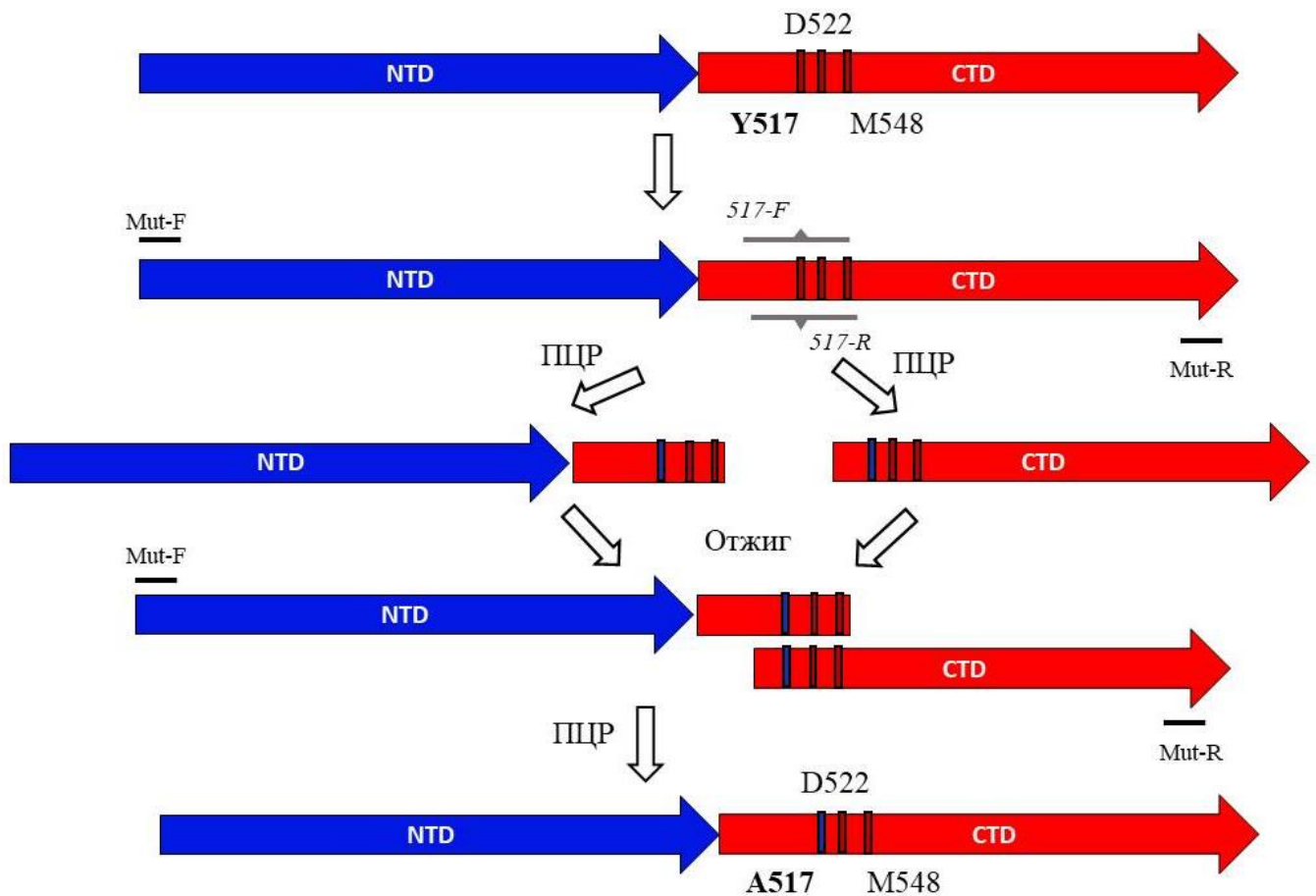


Рисунок 16. Общая схема сайт-направленного мутагенеза для получения аланиновых замен в белке GP EBOV.

Реакцию амплификации проводили по схеме, описанной в разделе 3.1. Далее два ПЦР-продукта (рисунок 17, А) объединили в одной реакционной смеси, проводили отжиг, а затем проводили ПЦР, используя праймеры, фланкирующие

общий ампликон: Mut-F и Mut-R (рисунок 17, Б). Полученные продукты Δ MLDGP эболавируса были встроены обратно в вектор ph.

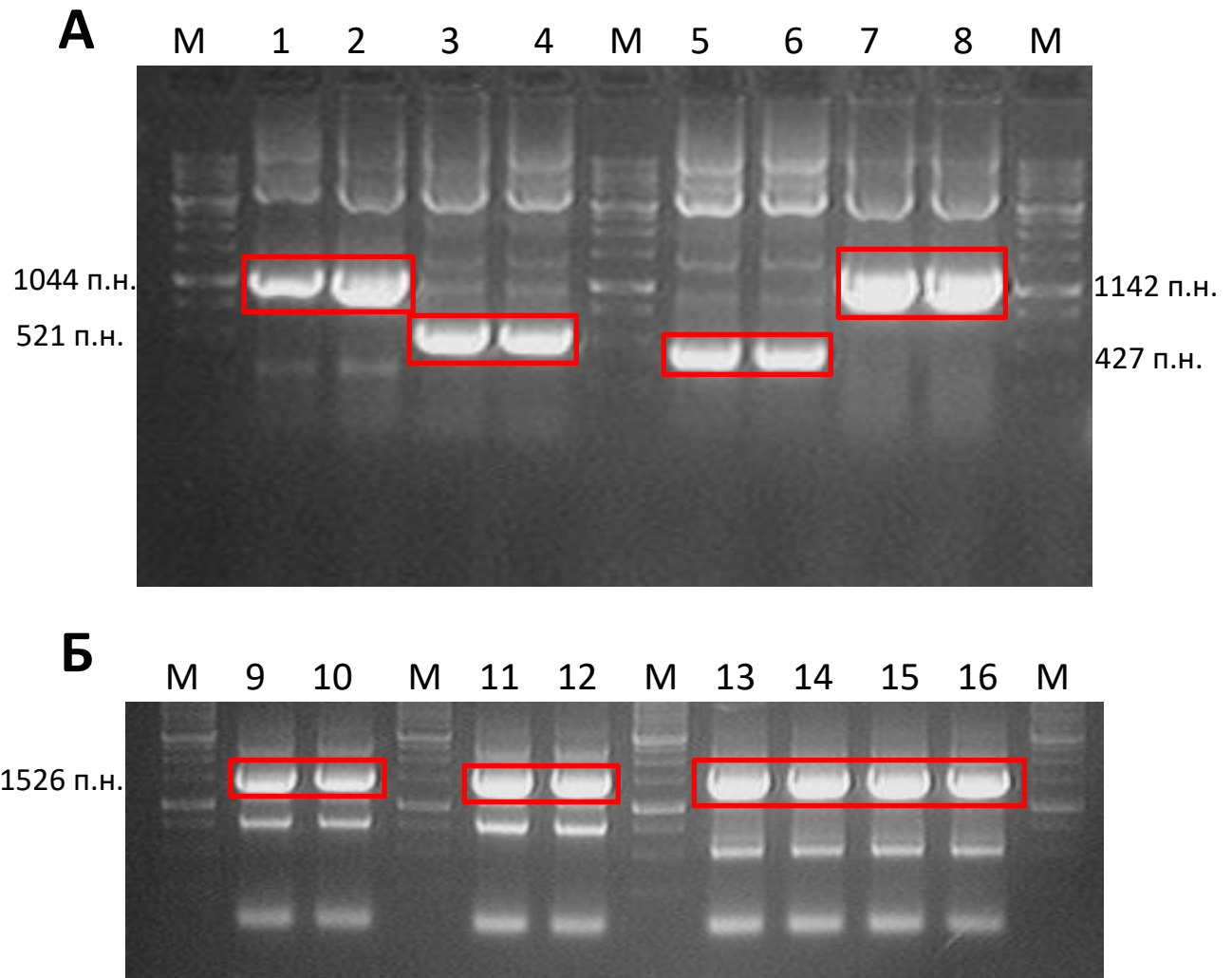


Рисунок 17. Электрофореграммы ПЦР-продуктов. М – маркер длин ДНК, 1-8 – положительные образцы после 1 раунда ПЦР, 9-16 – положительные образцы после 2 раунда ПЦР.

Скрининг бактериальных колоний, содержащих вставку в правильной ориентации, проводили с помощью ПЦР со специфичными праймерами. Положительные клоны были наработаны, из них выделена плазмидная ДНК, структуру которой подтверждали секвенированием.

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

3.4.2 Изучение ингибирующей активности соединений в отношении мутантных вариантов псевдовирюсов GP EBOV

Полученные частицы были использованы для сравнительного анализа ингибирующей активности веществ, в качестве контроля в анализе использовали вариант GP без мутаций. Противовирусную активность веществ против частиц, несущих мутантные варианты GP, сравнивали с активностью против частиц, несущих исходный вариант GP. Были проанализированы соединения: **10**, **15**, **26**, **16** и **24**, с длинными линкерами; и два (+)-камфорамида, **53** и **61**.

В противовирусном анализе значения IC₅₀ соединения **10** по отношению к GPY517A и GPM548A составляли 3,7 и 47,1 мкМ соответственно (таблица 10). Наблюдалось 20-кратное увеличение значения IC₅₀ для GPM548A по сравнению с таковым для GP. Напротив, наблюдалась аналогичная способность **10** ингибировать GP и мутант GPD522A (IC₅₀ 1,7 и 2,2 мкМ соответственно). Аналогичные результаты наблюдались для соединения **15**, где было обнаружено более чем 30-кратное увеличение значения IC₅₀ для GPM548A по сравнению с наблюдаемым для GP. Ингибирующая активность производных **16** и **24** в отношении всех мутантных псевдотипированных вирусных частиц и GP была различной. Для агента **16** наблюдали более чем 20-кратное снижение значения IC₅₀ в отношении мутантных вирусных частиц, псевдотипированных GPY517A и GPD522A (IC₅₀ 0,4 мкМ), по сравнению с наблюдаемым для GP (IC₅₀ 9,3 мкМ). Для производного **24** было отмечено более чем 20-кратное увеличение значения IC₅₀ для всех мутантных псевдотипированных вирусных частиц по сравнению с наблюдаемым для частиц, несущих исходный GP.

