

Химический факультет Московского государственного университета имени  
М.В. Ломоносова  
ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени  
М.П. Чумакова»

На правах рукописи



Дуева Евгения Владимировна

**РАЗРАБОТКА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ИНГИБИТОРОВ РЕПРОДУКЦИИ  
ПЕРЕНОСИМЫХ КЛЕЩАМИ ФЛАВИВИРУСОВ**

02.00.16 – медицинская химия

диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
к.х.н., с.н.с. Палюлин В. А.

Научный консультант:  
к.б.н. Козловская Л. И.

Москва – 2016

# ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
ГЛАВА 1. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РОДА <i>FLAVIVIRUS</i> .....	11
1.1. Вирус клещевого энцефалита .....	12
1.2. Вирус Повассан.....	14
ГЛАВА 2. КРАТКАЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА.....	16
2.1. Геном и белки флавивирусов.....	16
2.2. Цикл репликации флавивирусов.....	18
2.3. Структура белка E .....	19
2.4. Укладка sE.....	23
ГЛАВА 3. СЛИЯНИЕ .....	26
3.1. Классы белков слияния .....	26
3.2. Перестройки белка E флавивирусов при слиянии.....	28
3.3. Условия слияния флавивирусов .....	30
3.4. Методы исследования слияния .....	31
3.5. Сенсоры кислотности среды и инициация слияния .....	33
3.6. Влияние остатков гистидина на слияние флавивирусов .....	34
ГЛАВА 4. ИНГИБИТОРЫ РЕПРОДУКЦИИ ВКЭ.....	36
4.1. Биотехнологические препараты.....	37
4.2. Низкомолекулярные соединения.....	38
4.3. Ингибиторы слияния .....	42
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	59
ГЛАВА 1. МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ .....	59
1.1. Структуры для моделирования.....	59
1.2. Выравнивание аминокислотных последовательностей.....	59
1.3. Моделирование структур белков E ВКЭ и ПОВ по гомологии.....	59
1.4. Виртуальный скрининг .....	60
1.5. Моделирование молекулярной динамики.....	63
ГЛАВА 2. ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	64
2.1. Клетки и вирусы .....	64
2.2. Определение титра ВКЭ.....	65
2.3. Приготовление растворов соединений.....	65
2.4. Определение цитотоксичности.....	65
2.5. Определение противовирусной активности соединений .....	66

2.6. Определение количеств РНК ВКЭ методом ПЦР в реальном времени .....	67
2.7. Определение общего количеств белка E методом иммуноферментного анализа (ИФА).....	69
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	70
ГЛАВА 1. МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУР БЕЛКОВ sE И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА ДОКИНГА .....	70
1.1. Выравнивание последовательностей .....	70
1.2. Качество моделей .....	72
1.3. Сравнение областей связывания <i>n</i> -октил- $\beta$ -D-глюкозида белков E ДНГВ, ВКЭ и ПОВ .....	73
1.4. Валидация метода докинга.....	75
ГЛАВА 2. ПРОИЗВОДНЫЕ 1,4-ДИГИДРОПИРИДИНА И 1,3,5-ТИАДИАЗИНА КАК ИНГИБИТОРЫ ВКЭ И ПОВ .....	77
2.1. Характеристика базы химических соединений ХимЭкс .....	77
2.2. Докинг и испытания .....	77
2.3. Идентификация стадии инфекционного цикла ПОВ, ассоциированной с ингибированием репродукции соединением 55.....	79
2.4. Взаимодействие с неродственным безоболочечным вирусом .....	79
2.5. Анализ способов связывания соединений .....	81
ГЛАВА 3. МОДЕЛИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ.....	83
3.1. Оценка рK <sub>a</sub> остатков гистидина.....	83
3.2. Докинг молекул 55 карман модели sE ПОВ.....	84
3.3. Изгибание структуры белка.....	85
3.4. Поведение ингибитора .....	87
3.5. Внутримолекулярные водородные связи sE.....	90
3.6. Обсуждение результатов моделирования МД .....	92
3.7. Заключение.....	95
ГЛАВА 4. ПРОИЗВОДНЫЕ 4-АМИНОТЕТРАГИДРОХИНАЗОЛИНА КАК ИНГИБИТОРЫ ВКЭ.....	96
4.1. Определение цитотоксичности и активности 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксидов против ВКЭ штамма Абсеттаров.....	97
4.2. Идентификация стадии инфекционного цикла ВКЭ, ассоциированной с ингибированием репродукции.....	99
4.4. Изучение способа связывания методом докинга .....	100
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ 4-АМИНОТЕТРАГИДРОХИНАЗОЛИН-N-ОКСИДОВ ПРОТИВ РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ ВКЭ .....	103
5.1. Анализ мутаций в кармане ВКЭ .....	103
5.2. Используемые штаммы .....	104

<b>5.3. Спектр активности 4-аминотетрагидрохиназолинов .....</b>	<b>106</b>
<b>5.4. Снижение титров вирусов под действием соединения 73 в концентрации 50 мкМ..</b>	<b>107</b>
<b>5.5. Характеристика образцов вирусов, использованных в работе штаммов .....</b>	<b>108</b>
<b>5.6. Заключение.....</b>	<b>110</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>112</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>113</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ .....</b>	<b>127</b>
<b>Приложение 1. Краткий словарь вирусологических терминов .....</b>	<b>127</b>
<b>Приложение 2. Соединения базы ХимЭкс, не проявившие активность в концентрации 10 мкМ.....</b>	<b>128</b>

# СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

## Общие

- АН – аналоги нуклеозидов  
БОЕ – бляшкообразующая единица  
ВСЧ – вирусная субчастица  
ДМСО – диметилсульфоксид  
ИГ – иммуноглобулин  
ИФА – иммуноферментный анализ  
КЖ – культуральная жидкость  
КЭ – клещевой энцефалит  
КЭМ – криоэлектронная микроскопия  
НФБ – натрий-фосфатный буфер  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
РНК – рибонуклеиновая кислота  
РСЧ – рекомбинантная субвирусная частица  
СВЧ – субвирусная частица  
СПЭВ – культура клеток почки эмбриона свиньи версенизированной  
*транс-АГ* – *транс*-аппарат Гольджи  
ФОЕ – фокусообразующая единица  
ФТС – фетальная телячья сыворотка  
ЦПД – цитопатическое действие  
ЭПР – эндоплазматический ретикулум  
СС<sub>50</sub> – полумаксимальная цитотоксическая концентрация  
ЕС<sub>50</sub> – полумаксимальная эффективная концентрация  
IFN – интерферон  
RD – культура клеток рабдомиосаркомы человека

## Названия вирусов

- ВЖЛ – вирус желтой лихорадки  
ВКО – вирус клещей оленей  
ВКЭ – вирус клещевого энцефалита  
ВЛЗН – вирус лихорадки Западного Нила  
ВЯЭ – вирус японского энцефалита  
ДНГВ – вирус денге  
ПОВ – вирус Повассан

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Заболевания, вызываемые представителями рода *Flavivirus*, наиболее известными из которых являются вирусы денге (ДНГВ), лихорадки Западного Нила (ВЛЗН), жёлтой лихорадки (ВЖЛ), Японского энцефалита (ВЯЭ), клещевого энцефалита (ВКЭ), вирус Зика и другие, представляют серьезную проблему для здравоохранения. Они широко распространены по всему миру, особенно в тропических регионах, и переносятся комарами или клещами. На данный момент не существует препаратов, которые бы использовались для специфического лечения флавивирусных инфекций. Несмотря на то, что против некоторых флавивирусов разработаны вакцины, пример эпидемии лихорадки Западного Нила и вспышки вируса Зика наглядно демонстрирует, что человечество не застраховано от быстрого распространения уже известных и возникающих новых флавивирусных инфекций и разработка лекарств против них является важнейшей задачей.