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

Вещ-во	IC50 (мкМ)			
	GP	GPY517A	GPD522A	GPM548A
10	1,7 ± 0,2	3,7 ± 0,4	2,2 ± 0,3	47,1 ± 6,1
15	0,30 ± 0,03	48,1 ± 4,8	4,9 ± 0,5	112,2 ± 14,7
16	9,3 ± 0,8	0,40 ± 0,03	0,40 ± 0,04	1,2 ± 0,2
24	0,6 ± 0,1	18,3 ± 2,2	18,3 ± 1,9	12,2 ± 1,4
26	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,1	0,50 ± 0,04	1,0 ± 0,1
53	22,1 ± 2,7	173,1 ± 11,8	17,7 ± 1,4	65,2 ± 5,8
61	27,0 ± 1,9	1,7 ± 0,2	11,6 ± 0,8	44,2 ± 3,4

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

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

Заключение

Болезнь, вызванная вирусом эбола (БВВЭ, *Ebola virus disease*, EVD) – острое, высококонтагиозное вирусное заболевание, смертность людей от которой может достигать 90% [1]. Возбудитель БВВЭ был открыт в 1976 году. Долгое время этот вирус напоминал о себе внезапными вспышками, которые сопровождались высокой смертностью, однако, быстро затухали. В последнее десятилетие мир столкнулся с масштабными вспышками, обусловленными эболавирусом (EBOV) Заир, в Западной Африке в 2013-2016 гг. и в Демократической Республике Конго в 2017-2021 гг. По данным Всемирной организации здравоохранения, количество погибших от вспышки эболавируса за время эпидемии 2013-2016 гг. превысило 11 тысяч человек.

Обнаружение в последние годы новых представителей семейства филовирусов, таких как *Striavirus* и *Thamnovirus*, а также расширение круга хозяев лишь подчеркивает необходимость продолжать интенсивные исследования этой группы вирусов. Немаловажную роль при этом играют работы, направленные на разработку вакцин и специфических противовирусных препаратов.

Гликопротеин эболавируса на поверхности вириона опосредует проникновение вируса и является основной мишенью для иммунотерапии и разработки вакцин. GP экспрессируется как GP₀, а затем подвергается посттрансляционному протеолитическому расщеплению с образованием связанных дисульфидной связью белков GP₁ и GP₂. GP₁ включает ряд доменов: основание, гликановый колпачок, головку и муциноподобный домен. Верхняя часть GP содержит область связывания с эндосомальным рецептором вируса NPC1. Поскольку сайт связывания рецептора в головке скрыт гликановым колпачком и муциноподобным доменом, процесс связывания включает два этапа. На первом этапе происходит ферментативное удаление гликанового колпачка и муциноподобного домена цистеиновыми катепсинами. На втором этапе реализуется собственно взаимодействие обнаженного рецепторсвязывающего участка с NPC1. GP₂ отвечает за слияние мембраны вируса-хозяина и содержит внутреннюю петлю слияния, две области гептадных повторов, соединенных

линкером, содержащим мотив СХ6СС, проксимальную к мембране внешнюю область (MPER), трансмембранный домен и цитоплазматический домен.

Ключевая роль поверхностного гликопротеина филовирuсов в процессах проникновения, тропизма и патогенеза ставит этот белок в фокус множества исследований. Ограничения, связанные с высокой патогенностью эболавирuсов, являются значительным препятствием для исследователей. Обойти эти сложности позволяет использование суррогатных систем, таких как псевдовирuсы.

Термин «псевдотипированный вирус» (pseudotyped virus, PV) или «псевдовирuс» (pseudovirus) обозначает вирусную частицу, содержащую ядро первого вирусa, окруженное клеточной мембраной, несущей белок (белки) оболочки второго, чужеродного вирусa. Генетический материал, упакованный в псевдовирuс, не содержит функциональных генов поверхностных белков. Следовательно, псевдовирuсы способны только проникать в клетку-мишень и обеспечивать процесс трансляции, инициируя репликацию нуклеиновой кислоты без образования инфекционных частиц. Наиболее распространенными системами псевдотипирования являются системы на основе ВИЧ-1 и вирусa везикулярного стоматита. Ключевой особенностью псевдовирuсов является то, что они дефектны по репликации, и поэтому могут быть широко использованы в лабораториях уровня BSL1-2.

В данном исследовании была проведена работа по получению частиц, псевдотипированных поверхностным гликопротеином EBOV, и их использованию как для индукции антител, способных нейтрализовать эболавирuс, так и для поиска веществ, способных ингибировать проникновение псевдовирuсов в клетки.

В результате проделанной работы было сконструировано пять рекомбинантных плазмид: phGPE, phGPEDMLD, phGPEdMLDEbov517, phGPEdMLDEbov522, phGPEdMLDEbov548. На основе полученных плазмид с использованием двух систем псевдотипирования (лентивирусной и на основе вирусa везикулярного стоматита) получены функционально активные псевдовирuсные частицы. Морфологические особенности полученных частиц

подтверждены при помощи электронной микроскопии. Псевдовirusы способны проникать в клетки млекопитающих, при этом наиболее чувствительными были культуры клеток СПЭВ и HEK293T, наименее MDCK.

Для подтверждения антигенных свойств полученных псевдовirusных частиц использовали два антитела – ADI-15742 и ADI-15999, способные нейтрализовать эболаvirusы за счет взаимодействия с консервативным эпитопом, расположенном в петле слияния GP EBOV. Данные антитела нейтрализовали псевдовirusы EBOV с IC50 в диапазоне 15 - 100 нМ, что подтверждает антигенные свойства полученных псевдовirusов EBOV.

Показано, что при иммунизации кур смесью лентивirusных и рабдовirusных частиц, псевдотипированных поверхностным гликопротеином EBOV, титр нейтрализующих антител достиг титра 1:4096.

С использованием частиц на основе virusа везикулярного стоматита был проведён скрининг библиотеки соединений, способных блокировать проникновение virusа в клетки. Часть соединений, показавших высокую активность, была проверена с использованием натурального эболаvirusа. Наиболее активным ингибитором проникновения является гидрохлорид (1S,4S)-1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-ил-3-(4-метилпиперидин-1-ил)пропаноат, его полуингибирующая концентрация составляет $0,8 \pm 0,06$ мкМ, при индексе селективности равном 112 для псевдовirusов и 31 в случае натурального virusа.

На основе структурного сходства между производными терпеноидов, использованными в работе, и сертралином, веществом с доказанной способностью ингибировать эболаvirus Заир, было высказано предположение, что производные терпеноидов, использованные в работе, могут взаимодействовать с регионом GP EBOV, с которым связывается сертралин. Для проверки этой гипотезы был проведен теоретический докинг соединений в регионе взаимодействия сертралина. На основании полученной модели были выявлены ключевые аминокислотные остатки: тирозин в позиции 517, аспарагиновая кислота в позиции 522 и метионин в позиции 548, потенциально участвующие в образовании комплекса с производными терпеноидов. С

использованием полученных плазмид на основе системы псевдотипирования вируса везикулярного стоматита были получены псевдовirusы с тремя вариантами GP, несущими замены на остаток аланина в положениях 517, 522 и 548. Полученные частицы были использованы для сравнительного анализа ингибирующей активности соединений (10, 15, 16, 24, 26, 53, 61), в качестве контроля в анализе использовали вариант GP без мутаций. Наблюдаемая разница в активности соединений для различных вариантов GP (с заменами в позициях Y517, D522 и M548) позволяет утверждать, что исследованные соединения действительно проявляют активность за счет взаимодействия с сайтом взаимодействия сертралина.

Полученные в данной работе псевдовirusы позволили не только провести скрининг потенциальных ингибиторов проникновения эболавирусов, но и экспериментально установить сайт связывания и механизм их воздействия на поверхностный белок.

Выводы

1. Разработаны плазмиды, обеспечивающие получение функциональных лентивирусных и рабдовирусных частиц, псевдотипированных полноразмерными и делеционными вариантами белка GP филовирюсов.

2. Полученные вирусоподобные частицы обладают трансдуцирующей активностью в диапазоне от 4,5 до 6,5 ОЛЕ. Псевдовирюсы на основе лентивирусюв имеют шарообразную форму и размер 80-90 нм, псевдовирюсы на основе вирусю везикулярного стоматитю сохраняют типичную морфологию рабдовирусных частиц, размер 90-130 нм. При этом поверхностный белок GP сохраняет антигенные свойства.

3. Использование псевдовирюсов в качестве иммуногена обеспечивает индукцию антител, нейтрализующих эболавирюс. В группе кур, иммунизированных смесью лентивирусных и рабдовирусных частиц, титр нейтрализующих антител достиг 1:4096.

4. С использованием псевдовирюсных систем проведено исследование противовирюсной активности 70 соединений – производных полусинтетических терпеноидов (на модели одноцикловоу псевдовирюсной инфекции). Обнаружены соединения, относящиеся к N-гетероциклическим производным сложных эфиров борнеола, специфически ингибирующие проникновение псевдовирюса с поверхностным белком эболавирюса в клетку. Наиболее активным является гидрохлорид (1S,4S)-1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гептан-2-ил-3-(4-метилпиперидин-1-ил)пропаноат, его полуингибирующая концентрация составляет $0,8 \pm 0,06$ мкМ, при индексе селективности равном 112 для псевдовирюсов и 31 в случае натурального вирусю, что отражает его сравнительно низкую токсичность.

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

Список литературы

1. Feldmann H., Jones S., Klenk H.D., Schnittler H. Ebola virus: from discovery to vaccine // *Nature Reviews Immunology*. – 2003. – V. 3. – №. 8. – P. 677-685.
2. 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 // *Journal of virological methods*. – 2010. – V. 169. – №. 2. – P. 365-374.
3. Kobinger G.P., Weiner D.J., Yu Q.C., Wilson J.M. Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo // *Nature biotechnology*. – 2001. – V. 19. – №. 3. – P. 225-230.
4. Wool-Lewis R.J., Bates P. Characterization of Ebola virus entry by using pseudotyped viruses: identification of receptor-deficient cell lines // *Journal of virology*. – 1998. – V. 72. – №. 4. – P. 3155-3160.
5. Bhattacharyya S., Warfield K., Ruthel G., Bavari S., Aman M., Hope T. Ebola virus uses clathrin-mediated endocytosis as an entry pathway // *Virology*. – 2010. – V. 401. – №. 1. – P. 18-28.
6. Ilinykh P.A., Shen X., Flyak A.I., Kuzmina N., Ksiazek T.G., Crowe J.E. Jr, Bukreyev A. Chimeric filoviruses for identification and characterization of monoclonal antibodies // *Journal of virology*. – 2016. – V. 90. – №. 8. – P. 3890-3901.
7. Geisbert T.W., Jahrling P.B. Differentiation of filoviruses by electron microscopy // *Virus research*. – 1995. – V. 39. – №. 2-3. – P. 129-150.
8. Kuhn J.H., Amarasinghe G.K., Basler C.F., Bavari S., Bukreyev A., Chandran K., Crozier I., Dolnik O., Dye J.M., Formenty P.B.H., Griffiths A., Hewson R., Kobinger G.P., Leroy E.M., Mühlberger E., Netesov S.V., Palacios G., Pályi B., Pawęska J.T., Smither S.J., Takada A., Towner J.S., Wahl V. ICTV virus taxonomy profile: Filoviridae // *The Journal of general virology*. – 2019. – V. 100. – №. 6. – P. 911.
9. Sanchez A., Kiley M.P., Holloway B.P., Auperin D.D. Sequence analysis of the Ebola virus genome: organization, genetic elements, and comparison with the genome of Marburg virus // *Virus research*. – 1993. – V. 29. – №. 3. – P. 215-240.
10. Negredo A., Palacios G., Vázquez-Morón S., González F., Dopazo H., Molero F., Juste J., Quetglas J., Savji N., de la Cruz Martínez M., Herrera J.E., Pizarro M.,