Для России наиболее актуальной является проблема клещевого энцефалита (КЭ): ежегодно количество случаев заболевания КЭ в России достигает 3 000. Помимо этого, имеются сочетанные очаги ВКЭ и других флавивирусов, к примеру, ВЛЗН или вируса Повассан (ПОВ). Клинические проявления КЭ характеризуются тяжелым течением, треть случаев заканчивается осложнениями разной степени тяжести – инвалидизацией и переходом в хронические формы [1]. Наиболее эффективным методом борьбы с КЭ является своевременная вакцинация [2].

В настоящее время успешно применяются четыре вакцины против КЭ, признанные эффективными и безопасными [3]. Однако уровень вакцинирования населения РФ по-прежнему остается низким, а заболеваемость КЭ растет в некоторых регионах [4, 5]. В РФ на территориях, эндемичных по КЭ, проживает порядка 64 млн. человек [6], с учетом необходимости ревакцинации каждые 3–5 лет это создает колоссальную экономическую нагрузку на систему здравоохранения. Некоторые группы населения невозможно охватить прививками – это, к примеру, граждане, имеющие отвод от вакцинирования по медицинским показаниям. В группе риска заражения КЭ находятся не только жители эндемичных территорий – в связи с возрастающей мобильностью населения увеличивается туристический поток в эндемичные районы в сезон пиковой активности клещей. На данный момент помимо терапии специфическим иммуноглобулином, применение которого сопряжено со многими сложностями, не представлено препаратов с доказанной эффективностью для лечения КЭ. Таким образом, существует необходимость в разработке новых подходов и препаратов для лечения КЭ и других близкородственных флавивирусных инфекций.

**Степень разработанности темы.** Наиболее изученными в отношении

антифлавивирусной активности среди низкомолекулярных соединений являются аналоги нуклеозидов, действующие на процесс вирусной репликации и ингибирующие активность вирусной РНК-полимеразы. Тем не менее, к настоящему моменту ни один из представителей этого класса не введен в клиническую практику для лечения флавивирусных инфекций. Большинство исследований направлено на изучение активности малых молекул против переносимых комарами флавивирусов, в частности ДНГВ, и лишь единичные работы посвящены их исследованию в отношении флавивирусов, переносимых клещами. На сегодняшний день известно крайне малое количество соединений, действующих на другие белки и стадии «жизненного» цикла флавивирусов. Одним из перспективных направлений является поиск ингибиторов слияния флавивирусов.

Флавивирусы являются оболочечными вирусами. На начальных этапах инфекции в результате слияния вирусной и клеточной мембран происходит проникновение вирусного генетического материала в цитоплазму клетки, где может быть иницирован процесс репликации. Для слияния двух мембран требуется участие белков оболочки Е флавивирусов [7]. Под действием низкого рН эндосом происходит необратимая конформационная перестройка белков Е из метастабильных димеров в шипообразные тримеры, атакующие мембрану клетки хозяина. В результате дальнейших конформационных перестроек образуется пора, соединяющая два липидных бислоя, через которую вирусный генетический материал попадает в клетку.

К настоящему времени накоплено значительное количество информации о факторах, влияющих на процесс слияния, и о строении вирионов флавивирусов. Для многих флавивирусов получены рентгеноструктурные данные о белках Е в димерных и тримерных формах. С использованием структуры растворимого эктодомена белка Е (sE) ДНГВ и докинга были предложены низкомолекулярные соединения, взаимодействующие со специфичной полостью между доменами I и II в димере белка Е и ингибирующие репродукцию флавивирусов, предотвращая слияние вирусной и клеточной мембран [8]. Эти соединения называются *ингибиторами слияния* флавивирусов. Терапевтическое применение таких ингибиторов могло бы иметь лечебный эффект за счет снижения вирусной нагрузки на начальных этапах инфекции.

Благодаря наличию кристаллографических данных о структуре белка оболочки ДНГВ в комплексе с малой молекулой-детергентом [9] становится возможным моделирование по гомологии белков оболочки других флавивирусов. В данной работе рассмотрены вирус клещевого энцефалита и родственный ему вирус Повассан, представляющий интерес, так как среди переносимых клещами флавивирусов филогенетически и по антигенной структуре

наиболее отдален от ВКЭ. Разработка соединений, обладающих ингибиторной активностью против этих двух вирусов, будет являться предпосылкой к получению малых молекул, активных против широкого спектра переносимых клещами флавивирусов.

Таким образом, данная работа является логическим продолжением мировой практики исследования флавивирусов и разработки средств борьбы с флавивирусными инфекциями. Наряду с этим, она представляет собой первый пример поиска ингибиторов слияния флавивирусов, переносимых клещами.

**Целью** работы являлась разработка низкомолекулярных ингибиторов репродукции ВКЭ и ПОВ, связывающихся с белком sE оболочки флавивирусов и действующих на стадию слияния вирусной и клеточной мембран. Для этого в работе были поставлены и решены следующие основные **задачи**:

- моделирование структуры белков оболочки sE флавивирусов;
- виртуальный скрининг библиотек низкомолекулярных соединений для отбора потенциальных ингибиторов слияния флавивирусов;
- молекулярный дизайн структур потенциальных ингибиторов слияния флавивирусов, основанный на знании структуры мишени;
- определение цитотоксичности и ингибиторной активности отобранных соединений против репродукции ВКЭ и ПОВ в культуре клеток;
- определение стадии жизненного цикла вирусов, на которую влияют идентифицированные соединения;
- анализ механизма ингибирования репродукции методом молекулярной динамики;
- анализ взаимодействий ингибиторов репродукции флавивирусов с белками sE и анализ взаимосвязи между структурами этих низкомолекулярных соединений и их противовирусной активностью;
- исследование специфичности действия ингибиторов репродукции ВКЭ по отношению к различным штаммам вируса.

**Научная новизна.** В ходе работы впервые были построены модели пространственной структуры белков оболочки sE ВКЭ и ПОВ. Была разработана методика экспериментального скрининга низкомолекулярных соединений для выявления ингибиторной активности в отношении ВКЭ и ПОВ в культуре клеток и разработаны методики исследования механизма действия ингибиторов. Были идентифицированы ингибиторы репродукции ВКЭ и ПОВ, обладающие высокой противовирусной активностью, принадлежащие различным классам химических соединений (1,4-дигидропиридины, 1,3,5-тиадиазины и 4-

аминотетрагидрохиназолин-N-оксиды). Исследованы соотношения между структурой идентифицированных ингибиторов репродукции и их противовирусной активностью. Экспериментально показан широкий спектр активности 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксидов против различных штаммов ВКЭ, относящихся ко всем известным подтипам. На примере этих соединений впервые продемонстрирована возможность ингибировать репродукцию ВКЭ разных штаммов и подтипов.

Механизм противовирусного действия предложенных ингибиторов был исследован *in vitro* и при помощи сравнительного моделирования молекулярной динамики различных форм белков оболочки sE. Моделирование молекулярной динамики позволило прояснить механизм действия ингибиторов репродукции флавивирусов. Установлено изменение конформационной подвижности димеров белков sE при связывании с молекулами ингибитора. Экспериментально подтверждена гипотеза о взаимодействии ингибиторов с поверхностью вирионов на стадии их проникновения в клетку.

Впервые выявлены новые факторы, влияющие на результат определения активности соединений, действующих на белки оболочки вирусов. Показано влияние белка sE, не задействованного в формировании инфекционных вирионов, на величину активности ингибиторов репродукции.

**Практическая значимость работы.** Полученные в ходе работы модели пространственной структуры белков оболочки sE ВКЭ и ПОВ позволили впервые проводить основанный на знании структуры биомишени дизайн ингибиторов слияния флавивирусов, переносимых клещами. Данные о структурах и способах связывания с белком sE идентифицированных низкомолекулярных соединений, обладающих противовирусной активностью, могут быть применены для дальнейшего поиска новых ингибиторов репродукции флавивирусов методами, основываемыми на знании структур лигандов, что было невозможно до нашей работы.

Разработанные методики экспериментального скрининга и исследования механизма действия низкомолекулярных соединений *in vitro* отношении ВКЭ и ПОВ клеток могут применяться для других родственных вирусов.