- Hutchison S.K., Echevarría J.E., Lipkin W.I., Tenorio A. Discovery of an ebolavirus-like filovirus in europe // PLoS pathogens. – 2011. – V. 7. – №. 10. – P. e1002304.
11. Bukreyev A.A., Volchkov V.E., Blinov V.M., Dryga S.A., Netesov S.V. The complete nucleotide sequence of the Popp (1967) strain of Marburg virus: a comparison with the Musoke (1980) strain // Archives of virology. – 1995. – V. 140. – №. 9. – P. 1589-1600.
12. Feldmann H., Mühlberger E., Randolph A., Will C., Kiley M.P., Sanchez A., Klenk H.D. Marburg virus, a filovirus: messenger RNAs, gene order, and regulatory elements of the replication cycle // Virus research. – 1992. – V. 24. – №. 1. – P. 1-19.
13. Ikegami T., Calaor A.B., Miranda M.E., Niikura M., Saijo M., Kurane I., Yoshikawa Y., Morikawa S. Genome structure of Ebola virus subtype Reston: differences among Ebola subtypes // Archives of virology. – 2001. – V. 146. – №. 10. – P. 2021-2027.
14. Crary S.M., Towner J.S., Honig J.E., Shoemaker T.R., Nichol S.T. Analysis of the role of predicted RNA secondary structures in Ebola virus replication // Virology. – 2003. – V. 306. – №. 2. – P. 210-218.
15. Mühlberger E., Sanchez A., Randolph A., Will C., Kiley M.P., Klenk H.D., Feldmann H. The nucleotide sequence of the L gene of Marburg virus, a filovirus: homologies with paramyxoviruses and rhabdoviruses // Virology. – 1992. – V. 187. – №. 2. – P. 534-547.
16. Biedenkopf N., Schlereth J., Grünweller A., Becker S., Hartmann R.K. RNA binding of Ebola virus VP30 is essential for activating viral transcription // Journal of virology. – 2016. – V. 90. – №. 16. – P. 7481-7496.
17. Schlereth J., Grünweller A., Biedenkopf N., Becker S., Hartmann R.K. RNA binding specificity of Ebola virus transcription factor VP30 // RNA biology. – 2016. – V. 13. – №. 9. – P. 783-798.
18. Mehedi M., Falzarano D., Seebach J., Hu X., Carpenter M.S., Schnittler H.J., Feldmann H. A new Ebola virus nonstructural glycoprotein expressed through RNA editing // Journal of virology. – 2011. – V. 85. – №. 11. – P. 5406-5414.

19. Towner J.S., Sealy T.K., Khristova M.L., Albariño C.G., Conlan S., Reeder S.A., Quan P.L., Lipkin W.I., Downing R., Tappero J.W., Okware S., Lutwama J., Bakamutumaho B., Kayiwa J., Comer J.A., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Nichol S.T. Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda // *PLoS pathogens*. – 2008. – V. 4. – №. 11. – P. e1000212.
20. Wang L.F., Harcourt B.H., Yu M., Tamin A., Rota P.A., Bellini W.J., Eaton B.T. Molecular biology of Hendra and Nipah viruses // *Microbes and infection*. – 2001. – V. 3. – №. 4. – P. 279-287.
21. Yang X.L., Tan C.W., Anderson D.E., Jiang R.D., Li B., Zhang W., Zhu Y., Lim X.F., Zhou P., Liu X.L., Guan W., Zhang L., Li S.Y., Zhang Y.Z., Wang L.F., Shi Z.L. Characterization of a filovirus (Měnglà virus) from Rousettus bats in China // *Nature microbiology*. – 2019. – V. 4. – №. 3. – P. 390-395.
22. Shi M., Lin X.D., Chen X., Tian J.H., Chen L.J., Li K., Wang W., Eden J.S., Shen J.J., Liu L., Holmes E.C., Zhang Y.Z. The evolutionary history of vertebrate RNA viruses // *Nature*. – 2018. – V. 556. – №. 7700. – P. 197-202.
23. Hume A.J., Mühlberger E. Distinct genome replication and transcription strategies within the growing filovirus family // *Journal of molecular biology*. – 2019. – V. 431. – №. 21. – P. 4290-4320.
24. Elliott L.H., Kiley M.P., McCormick J.B. Descriptive analysis of Ebola virus proteins // *Virology*. – 1985. – V. 147. – №. 1. – P. 169-176.
25. Noda T., Hagiwara K., Sagara H., Kawaoka Y. Characterization of the Ebola virus nucleoprotein–RNA complex // *The Journal of general virology*. – 2010. – V. 91. – №. Pt 6. – P. 1478-1483.
26. Watanabe S., Noda T., Kawaoka Y. Functional mapping of the nucleoprotein of Ebola virus // *Journal of virology*. – 2006. – V. 80. – №. 8. – P. 3743-3751.
27. Hartlieb B., Modrof J., Mühlberger E., Klenk H.D., Becker S. Oligomerization of Ebola virus VP30 is essential for viral transcription and can be inhibited by a synthetic peptide // *Journal of biological chemistry*. – 2003. – V. 278. – №. 43. – P. 41830-41836.
28. Hartlieb B., Muziol T., Weissenhorn W., Becker S. Crystal structure of the C-terminal domain of Ebola virus VP30 reveals a role in transcription and nucleocapsid

- association // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – V. 104. – №. 2. – P. 624-629.
29. Modrof J., Becker S., Mühlberger E. Ebola virus transcription activator VP30 is a zinc-binding protein // *Journal of virology*. – 2003. – V. 77. – №. 5. – P. 3334-3338.
30. Groseth A., Charton J.E., Sauerborn M., Feldmann F., Jones S.M., Hoenen T., Feldmann H. The Ebola virus ribonucleoprotein complex: a novel VP30–L interaction identified // *Virus research*. – 2009. – V. 140. – №. 1-2. – P. 8-14.
31. Mühlberger E., Weik M., Volchkov V.E., Klenk H.D., Becker S. Comparison of the transcription and replication strategies of Marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems // *Journal of virology*. – 1999. – V. 73. – №. 3. – P. 2333-2342.
32. Mühlberger E., Lötfering B., Klenk H.D., Becker S. Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes // *Journal of virology*. – 1998. – V. 72. – №. 11. – P. 8756-8764.
33. Kirchdoerfer R.N., Moyer C.L., Abelson D.M., Saphire E.O. The Ebola Virus VP30-NP Interaction Is a Regulator of Viral RNA Synthesis // *PLOS Pathogens*. – 2016. – V. 12. – №. 10. – P. e1005937.
34. Feldmann H., Mühlberger E., Randolph A., Will C., Kiley M.P., Sanchez A., Klenk H.D. Marburg virus, a filovirus: messenger RNAs, gene order, and regulatory elements of the replication cycle // *Virus research*. – 1992. – V. 24. – №. 1. – P. 1-19.
35. Han Z., Boshra H., Sunyer J.O., Zwiers S.H., Paragas J., Harty R.N. Biochemical and functional characterization of the Ebola virus VP24 protein: implications for a role in virus assembly and budding // *Journal of virology*. – 2003. – V. 77. – №. 3. – P. 1793-1800.
36. Jasenosky L.D., Kawaoka Y. Filovirus budding // *Virus research*. – 2004. – V. 106. – №. 2. – P. 181-188.
37. Jasenosky L.D., Neumann G., Lukashevich I., Kawaoka Y. Ebola virus VP40-induced particle formation and association with the lipid bilayer // *Journal of virology*. – 2001. – V. 75. – №. 11. – P. 5205-5214.

38. Timmins J., Schoehn G., Kohlhaas C., Klenk H.D., Ruigrok R.W., Weissenhorn W. Oligomerization and polymerization of the filovirus matrix protein VP40 // *Virology*. – 2003. – V. 312. – №. 2. – P. 359-368.
39. Hoenen T., Jung S., Herwig A., Groseth A., Becker S. Both matrix proteins of Ebola virus contribute to the regulation of viral genome replication and transcription // *Virology*. – 2010. – V. 403. – №. 1. – P. 56-66.
40. Adu-Gyamfi E., Digman M.A., Gratton E., Stahelin R.V. Investigation of Ebola VP40 assembly and oligomerization in live cells using number and brightness analysis // *Biophysical journal*. – 2012. – V. 102. – №. 11. – P. 2517-2525.
41. Soni S.P., Adu-Gyamfi E., Yong S.S., Jee C.S., Stahelin R.V. The Ebola virus matrix protein deeply penetrates the plasma membrane: an important step in viral egress // *Biophysical journal*. – 2013. – V. 104. – №. 9. – P. 1940-1949.
42. Sanchez A., Trappier S.G., Mahy B.W., Peters C.J., Nichol S.T. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – V. 93. – №. 8. – P. 3602-3607.
43. Volchkov V.E., Becker S., Volchkova V.A., Ternovoj V.A., Kotov A.N., Netesov S.V., Klenk H.D. GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and Vaccinia virus Polymerases1 // *Virology*. – 1995. – V. 214. – №. 2. – P. 421-430.
44. Basler C.F., Mikulasova A., Martinez-Sobrido L., Paragas J., Mühlberger E., Bray M., Klenk H.D., Palese P., García-Sastre A. The Ebola virus VP35 protein inhibits activation of interferon regulatory factor 3 // *Journal of virology*. – 2003. – V. 77. – №. 14. – P. 7945-7956.
45. Prins K.C., Cárdenas W.B., Basler C.F. Ebola virus protein VP35 impairs the function of interferon regulatory factor-activating kinases IKK ϵ and TBK-1 // *Journal of virology*. – 2009. – V. 83. – №. 7. – P. 3069-3077.
46. Bale S., Julien J.P., Bornholdt Z.A., Krois A.S., Wilson I.A., Saphire E.O. Ebolavirus VP35 coats the backbone of double-stranded RNA for interferon antagonism // *Journal of virology*. – 2013. – V. 87. – №. 18. – P. 10385-10388.