Выявленное в ходе работы влияние содержания белка E, не задействованного в формировании инфекционных вирионов, на определение величин активности ингибиторов репродукции необходимо учитывать при подготовке и характеристике вирусных препаратов для тестирования соединений, действующих на белки оболочки, и при сравнении их активностей.

Полученная в ходе моделирования молекулярной динамики информация о влиянии

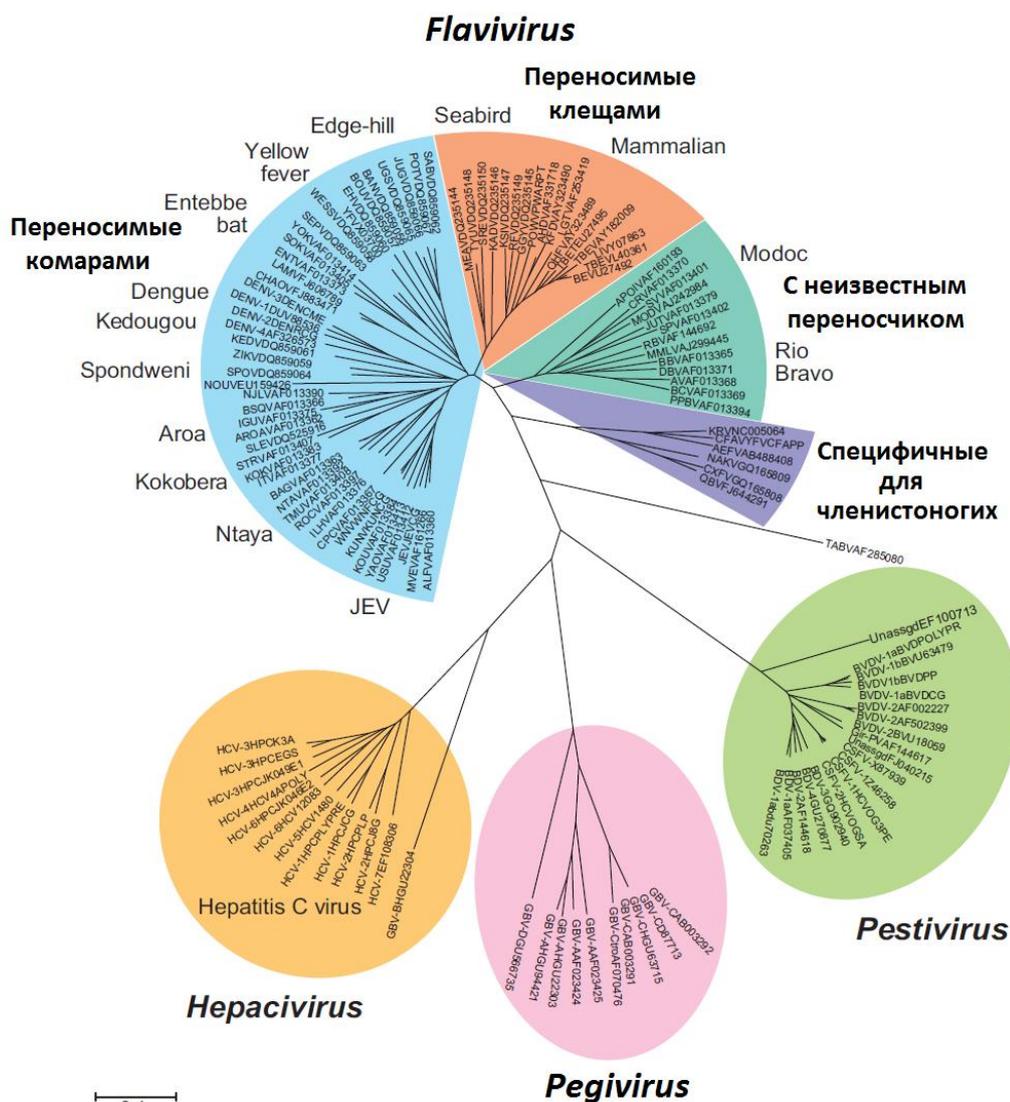
лигандов на конформационную подвижность белков sE важна для детального понимания процесса слияния и конформационного поведения белков оболочки.

*Личный вклад автора* состоит в анализе литературы, постановке локальных задач, планировании стратегии и дизайна экспериментов, интерпретации и обобщении полученных результатов, подготовке материалов к публикации, представлении полученных результатов на конференциях. Автором проведено моделирование структур белков оболочки sE, моделирование и анализ траекторий молекулярной динамики, докинг и дизайн структур потенциальных низкомолекулярных ингибиторов слияния и биологические испытания цитотоксичности и активности 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксидов, исследование механизма действия соединений.

# ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## ГЛАВА 1. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РОДА *FLAVIVIRUS*

Род *Flavivirus* принадлежит семейству *Flaviviridae*, к которому также относят роды *Pestivirus*, *Hepacivirus* и *Pegivirus* [10]. Род *Flavivirus* включает более 50 различных вирусов, многие из которых переносятся комарами или клещами (рис. 1). Наиболее значимые для человека флавивирусные инфекции вызываются вирусами денге (ДНГВ) четырех подтипов, желтой лихорадки (ВЖЛ), японского энцефалита (ВЯЭ), лихорадки Западного Нила (ВЛЗН), клещевого энцефалита (ВКЭ) и Зика. Другие представители рода также могут вызывать тяжелые и даже смертельные заболевания, но вероятность заразиться ими мала и количество зарегистрированных случаев заболеваний относительно невелико. Примерами таких вирусов являются вирус энцефалита Сент-Луиса, энцефалита долины Мюррей, вирус омской геморрагической лихорадки и вирус Повассан [7].



**Рисунок 1** Филогенетические отношения в семействе *Flaviviridae*, основанные на анализе консервативной последовательности РНК-зависимой РНК-полимеразы (*NS5* или *NS5B*). Адаптировано из [7].

### 1.1. Вирус клещевого энцефалита

ВКЭ был открыт в 1937 году на Дальнем Востоке [11]. ВКЭ разделяют на три подтипа: европейский, сибирский и дальневосточный [12]. Европейский подтип циркулирует в Западной, Центральной и Восточной Европе и Корее; сибирский подтип в характерен для европейской и азиатской части России, Урала и Северной Европы; дальневосточный подтип преобладает на Дальнем востоке России, в Китае и Японии [13, 14]. В отдельные филогенетические группы относят генетически далеко отстоящие друг от друга и остальных генотипов штаммы 886-84 и 178-79, выделенные в Иркутской области, Бурятии и Монголии [15, 16].

Основными переносчиками ВКЭ являются клещи рода *Ixodes*, прежде всего *Ixodes persulcatus* и *Ixodes ricinus*. Как правило, вирус передается человеку при присасывании инфицированного клеща, причем передача может происходить на любой активной стадии жизни клеща (личинка, нимфа, имаго). В зависимости от региона, до ~30% случаев укусов остаются незамеченным [13]. Также возможно заражение через слизистую оболочку пищеварительного тракта при употреблении молочных продуктов, полученных от инфицированных животных и не прошедших термической обработки [17-19].

Инкубационный период заболевания составляет в среднем от 7 до 14 дней. В большинстве случаев течение заболевания двухфазное. Первая фаза характеризуется такими симптомами, как высокая температура, слабость, тошнота, головная и мышечная боль. На второй фазе ВКЭ может поражать центральную нервную систему. Возможны различные формы течения второй фазы заболевания:

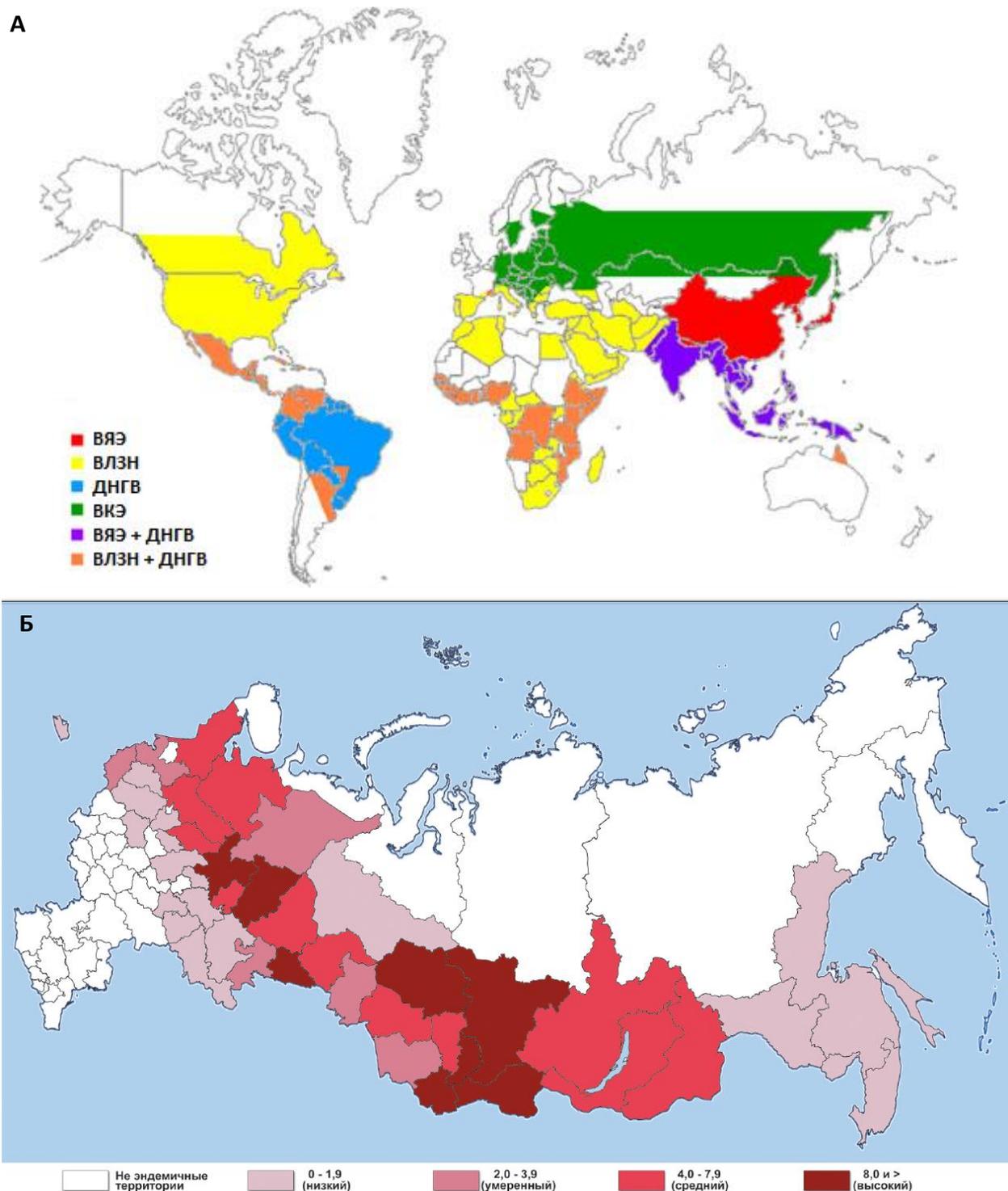
- *Менингеальная форма* является самой распространенной. После начала лихорадки усиливается головная боль, тошнота и рвота, в некоторых случаях развивается светобоязнь. Заболевание длится 1-2 недели, постепенно происходит выздоровление.
- *Менингоэнцефалитическая форма* встречается реже и характеризуется серьезным поражением ЦНС. Наблюдаются слабость, апатия, нарушение двигательных функций. Около 30% случаев летальны. У выживших наблюдаются долговременные неврологические последствия и медленное выздоровление.
- *Полиомиелитические формы* заболевания характеризуются развитием параличей и парезов преимущественно мышц верхнего плечевого пояса и дыхательной мускулатуры.
- *Полирадикулитную форму*, характеризуют болями и повреждением периферийных нервов, иногда сопряженная с менингитом. От данной формы КЭ обычно наблюдается полное восстановление.

*Хроническая (персистентная) инфекция* характеризуется поздним (спустя месяцы и

годы после укуса клеща) проявлением острых неврологических симптомов или усилением симптомов, появившихся во время первой фазы заболевания. Клинические проявления могут включать эпилепсию, паркинсонизм, когнитивные расстройства и прогрессирующую атрофию мышц, в конце концов деменцию и смерть.

В ретроспективных и проспективных клинических исследованиях установлено, что КЭ характеризуется длительным периодом выздоровления, сопряженным с долговременными проблемами со здоровьем. Этот *постэнцефалитический синдром* возникает в примерно 40–60% случаев и включает потери памяти, головные боли, аффективные расстройства и нарушение походки [20, 21].

Ежегодно во всем мире регистрируют около 6 тыс. случаев заболевания КЭ [22, 23]. Заболеваемость клещевым энцефалитом регистрируют в 34 странах (рис. 2) [24-26]. На территории России регистрируют порядка 3000 случаев КЭ в год (рис. 2) [1]; в 1990 и 1996 годах было зарегистрировано более 10000 случаев заболевания. По состоянию на 2016 год эндемичными по заболеванию являются 48 из 85 субъектов РФ [4], в некоторых из которых риск заражения чрезвычайно высок (9,2 на 100 тыс. человек в Красноярском крае, 7,3 в Алтайском крае в 2014 году). В 2015 году зарегистрировано 2308 случаев заболевания на территории РФ [27].



**Рисунок 2. А)** Географическое распределение основных флавивирусных инфекций. Адаптировано из [23]. **Б)** Средние многолетние уровни заболеваемости КЭ по субъектам Российской Федерации (2009 – 2013 гг.), случаев на 100 тыс. человек [26].

## 1.2. Вирус Повассан

Вирус Повассан (ПОВ) был впервые зарегистрирован в 1958 году в городе Повассан, провинция Онтарио, Канада [28]. С тех пор около 100 случаев заболевания было зарегистрировано на территории Канады и США (наиболее часто в штатах Миннесота,

Висконсин и Нью-Йорк [29, 30]) и 17 случаев в Приморском крае в России. Вирус Повассан инфицирует млекопитающих и переносится клещами [31]. Это единственный встречающийся в Северной Америке переносимый клещами арбовирус.

Выделяют два подтипа вируса: прототипный вирус Повассан и вирус клещей оленей (ВКО; идентичность нуклеотидных последовательностей составляет 84%, аминокислотных – 94% [32]). Сходство аминокислотной последовательности полипротеинов ПОВ и ВКЭ составляет ~76%.

Было зарегистрировано 38 видов млекопитающих, инфицируемых вирусом Повассан (мелкие и средних размеров лесные грызуны, сурки, скунсы, а также домашние собаки и кошки). Основным переносчиком прототипного вируса Повассан является *Ixodes persulcatus* и *Ixodes cookei*, высоко специфичный к его первичным хозяевам – суркам и полосатым скунсам [33], в то время как переносчик ВКО *Ixodes scapularis*, основными хозяевами которого являются грызуны, выступает переносчиком возбудителей некоторых болезней человека, в частности, болезни Лайма [34].

Вирус Повассан изредка вызывает энцефалиты и менингиты, обычно заболевание протекает бессимптомно. Нейроинвазивные случаи чаще наблюдаются у детей и пожилых людей. Инкубационный период составляет от 1 до 5 недель после укуса клеща, затем наступает лихорадка, общая слабость, которая может быть ассоциирована с припадками и помутнением сознания. Через несколько дней может наступить кома и развиваться дыхательная недостаточность. Смертность в различных группах наблюдаемых составляет 10–36%. У большей части переживших энцефалит Повассан наблюдаются серьезные неврологические последствия, необходимость в искусственном вентилировании легких, введении желудочного зонда для кормления и специализированной помощи [35, 36]. Для заражения вирусом ПОВ, по некоторым данным, достаточно 15-минутного присасывания клеща [37].