47. Leung D.W., Prins K.C., Borek D.M., Farahbakhsh M., Tufariello J.M., Ramanan P., Nix J.C., Helgeson L.A., Otwinowski Z., Honzatko R.B., Basler C.F., Amarasinghe G.K. Structural basis for dsRNA recognition and interferon antagonism by Ebola VP35 // *Nature structural & molecular biology*. – 2010. – V. 17. – №. 2. – P. 165-172.
48. Halfmann P., Neumann G., Kawaoka Y. The Ebolavirus VP24 protein blocks phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase // *The Journal of infectious diseases*. – 2011. – V. 204. – №. Suppl 3. – P. S953-S956.
49. Ishida H., Ohkawa K., Hosui A., Hiramatsu N., Kanto T., Ueda K., Takehara T., Hayashi N. Involvement of p38 signaling pathway in interferon- α -mediated antiviral activity toward hepatitis C virus // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2004. – V. 321. – №. 3. – P. 722-727.
50. Mateo M., Carbonnelle C., Martinez M.J., Reynard O., Page A., Volchkova V.A., Volchkov V.E. Knockdown of Ebola virus VP24 impairs viral nucleocapsid assembly and prevents virus replication // *The Journal of infectious diseases*. – 2011. – V. 204. – №. Suppl 3. – P. S892-S896.
51. Watt A., Moukambi F., Banadyga L., Groseth A., Callison J., Herwig A., Ebihara H., Feldmann H., Hoenen T. A novel life cycle modeling system for Ebola virus shows a genome length-dependent role of VP24 in virus infectivity // *Journal of virology*. – 2014. – V. 88. – №. 18. – P. 10511-10524.
52. Banadyga L., Hoenen T., Ambroggio X., Dunham E., Groseth A., Ebihara H. Ebola virus VP24 interacts with NP to facilitate nucleocapsid assembly and genome packaging // *Scientific reports*. – 2017. – V. 7. – №. 1. – P. 1-14.
53. Valmas C., Grosch M.N., Schümann M., Olejnik J., Martinez O., Best S.M., Krähling V., Basler C.F., Mühlberger E. Marburg virus evades interferon responses by a mechanism distinct from ebola virus // *PLoS pathogens*. – 2010. – V. 6. – №. 1. – P. e1000721.
54. Emanuel J., Marzi A., Feldmann H. Filoviruses: ecology, molecular biology, and evolution // *Advances in virus research*. – 2018. – V. 100. – P. 189-221.

55. Simmons G., Wool-Lewis R.J., Baribaud F., Netter R.C., Bates P. Ebola virus glycoproteins induce global surface protein down-modulation and loss of cell adherence // *Journal of virology*. – 2002. – V. 76. – №. 5. – P. 2518-2528.
56. 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 // *The Journal of infectious diseases*. – 2011. – V. 204. – №. Suppl 3. – P. S957-S967.
57. Hunt C.L., Lennemann N.J., Maury W. Filovirus entry: a novelty in the viral fusion world // *Viruses*. – 2012. – V. 4. – №. 2. – P. 258-275.
58. Saeed M.F., Kolokoltsov A.A., Albrecht T., Davey R.A. Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes // *PLoS pathogens*. – 2010. – V. 6. – №. 9. – P. e1001110.
59. Sanchez A. Analysis of filovirus entry into vero e6 cells, using inhibitors of endocytosis, endosomal acidification, structural integrity, and cathepsin (B and L) activity // *The Journal of infectious diseases*. – 2007. – V. 196. – №. Supplement 2. – P. S251-S258.
60. Chandran K., Sullivan N.J., Felbor U., Whelan S.P., Cunningham J.M. Endosomal proteolysis of the Ebola virus glycoprotein is necessary for infection // *Science*. – 2005. – V. 308. – №. 5728. – P. 1643-1645.
61. Marzi A., Reinheckel T., Feldmann H. Cathepsin B & L are not required for ebola virus replication // *PLoS neglected tropical diseases*. – 2012. – V. 6. – №. 12. – P. e1923.
62. Brecher M., Schornberg K.L., Delos S.E., Fusco M.L., Saphire E.O., White J.M. Cathepsin cleavage potentiates the Ebola virus glycoprotein to undergo a subsequent fusion-relevant conformational change // *Journal of virology*. – 2012. – V. 86. – №. 1. – P. 364-372.
63. 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., Dal Cin P., Dye J.M., Whelan

- S.P., Chandran K., Brummelkamp T.R. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann–Pick C1 // *Nature*. – 2011. – V. 477. – №. 7364. – P. 340-343.
64. 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. 344-348.
65. Krishnan A., Miller E.H., Herbert A.S., Ng M., Ndungo E., Whelan S.P., Dye J.M., Chandran K. Niemann-Pick C1 (NPC1)/NPC1-like1 chimeras define sequences critical for NPC1's function as a filovirus entry receptor // *Viruses*. – 2012. – V. 4. – №. 11. – P. 2471-2484.
66. 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.
67. Martinez O., Ndungo E., Tantral L., Miller E.H., Leung L.W., Chandran K., Basler C.F. A mutation in the Ebola virus envelope glycoprotein restricts viral entry in a host species-and cell-type-specific manner // *Journal of virology*. – 2013. – V. 87. – №. 6. – P. 3324-3334.
68. Ng M., Ndungo E., Kaczmarek M.E., Herbert A.S., Binger T., Kuehne A.I., Jangra R.K., Hawkins J.A., Gifford R.J., Biswas R., Demogines A., James R.M., Yu M., Brummelkamp T.R., Drosten C., Wang L.F., Kuhn J.H., Müller M.A., Dye J.M., Sawyer S.L., Chandran K. Filovirus receptor NPC1 contributes to species-specific patterns of ebolavirus susceptibility in bats // *Elife*. – 2015. – V. 4. – P. e11785.
69. Urbanowicz R.A., McClure C.P., Sakuntabhai A., Sall A.A., Kobinger G., Müller M.A., Holmes E.C., Rey F.A., Simon-Loriere E., Ball J.K. Human adaptation of Ebola virus during the West African outbreak // *Cell*. – 2016. – V. 167. – №. 4. – P. 1079-1087.
70. Davey R.A., Shtanko O., Anantpadma M., Sakurai Y., Chandran K., Maury W. Mechanisms of filovirus entry // *Marburg-and Ebolaviruses*. – 2017. – P. 323-352.
71. Mühlberger E., Lötfering B., Klenk H.D., Becker S. Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate

replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes // *Journal of virology*. – 1998. – V. 72. – №. 11. – P. 8756-8764.

72. Mühlberger E., Weik M., Volchkov V.E., Klenk H.D., Becker S. Comparison of the transcription and replication strategies of Marburg virus and Ebola virus by using artificial replication systems // *Journal of virology*. – 1999. – V. 73. – №. 3. – P. 2333-2342.

73. Whelan S.P.J., Barr J.N., Wertz G.W. Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses // *Biology of negative strand RNA viruses: The power of reverse genetics*. – 2004. – P. 61-119.

74. Nanbo A., Watanabe S., Halfmann P., Kawaoka Y. The spatio-temporal distribution dynamics of Ebola virus proteins and RNA in infected cells // *Scientific reports*. – 2013. – V. 3. – №. 1. – P. 1-9.

75. Weik M., Enterlein S., Schlenz K., Mühlberger E. The Ebola virus genomic replication promoter is bipartite and follows the rule of six // *Journal of virology*. – 2005. – V. 79. – №. 16. – P. 10660-10671.

76. Beniac D.R., Melito P.L., Devarenes S.L., Hiebert S.L., Rabb M.J., Lamboo L.L., Jones S.M., Booth T.F. The Organisation of Ebola Virus Reveals a Capacity for Extensive, Modular Polyploidy // *Plos one*. – 2012. – V. 7. – №. 1. – P. e29608.

77. Bharat T.A., Noda T., Riches J.D., Kraehling V., Kolesnikova L., Becker S., Kawaoka Y., Briggs J.A. Structural dissection of Ebola virus and its assembly determinants using cryo-electron tomography // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – V. 109. – №. 11. – P. 4275-4280.

78. Watanabe S., Noda T., Halfmann P., Jasenosky L., Kawaoka Y. Ebola virus (EBOV) VP24 inhibits transcription and replication of the EBOV genome // *The Journal of infectious diseases*. – 2007. – V. 196. – №. Supplement 2. – P. S284-S290.

79. Kolesnikova L., Berghöfer B., Bamberg S., Becker S. Multivesicular bodies as a platform for formation of the Marburg virus envelope // *Journal of virology*. – 2004. – V. 78. – №. 22. – P. 12277-12287.

80. Noda T., Sagara H., Suzuki E., Takada A., Kida H., Kawaoka Y. Ebola virus VP40 drives the formation of virus-like filamentous particles along with GP // *Journal of virology*. – 2002. – V. 76. – №. 10. – P. 4855-4865.
81. Ruigrok R.W., Schoehn G., Dessen A., Forest E., Volchkov V., Dolnik O., Klenk H.D., Weissenhorn W. Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus // *Journal of molecular biology*. – 2000. – V. 300. – №. 1. – P. 103-112.
82. Ruigrok R.W., Schoehn G., Dessen A., Forest E., Volchkov V., Dolnik O., Klenk H.D., Weissenhorn W. Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus // *Journal of molecular biology*. – 2000. – V. 300. – №. 1. – P. 103-112.
83. Dessen A., Volchkov V., Dolnik O., Klenk H.D., Weissenhorn W. Crystal structure of the matrix protein VP40 from Ebola virus // *The EMBO journal*. – 2000. – V. 19. – №. 16. – P. 4228-4236.
84. Gomis-Rüth F.X., Dessen A., Timmins J., Bracher A., Kolesnikowa L., Becker S., Klenk H.D., Weissenhorn W. The matrix protein VP40 from Ebola virus octamerizes into pore-like structures with specific RNA binding properties // *Structure*. – 2003. – V. 11. – №. 4. – P. 423-433.
85. Bharat T.A., Noda T., Riches J.D., Kraehling V., Kolesnikova L., Becker S., Kawaoka Y., Briggs J.A. Structural dissection of Ebola virus and its assembly determinants using cryo-electron tomography // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – V. 109. – №. 11. – P. 4275-4280.
86. Bermejo M., Rodríguez-Teijeiro J.D., Illera G., Barroso A., Vilà C., Walsh P.D. Ebola outbreak killed 5000 gorillas // *Science*. – 2006. – V. 314. – №. 5805. – P. 1564-1564.
87. Rouquet P., Froment J.M., Bermejo M., Kilbourn A., Karesh W., Reed P., Kumulungui B., Yaba P., Délicat A., Rollin P.E., Leroy E.M. Wild animal mortality monitoring and human Ebola outbreaks, Gabon and Republic of Congo, 2001–2003 // *Emerging infectious diseases*. – 2005. – V. 11. – №. 2. – P. 283-290.

88. Formenty P., Boesch C., Wyers M., Steiner C., Donati F., Dind F., Walker F., Le Guenzo B. Ebola virus outbreak among wild chimpanzees living in a rain forest of Cote d'Ivoire // *The Journal of infectious diseases*. – 1999. – V. 179. – №. Supplement_1. – P. S120-S126.
89. Hayman D.T., Emmerich P., Yu M., Wang L.F., Suu-Ire R., Fooks A.R., Cunningham A.A., Wood J.L. Long-term survival of an urban fruit bat seropositive for Ebola and Lagos bat viruses // *PloS one*. – 2010. – V. 5. – №. 8. – P. e11978.
90. Hayman D.T., Yu M., Cramer G., Wang L.F., Suu-Ire R., Wood J.L., Cunningham A.A. Ebola virus antibodies in fruit bats, Ghana, West Africa // *Emerging infectious diseases*. – 2012. – V. 18. – №. 7. – P. 1207-1209.
91. Leroy E.M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba P., Délicat A., Paweska J.T., Gonzalez J.P., Swanepoel R. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus // *Nature*. – 2005. – V. 438. – №. 7068. – P. 575-576.
92. Ogawa H., Miyamoto H., Nakayama E. et al. Seroepidemiological prevalence of multiple species of filoviruses in fruit bats (*Eidolon helvum*) migrating in Africa // *The Journal of infectious diseases*. – 2015. – V. 212. – №. Suppl 2. – P. S101-S108.
93. Pourrut X., Souris M., Towner J.S. et al. Large serological survey showing cocirculation of Ebola and Marburg viruses in Gabonese bat populations, and a high seroprevalence of both viruses in *Rousettus aegyptiacus* // *BMC infectious diseases*. – 2009. – V. 9. – №. 1. – P. 1-10.
94. Barrette R.W., Metwally S.A., Rowland J.M. et al. Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus // *Science*. – 2009. – V. 325. – №. 5937. – P. 204-206.
95. Pan Y., Zhang W., Cui L., Hua X., Wang M., Zeng Q. Reston virus in domestic pigs in China // *Archives of virology*. – 2014. – V. 159. – №. 5. – P. 1129-1132.
96. Marsh G.A., Haining J., Robinson R. et al. Ebola Reston virus infection of pigs: clinical significance and transmission potential // *The Journal of infectious diseases*. – 2011. – V. 204. – №. suppl_3. – P. S804-S809.
97. Kobinger G.P., Leung A., Neufeld J. et al. Replication, pathogenicity, shedding, and transmission of Zaire ebolavirus in pigs // *Journal of Infectious Diseases*. – 2011. – V. 204. – №. 2. – P. 200-208.

98. Jahrling P.B., Geisbert T.W., Jaax N.K. et al. Experimental infection of cynomolgus macaques with Ebola-Reston filoviruses from the 1989–1990 US epizootic // *Imported virus infections*. – 1996. – P. 115-134.
99. Taniguchi S., Watanabe S., Masangkay J.S. et al. Reston Ebolavirus antibodies in bats, the Philippines // *Emerging infectious diseases*. – 2011. – V. 17. – №. 8. – P. 1559-1560.
100. Jayme S.I., Field H.E., de Jong C. et al. Molecular evidence of Ebola Reston virus infection in Philippine bats // *Virology journal*. – 2015. – V. 12. – №. 1. – P. 1-8.
101. Olival K.J., Islam A., Yu M. et al. Ebola virus antibodies in fruit bats, Bangladesh // *Emerging infectious diseases*. – 2013. – V. 19. – №. 2. – P. 270-273.
102. Nidom C.A., Nakayama E., Nidom R.V. et al. Serological evidence of Ebola virus infection in Indonesian orangutans // *PLoS one*. – 2012. – V. 7. – №. 7. – P. e40740.
103. Azarian T., Lo Presti A., Giovanetti M. et al. Impact of spatial dispersion, evolution and selection on Ebola Zaire Virus epidemic waves // *Scientific reports*. – 2015. – V. 5. – №. 1. – P. 1-9.
104. Chippaux J. P. Outbreaks of Ebola virus disease in Africa: the beginnings of a tragic saga // *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*. – 2014. – V. 20. – P. 02-14.
105. Gire S.K., Goba A., Andersen K.G. et al. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak // *science*. – 2014. – V. 345. – №. 6202. – P. 1369-1372.
106. Rodriguez L.L., De Roo A., Guimard Y. et al. Persistence and genetic stability of Ebola virus during the outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995 // *The Journal of infectious diseases*. – 1999. – V. 179. – №. Supplement 1. – P. S170-S176.
107. Leroy E.M., Rouquet P., Formenty P. et al. Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife // *Science*. – 2004. – V. 303. – №. 5656. – P. 387-390.

108. Bausch D.G., Nichol S.T., Muyembe-Tamfum J.J. et al. Marburg hemorrhagic fever associated with multiple genetic lineages of virus // *New England Journal of Medicine*. – 2006. – V. 355. – №. 9. – P. 909-919.
109. Holmes E. C. Molecular clocks and the puzzle of RNA virus origins // *Journal of virology*. – 2003. – V. 77. – №. 7. – P. 3893-3897.
110. Patel M.R., Emerman M., Malik H.S. Paleovirology—ghosts and gifts of viruses past // *Current opinion in virology*. – 2011. – V. 1. – №. 4. – P. 304-309.
111. Sharp P.M., Simmonds P. Evaluating the evidence for virus/host co-evolution // *Current opinion in virology*. – 2011. – V. 1. – №. 5. – P. 436-441.
112. Wertheim J.O., Kosakovsky Pond S.L. Purifying selection can obscure the ancient age of viral lineages // *Molecular biology and evolution*. – 2011. – V. 28. – №. 12. – P. 3355-3365.
113. Carroll S.A., Towner J.S., Sealy T.K. et al. Molecular evolution of viruses of the family Filoviridae based on 97 whole-genome sequences // *Journal of virology*. – 2013. – V. 87. – №. 5. – P. 2608-2616.
114. Suzuki Y., Gojobori T. The origin and evolution of Ebola and Marburg viruses // *Molecular Biology and Evolution*. – 1997. – V. 14. – №. 8. – P. 800-806.
115. Taylor D.J., Dittmar K., Ballinger M.J. et al. Evolutionary maintenance of filovirus-like genes in bat genomes // *BMC Evolutionary Biology*. – 2011. – V. 11. – №. 1. – P. 1-12.
116. Carroll M.W., Matthews D.A., Hiscox J.A. et al. Temporal and spatial analysis of the 2014–2015 Ebola virus outbreak in West Africa // *Nature*. – 2015. – V. 524. – №. 7563. – P. 97-101.
117. Bedford T., Malik H. S. Did a single amino acid change make Ebola virus more virulent? // *Cell*. – 2016. – V. 167. – №. 4. – P. 892-894.
118. Diehl W.E., Lin A.E., Grubaugh N.D. et al. Ebola virus glycoprotein with increased infectivity dominated the 2013–2016 epidemic // *Cell*. – 2016. – V. 167. – №. 4. – P. 1088-1098. e6.

119. Liu S.Q., Deng C.L., Yuan Z.M., Rayner S., Zhang B. Identifying the pattern of molecular evolution for Zaire ebolavirus in the 2014 outbreak in West Africa // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2015. – V. 32. – P. 51-59.
120. Olabode A.S., Jiang X., Robertson D.L., Lovell S.C. Ebolavirus is evolving but not changing: No evidence for functional change in EBOV from 1976 to the 2014 outbreak // *Virology*. – 2015. – V. 482. – P. 202-207.
121. Hoenen T., Safronetz D., Groseth A. Mutation rate and genotype variation of Ebola virus from Mali case sequences // *Science*. – 2015. – V. 348. – №. 6230. – P. 117-119.
122. Reynard O., Borowiak M., Volchkova V.A. Ebolavirus glycoprotein GP masks both its own epitopes and the presence of cellular surface proteins // *Journal of virology*. – 2009. – V. 83. – №. 18. – P. 9596-9601.
123. Volchkov V.E., Feldmann H., Volchkova V.A., Klenk H.D. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – V. 95. – №. 10. – P. 5762-5767.
124. Neumann G., Feldmann H., Watanabe S. et al. Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture // *Journal of virology*. – 2002. – V. 76. – №. 1. – P. 406-410.
125. Wool-Lewis R.J., Bates P. Endoproteolytic processing of the Ebola virus envelope glycoprotein: cleavage is not required for function // *Journal of virology*. – 1999. – V. 73. – №. 2. – P. 1419-1426.
126. Volchkov V.E., Blinov V.M., Netesov S.V. The envelope glycoprotein of Ebola virus contains an immunosuppressive-like domain similar to oncogenic retroviruses // *FEBS letters*. – 1992. – V. 305. – №. 3. – P. 181-184.
127. Yaddanapudi K., Palacios G., Towner J.S. et al. Implication of a retrovirus-like glycoprotein peptide in the immunopathogenesis of Ebola and Marburg viruses // *The FASEB journal*. – 2006. – V. 20. – №. 14. – P. 2519-2530.
128. Malashkevich V.N., Schneider B.J., McNally M.L. et al. Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-Å resolution // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. – V. 96. – №. 6. – P. 2662-2667.

129. Weissenhorn W., Calder L.J., Wharton S.A. et al. The central structural feature of the membrane fusion protein subunit from the Ebola virus glycoprotein is a long triple-stranded coiled coil // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1998. – V. 95. – №. 11. – P. 6032-6036.
130. Weissenhorn W., Carfi A., Lee K.H., Skehel J.J., Wiley D.C. Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain // *Molecular cell*. – 1998. – V. 2. – №. 5. – P. 605-616.
131. Dolnik O., Volchkova V., Garten W. et al. Ectodomain shedding of the glycoprotein GP of Ebola virus // *The EMBO journal*. – 2004. – V. 23. – №. 10. – P. 2175-2184.
132. Maruyama J., Miyamoto H., Kajihara M. et al. Characterization of the envelope glycoprotein of a novel filovirus, Iloivi virus // *Journal of virology*. – 2014. – V. 88. – №. 1. – P. 99-109.
133. Cook J.D., Lee J.E. The secret life of viral entry glycoproteins: moonlighting in immune evasion // *PLoS pathogens*. – 2013. – V. 9. – №. 5. – P. e1003258.
134. Lee J.E., Saphire E.O. Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry // *Future virology*. – 2009. – V. 4. – №. 6. – P. 621-635.
135. Nakayama E., Saijo M. Animal models for Ebola and Marburg virus infections // *Frontiers in microbiology*. – 2013. – V. 4. – P. 267.
136. Ning Y.J., Deng F., Hu Z., Wang H. The roles of ebolavirus glycoproteins in viral pathogenesis // *Virologica Sinica*. – 2017. – V. 32. – №. 1. – P. 3-15.
137. Sanchez A., Trappier S.G., Mahy B.W., Peters C.J., Nichol S.T. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – V. 93. – №. 8. – P. 3602-3607.
138. Francica J.R., Matukonis M.K., Bates P. Requirements for cell rounding and surface protein down-regulation by Ebola virus glycoprotein // *Virology*. – 2009. – V. 383. – №. 2. – P. 237-247.

139. Volchkova V.A., Klenk H.D., Volchkov V.E. Delta-peptide is the carboxy-terminal cleavage fragment of the nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus // *Virology*. – 1999. – V. 265. – №. 1. – P. 164-171.
140. Volchkova V.A., Feldmann H., Klenk H.D., Volchkov V.E. The nonstructural small glycoprotein sGP of Ebola virus is secreted as an antiparallel-orientated homodimer // *Virology*. – 1998. – V. 250. – №. 2. – P. 408-414.
141. Barrientos L.G., Martin A.M., Rollin P.E., Sanchez A. Disulfide bond assignment of the Ebola virus secreted glycoprotein SGP // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2004. – V. 323. – №. 2. – P. 696-702.
142. Falzarano D., Krokhn O., Wahl-Jensen V. et al. Structure-function analysis of the soluble glycoprotein, sGP, of ebola virus // *Chembiochem*. – 2006. – V. 7. – №. 10. – P. 1605-1611.
143. Falzarano D., Krokhn O., Van Domselaar G. et al. Ebola sGP—the first viral glycoprotein shown to be C-mannosylated // *Virology*. – 2007. – V. 368. – №. 1. – P. 83-90.
144. Maruyama T., Parren P.W., Sanchez A. et al. Recombinant human monoclonal antibodies to Ebola virus // *The Journal of infectious diseases*. – 1999. – V. 179. – №. Supplement 1. – P. S235-S239.
145. Lee J.E., Kuehne A., Abelson D.M. et al. Complex of a protective antibody with its ebola virus GP peptide epitope: Unusual features of a V λ x light chain // *Journal of molecular biology*. – 2008. – V. 375. – №. 1. – P. 202-216.
146. Lee J.E., Fusco M.L., Hessel A.J. et al. Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor // *Nature*. – 2008. – V. 454. – №. 7201. – P. 177-182.
147. Gallaher W. R. Similar structural models of the transmembrane proteins of Ebola and avian sarcoma viruses // *Cell*. – 1996. – V. 85. – №. 4. – P. 477-478.
148. Wilson I.A., Skehel J.J., Wiley D.C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution // *Nature*. – 1981. – V. 289. – №. 5796. – P. 366-373.