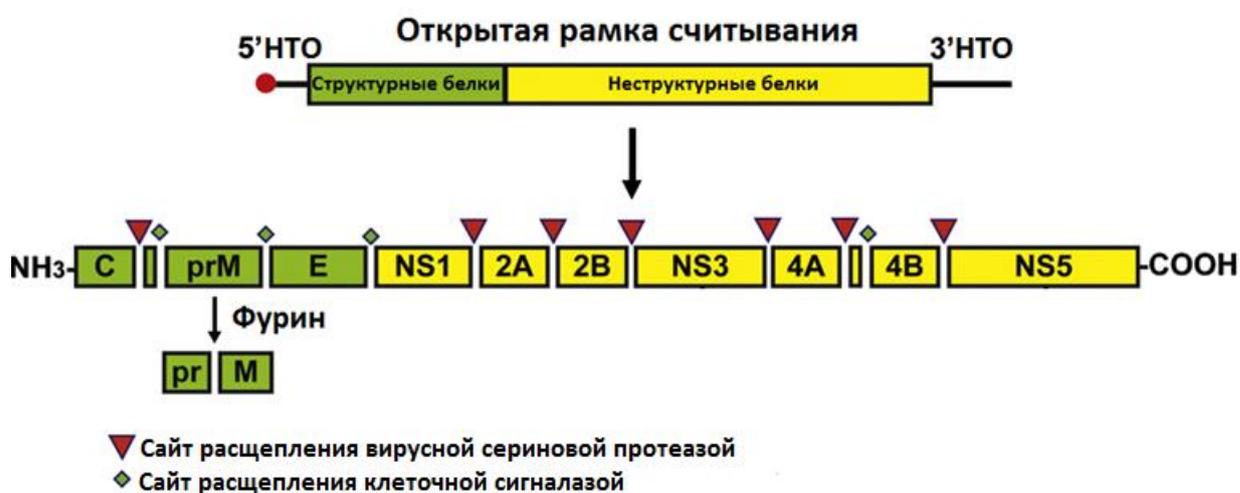
Эпидемиологические данные по США свидетельствуют об увеличении количества случаев заражения вирусом Повассан: в период с 1958 по 1998 регистрировалось порядка 0,7 случаев в год, с 1999 по 2007 – 1,9 случаев, с 2008 по 2012 – 7,8 [36, 38]. Частично это может быть связано с увеличением доступности качественных средств диагностики, однако этому также способствует увеличившаяся серопозитивность поголовья оленей [39].

На Дальнем Востоке вирус Повассан распространяется совместно с ВКЭ, также описаны случаи одновременного заражения обоими вирусами [21].

## ГЛАВА 2. КРАТКАЯ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

### 2.1. Геном и белки флавивирусов

Геном флавивирусов представлен одноцепочечной РНК положительной полярности, состоящей приблизительно из 11 тыс. оснований, с кэп-структурой на 5'-конце, которая защищает вирусный геном от деградации и необходима для инициации трансляции [40, 41]. В геноме закодирован единственный полипротеин, который подвергается посттрансляционной модификации с образованием как минимум 10 функционально различных белков (рис. 3): структурные белки С, ргМ и Е задействованы в формировании вириона, неструктурные белки NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 обеспечивают репликацию вирусного генома в клетке [7].



**Рисунок 3.** Структура генома и расположение сайтов посттрансляционной модификации полипротеина флавивирусов. НТО – нетранслируемая область.

Белок С вместе с РНК образует нуклеокапсид, который покрыт липидной мембраной, в которой, в свою очередь, закорены белки оболочки ргМ и Е. Основной функцией гликозилированного предшественника белка М, ргМ, является защита белков Е от преждевременной перегруппировки и слияния с клеточными мембранами во время транспортировки вирионов по секреторным путям [42]. Белок оболочки Е играет основную роль в процессах сборки и созревания вириона, его проникновения в клетку: он принимает участие в связывании с клеточными рецепторами и является медиатором слияния клеточной и вирусной мембран, а также является мишенью большинства антител, нейтрализующих вирус [43].

Белок NS1 встречается в трех формах: 1) внутриклеточной, 2) экспонированной на поверхности плазматической мембраны клетки и 3) секретируемой во внеклеточное пространство. Секретируемая форма NS1 в значительных количествах накапливается в

сыворотке крови и тканях человека, антитела к секретируемому NS1 могут быть использованы для диагностирования инфекции на ранних стадиях. Секретируемый NS1 образует растворимые гексамерные липопротеиновые частицы. Они могут связываться с незараженными клетками путем взаимодействия с сульфатированными гликозаминогликанами и накапливаться в поздних эндосомах. Функция таких подвергшихся эндоцитозу частиц до сих пор не ясна, возможно, они задействованы в усилении инфекции гомологичных вирусов. Внеклеточная форма NS1 высоко антигенна и вызывает выраженный гуморальный ответ. Внутриклеточная форма NS1 играет ключевую роль в репликации РНК, взаимодействуя с белком NS4A. Антитела, распознающие экспонированный на поверхности клетки NS1, способны вызывать лизис этих клеток и защищать зараженных животных от гибели [44].

Белок NS2A – трансмембранный белок, принимающий участие в формировании репликативного комплекса, взаимодействуя с белками NS3 и NS5, а также с 3'-НТО РНК. Также он, по-видимому, влияет на сборку вирионов. У ДНГВ и ВЛЗН он способен ингибировать сигнальный путь интерферона (IFN) в клетке [7].

NS2B – небольшой ассоциированный с мембраной белок, образующий стабильный комплекс с NS3, служит для прикрепления этого комплекса к мембране и кофактором для сериновой протеазы NS3, участвуя в распознавании субстрата [45].

N-Концевой фрагмент белка NS3 вместе с белком NS2B формирует вирусную сериновую протеазу, которая осуществляет процессинг полипротеина. С-Концевая часть белка представляет собой геликазный домен, задействованный в репликации РНК. NS3 также обладает свойствами сериновой нуклеотидтрифосфатазы, необходимыми, по-видимому, для формирования 5'-кэп-структуры вирусной РНК [46].

NS4A, предположительно, принимает участие в запуске перестройки мембран и/или запуске аутофагии клеток в ответ на вирусную инфекцию [47]. Мембранный белок NS4B направляет и закрепляет репликационный комплекс в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), а также принимает активное участие в подавлении иммунного ответа: ингибирует сигнальные пути IFN; подавляет РНК-интерференцию и формирование стрессовых гранул (плотных цитоплазматических агрегатов, производящихся клетками в ответ на стресс, часто ассоциированных с ЭПР и состоящих из белков и РНК); ингибирует процессы фолдинга белков и контроля за ошибками в этом процессе [48].

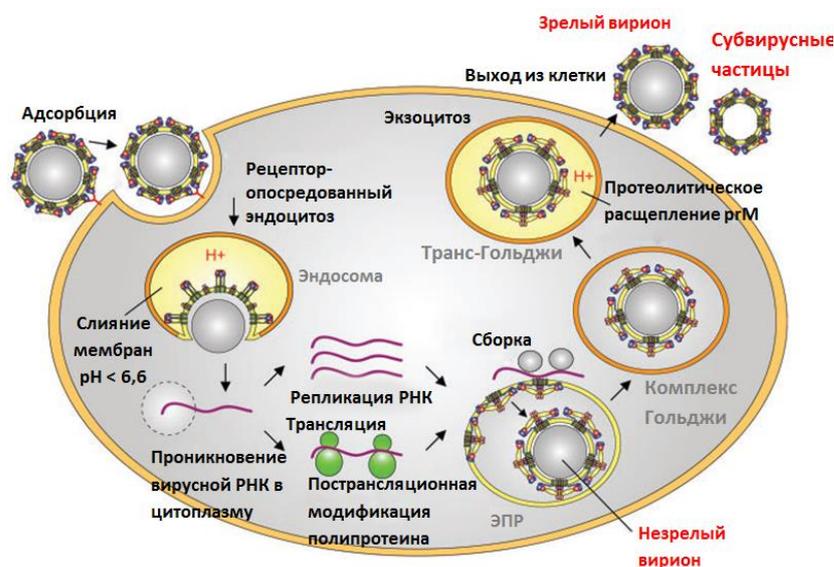
Белок NS5 состоит из двух доменов: вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы, и метилтрансферазного домена, вовлеченного в модификацию вирусных кэп-структур [49]. NS5 является самым консервативным белком флавивирусов.

Для ДНГВ имеются данные о структуре белка E, белка капсида С, белка NS3 (протеазный, геликазный домен и полноразмерная структура), доменов НТФазы, РНК-зависимой РНК-полимеразы NS5 [50, 51].

Со структурами белков ВКЭ и ПОВ дело обстоит иначе. В базе PDB имеются только данные о кристаллической структуре растворимого эктодомена белка оболочки sE ВКЭ.

## 2.2. Цикл репликации флавивируса

Первым шагом в инициации флавивирусной инфекции является прикрепление вирионов к поверхности клетки (рис. 4). Вопрос о необходимости специфических клеточных факторов, которые бы играли роль рецепторов для флавивирусов, до сих пор остается неясным: флавивирусы способны сливаться с искусственными мембранами, не несущими на себе рецепторов [52]. Клеточные факторы, повышающие эффективность адсорбции вируса на клеточной мембране, но не являющиеся необходимыми для развития инфекции, называют факторами связывания (“attachment factors”). В отличие от тех вирусов, для которых связывание с рецептором играет основную роль в определении тропизма и активации белков слияния, при проникновении флавивирусов несколько путей и/или клеточных факторов могут вносить вклад в транспортировку вириона к компартментам с низким рН, где может происходить слияние мембран [53].



**Рисунок 4** Схематическое представление жизненного цикла флавивируса (адаптировано из [60]).

За связывание вириона с поверхностью клетки отвечает белок E вирусной оболочки [54], хотя в некоторых условиях для проникновения в клетку достаточно взаимодействия rM и клеточных факторов [55]. Наиболее хорошо охарактеризованными факторами связывания флавивирусов являются гепарансульфат [56, 57] и специфические для дендритных клеток лектины С-типа DC-SIGN (dendritic cell specific ICAM-3 grabbing nonintegrin) [58, 59].

Гепарансульфат и другие неразветвленные анионные полисахариды (гликозаминогликаны) взаимодействуют с основными участками белка Е, лектины же связываются с углеводными остатками, представленными на белках Е и ргМ [60]. Число и расположение таких сайтов гликозилирования не консервативно даже у разных штаммов одного вируса. Вирионы, связанные с ненейтрализующими антителами, могут проникать в клетку посредством взаимодействия с Fc-рецепторами [61], что в случае ДНГВ может приводить к так называемому антитело-зависимому усилению инфекции.

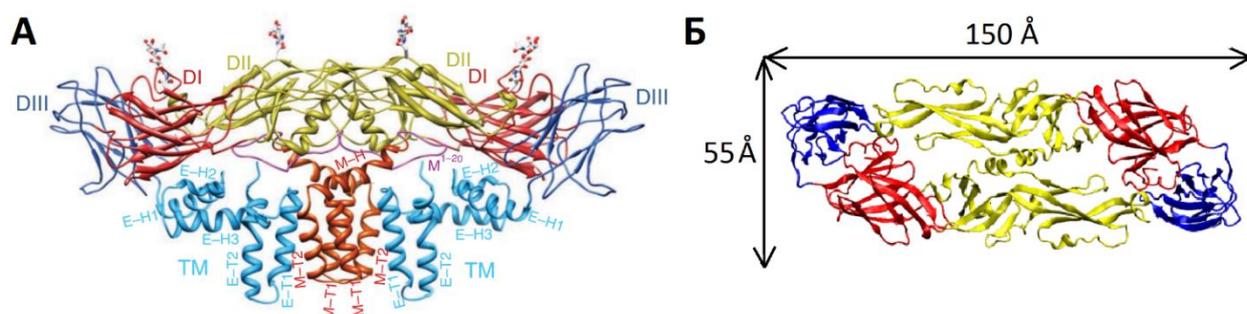
Из элегантного исследования, заключавшегося в наблюдении за индивидуальными вирионами ДНГВ, был сделан вывод, что вирусная частица движется вдоль поверхности клетки до тех пор, пока не встретится с клатриновой «ямкой». За интернализацией в результате клатрин-опосредованного эндоцитоза (хотя в некоторых условиях показано проникновение флавивирусов в клетки без участия клатрина [62]) следует перемещение вириона в раннюю или среднюю эндосому, которые созревают до поздних [63]. Низкий рН поздних эндосом запускает перестройки в вирусных белках оболочки Е, что приводит в итоге к слиянию мембран клетки и вириона, в результате чего вирусная РНК попадает в цитоплазму, где и происходит трансляция вирусного полипротеина рибосомами клетки, его посттрансляционная модификация вирусными и клеточными протеазами и репликация генома флавивирусов.

Репликативные комплексы, состоящие из вирусных неструктурных белков и некоторых клеточных, по-видимому, ассоциированы со специфическими везикулярными структурами, формирующимися в просвете ЭПР при вирусной инфекции. В ЭПР вновь реплицированная РНК и белок капсида С покрываются липидной оболочкой и белками ргМ и Е, образуя незрелые вирионы. Вероятно, в этом процессе принимают участие белки NS2A и NS3. Незрелые частицы транспортируются по экзоцитозному пути. В кислых условиях *транс*-аппарата Гольджи (*транс*-АГ) фузин-опосредованное расщепление ргМ до М ведет к созреванию вириона, которое также сопровождается значительной перестройкой гликопротеиновой оболочки. В конце концов зрелые вирионы, заключенные в везикулы, выходят из клетки в процессе экзоцитоза [64].

### 2.3. Структура белка Е

Белок Е массой ~53кДа представляет собой эктодомен sE (soluble domain), который соединен с мембраной вириона областью стебелька (stem region), образованного спиралями Е-Н, и якоря (membrane anchor), который формируют спирали Е-Т (рис. 5).

Данные об атомной структуре sE были получены для ДНГВ-2, ДНГВ-3, ВЛЗН, ВКЭ, ВЯЭ и вируса Зика методом рентгеноструктурного анализа, а также с помощью криоэлектронной микроскопии (КЭМ) высокого разрешения для ДНГВ и вируса Зика (табл. 1).



**Рисунок 5. А)** Структура комплекса тетрамера Е-М ДНГВ [67]. **Б)** Укладка полипептидной цепи sE ВКЭ в димере. Красным окрашен центральный первый домен, желтым – второй, синим – третий.

Каждый мономер sE содержит три структурных домена (DI – DIII): N-концевой центральный домен I, удлиненный димеризационный домен II и домен III с характерной иммуноглобулиновой (IgC) укладкой. Во всех трех доменах преобладает вторичная  $\beta$ -структура (рис. 5Б). Домены связаны между собой короткими гибкими петлями. Белок может быть N-гликозилирован по одному или двум остаткам аспарагина.