149. Rey F.A., Heinz F.X., Mandl C. et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution // *Nature*. – 1995. – V. 375. – №. 6529. – P. 291-298.
150. Modis Y., Ogata S., Clements D., Harrison S.C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion // *Nature*. – 2004. – V. 427. – № 6972. – P. 313-319.
151. Nybakken G.E., Oliphant T., Johnson S. et al. Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody // *Nature*. – 2005. – V. 437. – № 7059. – P. 764-769.
152. Roche S., Bressanelli S., Rey F.A., Gaudin Y. Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G // *Science*. – 2006. – V. 313. – №. 5784. – P. 187-191.
153. Roche S., Rey F.A., Gaudin Y., Bressanelli S. Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G // *Science*. – 2007. – V. 315. – №. 5813. – P. 843-848.
154. Heldwein E.E., Lou H., Bender F.C. et al. Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1 // *Science*. – 2006. – V. 313. – №. 5784. – P. 217-220.
155. Weissenhorn W., Carfi A., Lee K.H. et al. Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain // *Molecular cell*. – 1998. – V. 2. – №. 5. – P. 605-616.
156. Yin H.S., Wen X., Paterson R.G. et al. Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation // *Nature*. – 2006. – V. 439. – №. 7072. – P. 38-44.
157. Lee J.E., Fusco M.L., Hessel A.J. et al. Structure of the Ebola virus glycoprotein bound to an antibody from a human survivor // *Nature*. – 2008. – V. 454. – №. 7201. – P. 177-182.
158. Jiang H., Wang J., Manicassamy B. et al. The role of the charged residues of the GP2 helical regions in Ebola entry // *Virologica Sinica*. – 2009. – V. 24. – №. 2. – P. 121-135.

159. Wang J., Manicassamy B., Caffrey M., Rong L. Characterization of the receptor-binding domain of Ebola glycoprotein in viral entry // *Virologica Sinica*. – 2011. – V. 26. – №. 3. – P. 156-170.
160. Feldmann H., Geisbert T.W. Ebola haemorrhagic fever // *The Lancet*. – 2011. – V. 377. – №. 9768. – P. 849-862.
161. Takada A. Filovirus tropism: cellular molecules for viral entry // *Frontiers in microbiology*. – 2012. – V. 3. – P. 34.
162. Singh G., Kumar A., Singh K., Kaur J. Retracted: Ebola virus: an introduction and its pathology // *Reviews in medical virology*. – 2016. – V. 26. – №. 1. – P. 49-56.
163. Schnittler H.J., Feldmann H. Marburg and Ebola hemorrhagic fevers: does the primary course of infection depend on the accessibility of organ-specific macrophages? // *Clinical infectious diseases*. – 1998. – V. 27. – №. 2. – P. 404-406.
164. Geisbert T.W., Hensley L.E., Larsen T. et al. Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection // *The American journal of pathology*. – 2003. – V. 163. – №. 6. – P. 2347-2370.
165. Bray M., Geisbert T.W. Ebola virus: the role of macrophages and dendritic cells in the pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2005. – V. 37. – №. 8. – P. 1560-1566.
166. Stark G.R. How cells respond to interferons revisited: from early history to current complexity // *Cytokine & growth factor reviews*. – 2007. – V. 18. – №. 5-6. – P. 419-423.
167. Randall R.E., Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures // *Journal of general virology*. – 2008. – V. 89. – №. 1. – P. 1-47.
168. Sadler A.J., Williams B.R.G. Interferon-inducible antiviral effectors // *Nature reviews immunology*. – 2008. – V. 8. – №. 7. – P. 559-568.
169. Schneider W.M., Chevillotte M.D., Rice C.M. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses // *Annual review of immunology*. – 2014. – V. 32. – P. 513-545.

170. Errett J.S., Gale M. Emerging complexity and new roles for the RIG-I-like receptors in innate antiviral immunity // *Virologica Sinica*. – 2015. – V. 30. – №. 3. – P. 163-173.
171. Elliott R.M., Weber F. Bunyaviruses and the type I interferon system // *Viruses*. – 2009. – V. 1. – №. 3. – P. 1003-1021.
172. Borrow P., Martínez-Sobrido L., De la Torre J.C. Inhibition of the type I interferon antiviral response during arenavirus infection // *Viruses*. – 2010. – V. 2. – №. 11. – P. 2443-2480.
173. Ning Y.J., Wang M., Deng M. et al. Viral suppression of innate immunity via spatial isolation of TBK1/IKK ϵ from mitochondrial antiviral platform // *Journal of molecular cell biology*. – 2014. – V. 6. – №. 4. – P. 324-337.
174. Ning Y.J., Feng K., Min Y.Q. et al. Disruption of type I interferon signaling by the nonstructural protein of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus via the hijacking of STAT2 and STAT1 into inclusion bodies // *Journal of virology*. – 2015. – V. 89. – №. 8. – P. 4227-4236.
175. Ma D.Y., Suthar M.S. Mechanisms of innate immune evasion in re-emerging RNA viruses // *Current opinion in virology*. – 2015. – V. 12. – P. 26-37.
176. Messaoudi I., Amarasinghe G.K., Basler C.F. Filovirus pathogenesis and immune evasion: insights from Ebola virus and Marburg virus // *Nature Reviews Microbiology*. – 2015. – V. 13. – №. 11. – P. 663-676.
177. Van Damme N., Goff D., Katsura C. et al. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein // *Cell host & microbe*. – 2008. – V. 3. – №. 4. – P. 245-252.
178. Kaletsky R.L., Francica J.R., Agrawal-Gamse C., Bates P. Tetherin-mediated restriction of filovirus budding is antagonized by the Ebola glycoprotein // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – V. 106. – №. 8. – P. 2886-2891.
179. Tokarev A., Skasko M., Fitzpatrick K., Guatelli J. Antiviral activity of the interferon-induced cellular protein BST-2/tetherin // *AIDS research and human retroviruses*. – 2009. – V. 25. – №. 12. – P. 1197-1210.

180. Kupzig S., Korolchuk V., Rollason R. et al. Bst-2/HM1. 24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology // *Traffic*. – 2003. – V. 4. – №. 10. – P. 694-709.
181. Jouvenet N., Neil S.J., Zhadina M. et al. Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin // *Journal of virology*. – 2009. – V. 83. – №. 4. – P. 1837-1844.
182. Perez-Caballero D., Zang T., Ebrahimi A. et al. Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells // *Cell*. – 2009. – V. 139. – №. 3. – P. 499-511.
183. Hammonds J., Wang J.J., Yi H., Spearman P. Immunoelectron microscopic evidence for Tetherin/BST2 as the physical bridge between HIV-1 virions and the plasma membrane // *PLoS pathogens*. – 2010. – V. 6. – №. 2. – P. e1000749.
184. Hinz A., Miguet N., Natrajan G. et al. Structural basis of HIV-1 tethering to membranes by the BST-2/tetherin ectodomain // *Cell host & microbe*. – 2010. – V. 7. – №. 4. – P. 314-323.
185. Le Tortorec A., Willey S., Neil S.J. Antiviral inhibition of enveloped virus release by tetherin/BST-2: action and counteraction // *Viruses*. – 2011. – V. 3. – №. 5. – P. 520-540.
186. Fitzpatrick K., Skasko M., Deerinck T.J. et al. Direct restriction of virus release and incorporation of the interferon-induced protein BST-2 into HIV-1 particles // *PLoS pathogens*. – 2010. – V. 6. – №. 3. – P. e1000701.
187. Lopez L.A., Yang S.J., Exline C.M. et al. Anti-tetherin activities of HIV-1 Vpu and Ebola virus glycoprotein do not involve removal of tetherin from lipid rafts // *Journal of virology*. – 2012. – V. 86. – №. 10. – P. 5467-5480.
188. Lopez L.A., Yang S.J., Hauser H. et al. Ebola virus glycoprotein counteracts BST-2/Tetherin restriction in a sequence-independent manner that does not require tetherin surface removal // *Journal of virology*. – 2010. – V. 84. – №. 14. – P. 7243-7255.
189. Kühl A., Banning C., Marzi A. et al. The Ebola virus glycoprotein and HIV-1 Vpu employ different strategies to counteract the antiviral factor tetherin // *The Journal of infectious diseases*. – 2011. – V. 204. – №. Suppl 3. – P. S850-S860.

190. Gustin J.K., Bai Y., Moses A.V. et al. Ebola virus glycoprotein promotes enhanced viral egress by preventing Ebola VP40 from associating with the host restriction factor BST2/tetherin // *The Journal of infectious diseases*. – 2015. – V. 212. – №. Suppl 2. – P. S181-S190.
191. Vande Burgt N.H., Kaletsky R.L., Bates P. Requirements within the Ebola viral glycoprotein for tetherin antagonism // *Viruses*. – 2015. – V. 7. – №. 10. – P. 5587-5602.
192. Simmons G., Wool-Lewis R.J., Baribaud F. et al. Ebola virus glycoproteins induce global surface protein down-modulation and loss of cell adherence // *Journal of virology*. – 2002. – V. 76. – №. 5. – P. 2518-2528.
193. Jeffers S.A., Sanders D.A., Sanchez A. Covalent modifications of the ebola virus glycoprotein // *Journal of virology*. – 2002. – V. 76. – №. 24. – P. 12463-12472.
194. Sullivan N.J., Peterson M., Yang Z.Y. et al. Ebola virus glycoprotein toxicity is mediated by a dynamin-dependent protein-trafficking pathway // *Journal of virology*. – 2005. – V. 79. – №. 1. – P. 547-553.
195. Wahl-Jensen V.M., Afanasieva T.A., Seebach J. et al. Effects of Ebola virus glycoproteins on endothelial cell activation and barrier function // *Journal of virology*. – 2005. – V. 79. – №. 16. – P. 10442-10450.
196. Alazard-Dany N., Ottmann Terrangle M., Volchkov V. Ebola virus glycoprotein GP is not cytotoxic when expressed constitutively at a moderate level // *Journal of general virology*. – 2006. – V. 87. – №. 5. – P. 1247-1257.
197. Escudero-Pérez B., Volchkova V.A., Dolnik O. et al. Shed GP of Ebola virus triggers immune activation and increased vascular permeability // *PLoS pathogens*. – 2014. – V. 10. – №. 11. – P. e1004509.
198. Zhao D., Han X., Zheng X. et al. The myeloid LSECtin is a DAP12-coupled receptor that is crucial for inflammatory response induced by Ebola virus glycoprotein // *PLoS pathogens*. – 2016. – V. 12. – №. 3. – P. e1005487.
199. Radoshitzky S.R., Warfield K.L., Chi X. et al. Ebolavirus Δ -peptide immunoadhesins inhibit Marburgvirus and Ebolavirus cell entry // *Journal of virology*. – 2011. – V. 85. – №. 17. – P. 8502-8513.