**Таблица 1.** Данные о структурах sE флавивирусов в банке данных PDB.

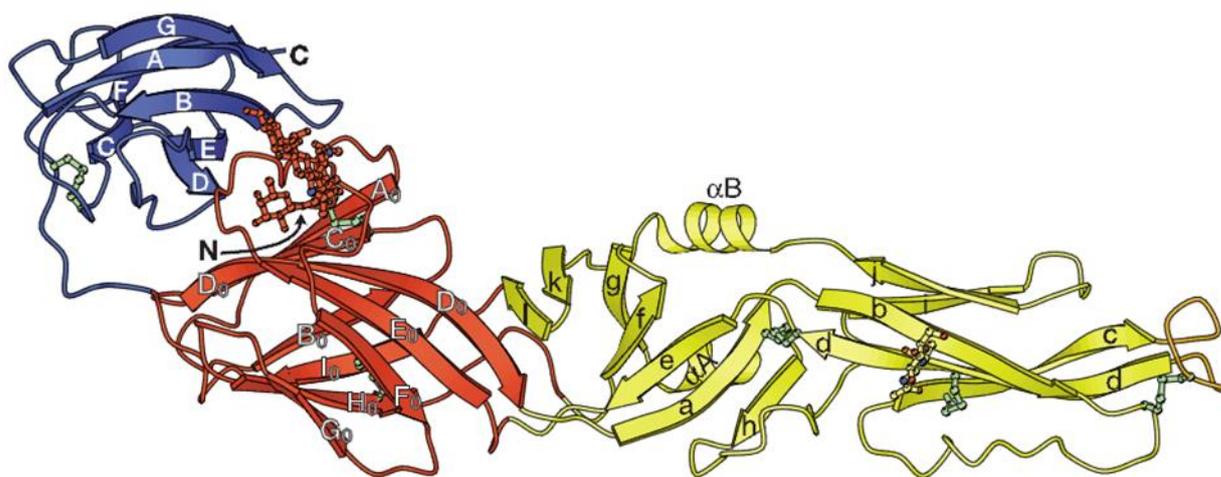
Вирус	Степень олигомеризации	Разрешение, Å	PDB ID	Ссылка
ДНГВ-2	димер	2,75	1OAN	[9]
ДНГВ-2	димер	2,61	1TG8	[65]
ДНГВ-3	димер	3,50	1UZG	[66]
ДНГВ	димер E, комплекс с M	3,50*	3J27	[67]
ВЛЗН	субъединица димера	3,11	2I69	[68]
ВЛЗН	субъединица димера	3,00	2HG0	[69]
ВКЭ	димер	1,90	1SVB	[70]
ВЯЭ	субъединица димера	2,10	3P54	[71]
вирус Зика	димер E, комплекс с антителом	3,0	5JHL	[72]
вирус Зика	димер E, комплекс с M	3,8*	5IRE	[73]
ДНГВ-2	димер, комплекс с prM	2,20	3C5X	[42]
ДНГВ-2	димер, комплекс с <i>n</i> -октил- $\beta$ -D-глюкозидом	2,40	1OKE	[9]
ДНГВ-1	тример	3,11	3G7T	[74]
ДНГВ-2	тример	2,00	1OK8	[75]
ВКЭ	тример	2,70	1URZ	[76]

\* - КЭМ высокого разрешения

### 2.3.1. Домен I

Центральный структурный домен I составляют 3 сегмента, содержащие порядка 120 аминокислотных остатков (а. о. 1 – 51, 137 – 189 и 285 – 302, нумерация по sE ВКЭ). Центральный домен – это восьмитажевый антипараллельный  $\beta$ -бочонок ( $B_0 - I_0$ ) с дополнительным коротким концевым участком цепи  $A_0$ , уложенным параллельно участку  $C_0$ . Ось бочонка располагается параллельно мембране зрелого вириона (рис. 6). Внутренняя поверхность бочонка является высоко гидрофобной. Лист  $A_0C_0D_0E_0F_0$  образует внешнюю

поверхность и содержит консервативный для многих флавивирусов сайт N-гликозилирования (петля  $E_0F_0$ , Asn153); лист  $G_0H_0I_0V_0$  прилегает к мембране вириона. Со стороны N-концевого тяжа  $A_0$  бочонок открыт, с обратной стороны, где водородные связи между тяжами  $F_0$  и  $G_0$  соединяют два  $\beta$ -листа, бочонок закрыт. В I домене содержится 2 дисульфидных мостика. ВЯЭ имеет 5 дополнительных аминокислотных остатков в домене I, формирующих петлю на поверхности между доменами I и III, что может вносить вклад в контроль специфичности связывания флавивирусов с клеточными рецепторами [77].



**Рисунок 6.** Укладка субъединицы *sE* ДНГВ-2 с названиями элементов вторичной структуры [74]. Окраска доменов такая же, как и на рисунке 5.

### 2.3.2. Домен II

Две длинные петли, связывающие пары тяжей домена I  $D_0 - E_0$  и  $H_0 - I_0$ , формируют димеризационный домен II (остатки 52 – 136 и 190 – 284). Это продолговатая, похожая на палец структура. У некоторых флавивирусов (например, ДНГВ-2, ДНГВ-3) поверхность домена II несет дополнительный сайт гликозилирования.

В основе домена II – антипараллельный  $\beta$ -лист, состоящий из 5 коротких тяжей (*gfeah*), с двумя  $\alpha$ -спиралями ( $\alpha A$  и  $\alpha B$ ), расположенными с одной стороны поверхности. Вытянутая часть домена представлена 3-тяжевым  $\beta$ -листом, образованным остатками петли  $D_0E_0$ , и  $\beta$ -шпилькой, состоящей из остатков петли  $H_0I_0$ . Лист *bdc* содержит три дисульфидные связи. Петля *cd* на конце домена выступает в роли *петли слияния* (остатки 98 – 113), высоко консервативной для всех флавивирусов и принимающей непосредственное участие во взаимодействии с клеточной мембраной. Эта последовательность сильно гидрофобна и богата остатками глицина. Петля *cd* стабилизирована дисульфидным мостиком, связывающим конец тяжа *b* и начало тяжа *d*.

В месте сопряжения доменов I и II находится небольшой  $\beta$ -лист, образованный тяжами *k* и *l* и C-концевой частью тяжа  $D_0$ . Он располагается напротив листа *gfeah*. Образованная ими

внешняя поверхность выстлана гидрофильными аминокислотными остатками и контактирует с внешней средой, в отличие от гидрофобных  $\alpha$ -спиралей, располагающихся на обратной стороне листа. Соединение доменов I и II достаточно гибкое, так что угол между ними варьируется в пределах  $20^\circ$  для структур, соответствующих различным стадиям жизненного цикла вируса [67, 78].

### 2.3.3. Домен III

C-Концевой домен димера sE (остатки 303–395) имеет иммуноглобулиновую укладку. Он связан с центральным доменом посредством сегмента длиной около 15 остатков и зафиксирован дисульфидной связью. Ось иммуноглобулиноподобного  $\beta$ -цилиндра перпендикулярна поверхности вириона, а его основание вынесено дальше, чем все остальные части sE. Лист *ABED* обращен к домену I и контактирует с *cd*-петлей домена II другой субъединицы. Лист *CFG* образует внешнюю боковую поверхность димера.

### 2.3.4. Трансмембранные домены

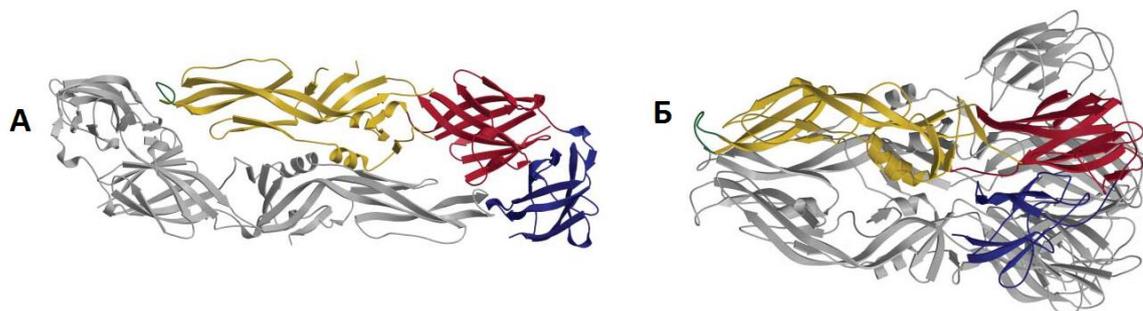
С помощью КЭМ были прояснены особенности структурной организации трансмембранных регионов белка E, которые не разрешены в рентгеноструктурных данных. Спирали стебелька E (E-N1 – E-N3, а.о. 398 – 448 в ДНГВ-2) и M (M-N, а.о. 22 – 37 в ДНГВ-2) лежат между полярными группами внешнего липидного слоя вириона (рис. 4). Стебелек контактирует с обращенной в сторону липидной мембраны стороной эктодомена E и, вероятно, нейтрализует электростатическое отталкивание между фосфатными группами липидного слоя и поверхностью эктодомена E [79, 80].