200. Gallaher W.R., Garry R.F. Modeling of the Ebola virus delta peptide reveals a potential lytic sequence motif // *Viruses*. – 2015. – V. 7. – №. 1. – P. 285-305.
201. Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells // *The Journal of experimental medicine*. – 1911. – V. 13. – №. 4. – P. 397-411.
202. Rubin H. Genetic control of cellular susceptibility to pseudotypes of Rous sarcoma virus // *Virology*. – 1965. – V. 26. – №. 2. – P. 270-276.
203. Hanafusa H., Hanafusa T., Rubin H. The defectiveness of Rous sarcoma virus // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1963. – V. 49. – №. 4. – P. 572-580.
204. 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 // *Journal of virology*. – 1991. – V. 65. – №. 1. – P. 162-169.
205. Page K.A., Landau N.R., Littman D.R. Construction and use of a human immunodeficiency virus vector for analysis of virus infectivity // *Journal of virology*. – 1990. – V. 64. – №. 11. – P. 5270-5276.
206. Bartosch B., Dubuisson J., Cosset F.L. Infectious hepatitis C virus pseudoparticles containing functional E1–E2 envelope protein complexes // *The Journal of experimental medicine*. – 2003. – V. 197. – №. 5. – P. 633-642.
207. Vile R.G., Schulz T.F., Danos O.F. et al. A murine cell line producing HTLV-I pseudotype virions carrying a selectable marker gene // *Virology*. – 1991. – V. 180. – №. 1. – P. 420-424.
208. Anantpadma M., Kouznetsova J., Wang H. et al. Large-scale screening and identification of novel Ebola virus and Marburg virus entry inhibitors // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2016. – V. 60. – №. 8. – P. 4471-4481.
209. Corti D., Zhao J., Pedotti M. et al. Prophylactic and postexposure efficacy of a potent human monoclonal antibody against MERS coronavirus // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – V. 112. – №. 33. – P. 10473-10478.
210. Perera R.A., Wang P., Goma M.R. et al. Seroepidemiology for MERS coronavirus using microneutralisation and pseudoparticle virus neutralisation assays

reveal a high prevalence of antibody in dromedary camels in Egypt, June 2013 // *Eurosurveillance*. – 2013. – V. 18. – №. 36. – P. 20574.

211. Qian Z., Dominguez S.R., Holmes K.V. Role of the spike glycoprotein of human Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in virus entry and syncytia formation // *PloS one*. – 2013. – V. 8. – №. 10. – P. e76469.

212. Zhao G., Du L., Ma C. et al. A safe and convenient pseudovirus-based inhibition assay to detect neutralizing antibodies and screen for viral entry inhibitors against the novel human coronavirus MERS-CoV // *Virology journal*. – 2013. – V. 10. – №. 1. – P. 1-8.

213. 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. – V. 4.

214. Côté M., Misasi J., Ren T. et al. Small molecule inhibitors reveal Niemann–Pick C1 is essential for Ebola virus infection // *Nature*. – 2011. – V. 477. – №. 7364. – P. 344-348.

215. Basu A., Mills D.M., Mitchell D. et al. Novel small molecule entry inhibitors of Ebola virus // *The Journal of infectious diseases*. – 2015. – V. 212. – №. Suppl 2. – P. S425-S434.

216. Kuroda M., Fujikura D., Nanbo A. et al. Interaction between TIM-1 and NPC1 is important for cellular entry of Ebola virus // *Journal of virology*. – 2015. – V. 89. – №. 12. – P. 6481-6493.

217. Lagging L.M., Meyer K., Owens R.J., Ray R. Functional role of hepatitis C virus chimeric glycoproteins in the infectivity of pseudotyped virus // *Journal of virology*. – 1998. – V. 72. – №. 5. – P. 3539-3546.

218. Hsu M., Zhang J., Flint M. et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – V. 100. – №. 12. – P. 7271-7276.

219. Lavillette D., Tarr A.W., Voisset C. et al. Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus // *Hepatology*. – 2005. – V. 41. – №. 2. – P. 265-274.

220. Meertens L., Bertaux C., Cukierman L. et al. The tight junction proteins claudin-1,-6, and-9 are entry cofactors for hepatitis C virus // *Journal of virology*. – 2008. – V. 82. – №. 7. – P. 3555-3560.
221. Zheng A., Yuan F., Li Y. et al. Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus // *Journal of virology*. – 2007. – V. 81. – №. 22. – P. 12465-12471.
222. Liu S., Yang W., Shen L. et al. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection // *Journal of virology*. – 2009. – V. 83. – №. 4. – P. 2011-2014.
223. Sandrin V., Boulanger P., Penin F. et al. Assembly of functional hepatitis C virus glycoproteins on infectious pseudoparticles occurs intracellularly and requires concomitant incorporation of E1 and E2 glycoproteins // *Journal of general virology*. – 2005. – V. 86. – №. 12. – P. 3189-3199.
224. Goffard A., Callens N., Bartosch B. et al. Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins // *Journal of virology*. – 2005. – V. 79. – №. 13. – P. 8400-8409.
225. Owsianka A.M., Timms J.M., Tarr A.W. et al. Identification of conserved residues in the E2 envelope glycoprotein of the hepatitis C virus that are critical for CD81 binding // *Journal of virology*. – 2006. – V. 80. – №. 17. – P. 8695-8704.
226. Rothwangl K.B., Manicassamy B., Uprichard S.L., Rong L. Dissecting the role of putative CD81 binding regions of E2 in mediating HCV entry: putative CD81 binding region 1 is not involved in CD81 binding // *Virology journal*. – 2008. – V. 5. – №. 1. – P. 1-12.
227. Molesti E., Milani A., Terregino C., Cattoli G., Temperton N.J. Comparative serological assays for the study of H5 and H7 avian influenza viruses // *Influenza Research and Treatment*. – 2013. – V. 2013.
228. Molesti E., Wright E., Terregino C. et al. Multiplex evaluation of influenza neutralizing antibodies with potential applicability to in-field serological studies // *Journal of immunology research*. – 2014. – V. 2014.

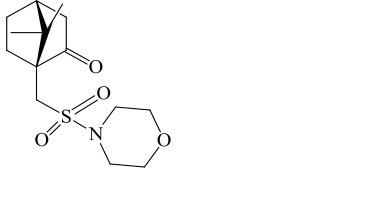
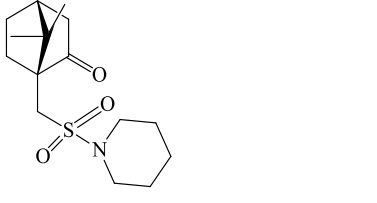
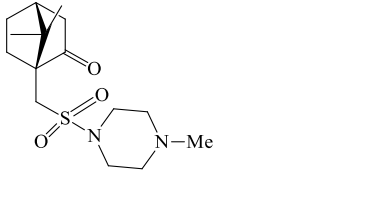
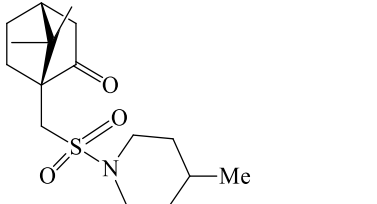
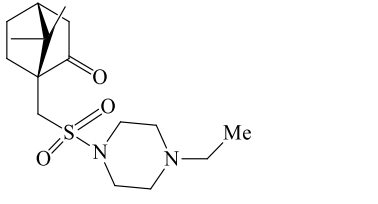
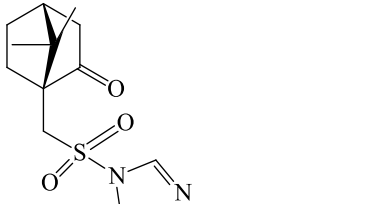
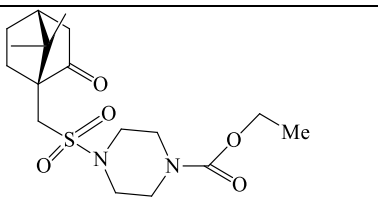
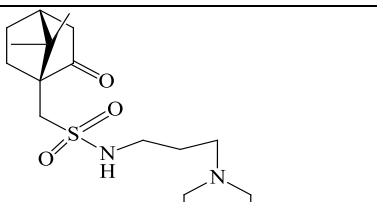
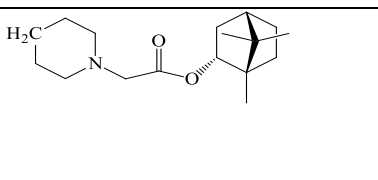
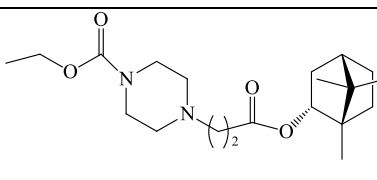
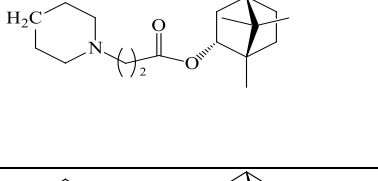
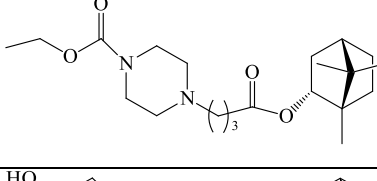
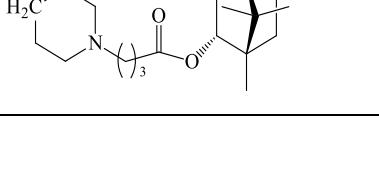
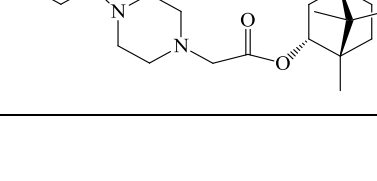
229. Wright E., Hayman D.T., Vaughan A. et al. Virus neutralising activity of African fruit bat (*Eidolon helvum*) sera against emerging lyssaviruses // *Virology*. – 2010. – V. 408. – №. 2. – P. 183-189.
230. Alberini I., Del Tordello E., Fasolo A. et al. Pseudoparticle neutralization is a reliable assay to measure immunity and cross-reactivity to H5N1 influenza viruses // *Vaccine*. – 2009. – V. 27. – №. 43. – P. 5998-6003.
231. Mallajosyula V.V., Citron M., Ferrara F. et al. Influenza hemagglutinin stem-fragment immunogen elicits broadly neutralizing antibodies and confers heterologous protection // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – V. 111. – №. 25. – P. E2514-E2523.
232. Corti D., Voss J., Gamblin S.J. et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins // *Science*. – 2011. – V. 333. – №. 6044. – P. 850-856.
233. Mei-ying W.Y., Bartosch B., Zhang P. et al. Neutralizing antibodies to hepatitis C virus (HCV) in immune globulins derived from anti-HCV-positive plasma // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – V. 101. – №. 20. – P. 7705-7710.
234. Meunier J.C., Engle R.E., Faulk K. et al. Evidence for cross-genotype neutralization of hepatitis C virus pseudo-particles and enhancement of infectivity by apolipoprotein C1 // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – V. 102. – №. 12. – P. 4560-4565.
235. Owsianka A., Tarr A.W., Juttla V.S. et al. Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein // *Journal of virology*. – 2005. – V. 79. – №. 17. – P. 11095-11104.
236. Johansson D.X., Voisset C., Tarr A.W. et al. Human combinatorial libraries yield rare antibodies that broadly neutralize hepatitis C virus // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – V. 104. – №. 41. – P. 16269-16274.
237. Law M., Maruyama T., Lewis J. et al. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge // *Nature medicine*. – 2008. – V. 14. – №. 1. – P. 25-27.

238. Owsianka A.M., Tarr A.W., Keck Z.Y. et al. Broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the hepatitis C virus E2 glycoprotein // *The Journal of general virology*. – 2008. – V. 89. – №. Pt 3. – P. 653.
239. Perotti M., Mancini N., Diotti R.A. et al. Identification of a broadly cross-reacting and neutralizing human monoclonal antibody directed against the hepatitis C virus E2 protein // *Journal of virology*. – 2008. – V. 82. – №. 2. – P. 1047-1052.
240. Netski D.M., Mosbrugger T., Depla E. et al. Humoral immune response in acute hepatitis C virus infection // *Clinical infectious diseases*. – 2005. – V. 41. – №. 5. – P. 667-675.
241. Pestka J.M., Zeisel M.B., Bläser E. et al. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2007. – V. 104. – №. 14. – P. 6025-6030.
242. Wong J.A., Bhat R., Hockman D. et al. Recombinant hepatitis C virus envelope glycoprotein vaccine elicits antibodies targeting multiple epitopes on the envelope glycoproteins associated with broad cross-neutralization // *Journal of virology*. – 2014. – V. 88. – №. 24. – P. 14278-14288.
243. Colombatto P., Brunetto M.R., Maina A.M. et al. HCV E1E 2-MF 59 vaccine in chronic hepatitis C patients treated with PEG-IFN α 2a and R ibavirin: a randomized controlled trial // *Journal of Viral Hepatitis*. – 2014. – V. 21. – №. 7. – P. 458-465.
244. Brown K.S., Keogh M.J, Owsianka A.M. et al. Specific interaction of hepatitis C virus glycoproteins with mannan binding lectin inhibits virus entry // *Protein & cell*. – 2010. – V. 1. – №. 7. – P. 664-674.
245. Hamed M.R., Brown R.J., Zothner C. et al. Recombinant human L-ficolin directly neutralizes hepatitis C virus entry // *Journal of innate immunity*. – 2014. – V. 6. – №. 5. – P. 676-684.
246. Bankwitz D., Vieyres G., Hueging K. et al. Role of hypervariable region 1 for the interplay of hepatitis C virus with entry factors and lipoproteins // *Journal of virology*. – 2014. – V. 88. – №. 21. – P. 12644-12655.

247. Higa M.M., Petersen J., Hooper J., Doms R.W. Efficient production of Hantaan and Puumala pseudovirions for viral tropism and neutralization studies // *Virology*. – 2012. – V. 423. – №. 2. – P. 134-142.
248. Heyndrickx L., Heath A., Sheik-Khalil E. et al. International Network for Comparison of HIV Neutralization Assays: The NeutNet Report II // *PloS one*. – 2012. – V. 7. – № 5. – P. e36438.
249. Fenyö E.M., Heath A., Dispinseri S. et al. International network for comparison of HIV neutralization assays: the NeutNet report // *PloS one*. – 2009. – V. 4. – №. 2. – P. e4505.
250. Plotkin S.A. Correlates of protection induced by vaccination // *Clinical and vaccine immunology*. – 2010. – V. 17. – №. 7. – P. 1055-1065.
251. Roberts A., Kretzschmar E., Perkins A.S. et al. Vaccination with a recombinant vesicular stomatitis virus expressing an influenza virus hemagglutinin provides complete protection from influenza virus challenge // *Journal of virology*. – 1998. – V. 72. – №. 6. – P. 4704-4711.
252. Kushnir N., Streatfield S.J., Yusibov V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development // *Vaccine*. – 2012. – V. 31. – №. 1. – P. 58-83.
253. Volkova N.V., O.V. Pyankov, A.V. Ivanova, A.A. Isaeva, A.V. Zybkina, E. I. Kazachinskaya, D.N. Shcherbakov. Prototype of a DNA vaccine against the Marburg virus // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2021. – P. 475-478.
254. Полежаева О.А., Зыбкина А.В., Зайковская А.В., Пьянков О.В., Пьянков С.А., Семенова А.В., Кочнева Г.В., Щербаков Д.Н. Получение иммуноглобулинов класса Y, нейтрализующих вирус Марбург // *Проблемы особо опасных инфекций*. – 2020. – №. 4. – С. 86-91.
255. Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Semenova M.D., Shtro A.A., Orshanskaya I.R., Zarubaev V.V., Salakhutdinov N.F. Synthesis and in vitro study of novel borneol derivatives as potent inhibitors of the influenza A virus // *MedChemComm*. – 2017. – V. 8. – №. 5. – P. 960-963.

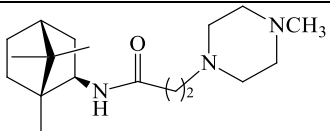
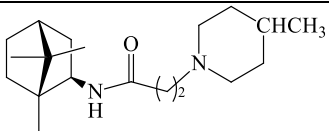
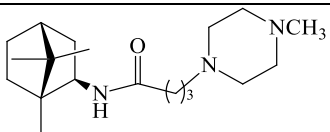
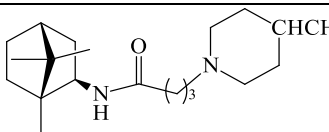
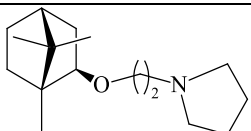
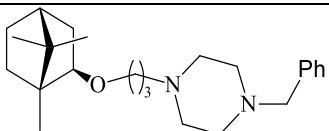
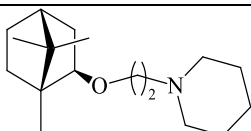
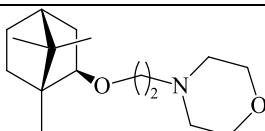
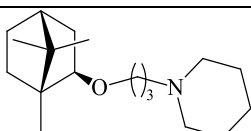
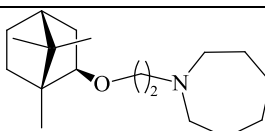
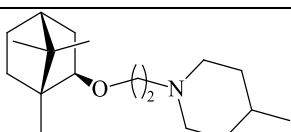
256. Kononova A.A., Sokolova A.S., Cheresiz S.V., Yarovaya O.I., Nikitina R.A., Chepurnov A.A., Pokrovsky A.G., Salakhutdinov N.F. N-Heterocyclic borneol derivatives as inhibitors of Marburg virus glycoprotein-mediated VSIV pseudotype entry // *MedChemComm.* – 2017. – V. 8. – №. 12. – P. 2233-2237.
257. Sokolova A.S., Yarovaya O.I., Bormotov N.I., Shishkina L.N., Salakhutdinov N.F. Synthesis and antiviral activity of camphor-based 1, 3-thiazolidin-4-one and thiazole derivatives as Orthopoxvirus-reproduction inhibitors // *MedChemComm.* – 2018. – V. 9. – №. 10. – P. 1746-1753.
258. Ren J., Zhao Y., Fry E.E., Stuart D.I. Target identification and mode of action of four chemically divergent drugs against Ebolavirus infection // *Journal of medicinal chemistry.* – 2018. – V. 61. – №. 3. – P. 724-733.

Приложение 1. Структуры исследуемых соединений

Номер соединения	Структура	Номер соединения	Структура
производные (1S)-(+)-камфора-10-сульфокислоты			
1		5	
2		6	
3		7	
4		8	
производные (-)-борнеола			
9		29	
10		30	
11		31	

12		32	
13		33	
14		34	
15		35	
16		36	
17		37	
18		38	
19		39	
20		40	
21		41	
22		42	
23		43	

24		44	
25		45	
26		46	
27		47	
28			
производные (+)- и (-)-изоборнеола			
48		50	
49		51	
производные (-)-изоборниламина			
52		58	
53		59	
54		60	
55		61	

56		62	
57		63	
производные изборнеола			
64		68	
65		69	
66		70	
67			

Благодарности

Работа выполнена в лаборатории иммунохимии отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Автор выражает благодарность канд. биол. наук Кулемзину С. В. за предоставление плазмиды pCMV(CAT)T7-SB100 для получения клеток-продуцентов на основе системы Sleeping Beauty, д-ру биол. наук Чепурнову А.А. за предоставление коровых частиц на основе BBC, Шаньшину Д.В. за хроматографическую очистку рекомбинантных антител ADI-15742 и ADI-15999, Арипову В.С. за помощь в выделении IgY антител, Колосовой Е.А. и канд. биол. наук Каплину В.С. за советы по выделению желточных антител, канд. биол. наук Щербаковой Н.С. за обучение культуральным методам, лаборантам Слесаренко Л.В. и Ануфриковой О.А. за приготовление и стерилизацию питательных сред, канд. биол. наук Иматдинову И.Р. за обучение культуральным методам и совет по оптимизации генетической конструкции, канд. биол. наук Зайковской А.В. за проведение экспериментов на натуральном эболавирусе Заира, д-ру хим. наук Яровой О.И. и сотрудникам лаборатории физиологически активных веществ НИОХ им. Н.Н. Ворожцова СО РАН (канд. хим. наук Соколовой А.С., Барановой Д.В., Ковалёвой К.С.) за синтез и предоставление соединений, Мордвиновой Е.Д. за ценные советы по работе в программе ChemDraw, канд. биол. наук Баеву Д.С. за теоретический докинг и проведение моделирования, канд. биол. наук Кононовой Ю.В. за рекомендации в написании диссертации и помощи в проведении экспериментов на культурах клеток, канд. биол. наук Волковой Н.В., канд. хим. наук Исаевой А.А., Шапровой О.Н. за советы по оформлению диссертации.

Автор выражает особую благодарность научному руководителю – канд. биол. наук Щербакову Д.Н. за помощь и поддержку в написании диссертации и проведении экспериментов.

Также автор выражает отдельную благодарность д-ру биол. наук Лавряшиной М.Б. за открытие интереса к науке.

Работа поддержана грантом РФФИ 19-34-90076 Аспиранты.