Трансмембранные домены белков E и M (E-T1 – E-T2, а.о. 452 – 467 и 473 – 491 и E-M1 – E-M2, а.о. 40 – 54 и 58 – 70 в белке M ДНГВ-2) образуют антипараллельные спирали, которые ориентированы перпендикулярно поверхности мембраны и лежат в гидрофобной области мембраны. Соединяющие их петли контактируют с полярными группами внутреннего липидного слоя, но не взаимодействуют с нуклеокапсидом [9, 81].

### 2.3.5. Контакты в димере

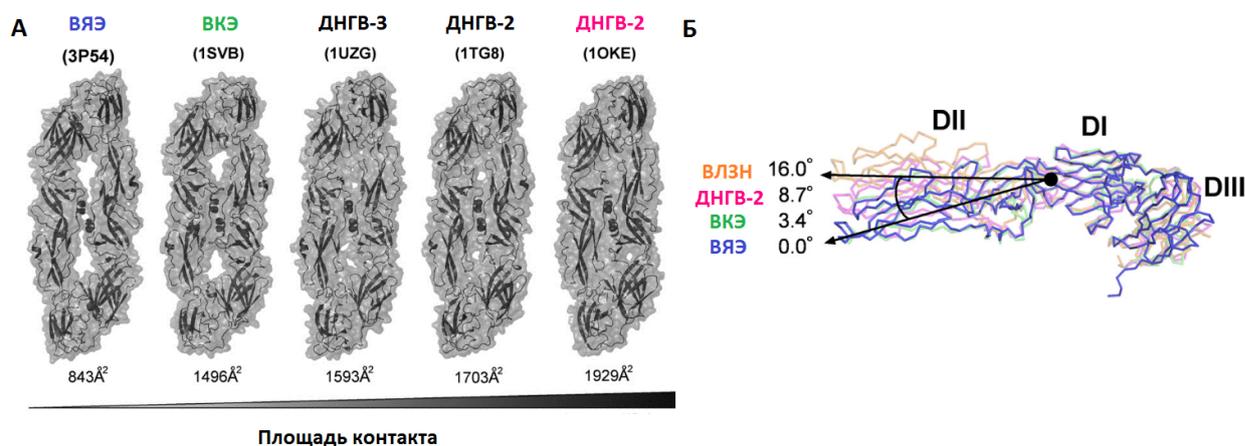
Контакты между субъединицами димера опосредованы в основном полярными и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями между гидрофильными боковыми цепями. Также имеются протяженные неполярные контакты: консервативная петля слияния с экспонированным триптофаном утоплена в гидрофобной полости между I и III доменами противоположной субъединицы. Этот контакт дополнительно защищен олигосахаридом домена I, покрывающим полость и, вероятно, стабилизирующим димер. Внутренняя поверхность между доменами I и III частично гидрофобна, частично гидрофильна. Эти два домена связаны гибким линкером и их положение друг относительно друга может изменяться,

что наиболее ярко проявляется при переходе димеров E в тримеры (рис. 7) [71].



**Рисунок 7.** Относительное положение доменов I и II, связанных гибким линкером **А)** в димерной форме E до слияния и **Б)** тримерной после слияния [78].

Предполагается, что вклад димерных контактов в стабильность вириона может меняться от вируса к вирусу, так как площадь поверхности взаимодействия сильно варьируется (рис. 8). На этот параметр, вероятно, влияет угол, на который отклоняется домен II относительно оси первого домена. Предположение о более слабой связи мономеров E вирусов группы ВЯЭ подтверждается наблюдением, что их белки E в растворе существуют как мономеры, в то время как белки E ВКЭ и ДНГВ образуют димеры [71]. Стабильность зрелых вирионов в случае ВЯЭ могут обеспечивать контакты между соседними димерами.



**Рисунок 8.** **А)** Площадь контакта между мономерами. **Б)** Различное относительное положение домена II у различных флавивирусов [71].

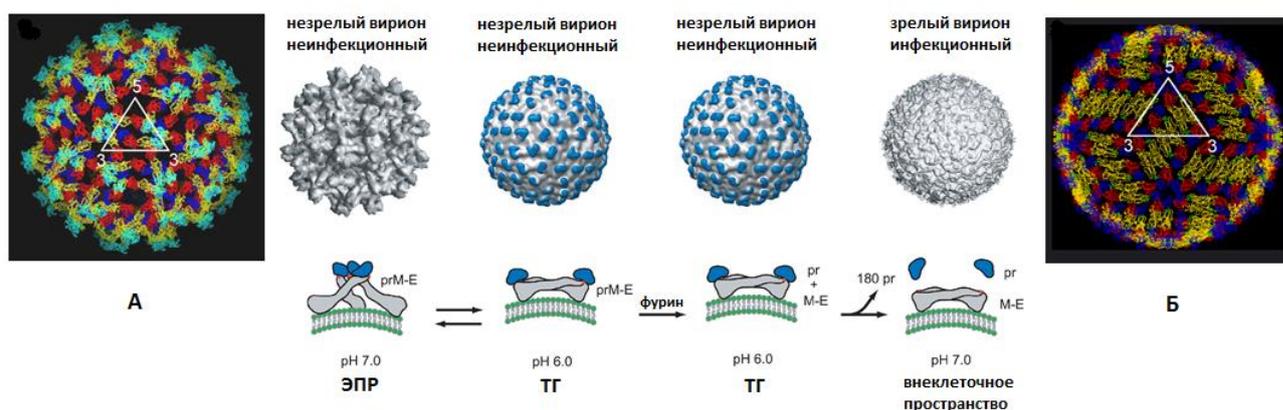
## 2.4. Укладка sE

### 2.4.1. Укладка sE в незрелом вирионе

Вирусные частицы, находящиеся в ЭПР, называют “незрелыми” из-за неспособности сливаться с липидными мембранами вследствие присутствия предшественника мембранного белка рgM, который должен быть протеолитически расщеплен в процессе созревания вириона [78]. Незрелый вирион имеет диаметр около 60 нм. Белки E и рgM образуют 180 гетеродимеров, собранных в 60 тримерных шипиков (рис. 9). С помощью криоэлектронной микроскопии были получены данные о структуре незрелых вирионов ДНГВ-1, ДНГВ-2, ВЛЗН

и ВЖЛ [42, 80, 82-84].

Три белка E в каждом шипике наклонены таким образом, что угол между поверхностью вириона и осью белка E составляет  $\sim 25^\circ$ . Как следствие, пептид слияния максимально удален от поверхности вириона, тогда как домен III находится в непосредственной близости к ней [85]. Были получены рентгеноструктурные данные о строении комплекса prM-E [42], далее с помощью КЭМ было показано, что белок prM образует структуру, которая защищает пептид слияния и предотвращает преждевременное слияние мембран незрелого вириона и клетки (рис. 9) [80].



**Рисунок 9.** Схема созревания вириона (адаптировано из [86]). Соответствующие разным стадиям жизни вируса структуры ДНГВ-2 получены с помощью КЭМ. **А)** совмещение координат атомов Ca, полученных методом РСА, с картами электронной плотности для незрелой и **Б)** зрелой вирусной частицы [85].

При попадании частицы с шиповидной конформацией поверхностных белков в кислую среду комплекса Гольджи происходят значительные изменения гликопротеиновой решетки, выражающиеся в переходе от шиповидной к гладкой морфологии, при которой димеры белков E плотно уложены на поверхности вириона. Этот процесс обратим и становится необратимым только после фурин-опосредованного расщепления белка prM на pr и M (созревания), которое происходит в *транс*-АГ [42, 85, 87]. Фуриновое расщепление происходит только в кислой среде, где, вероятно, конформационные изменения белка prM делают доступным сайт взаимодействия с фурином. Фрагмент pr остается связанным с вирионом и отщепляется от него только при переходе в нейтральную среду [88]. Таким образом, созревание и переход вириона в среду с нейтральным значением pH не сопровождается дальнейшей перестройкой структур белков E, но требует отщепления пептида pr [85].

На примере ДНГВ было показано, что вирионы флавивирусов покидают клетку, будучи гетерогенными по степени зрелости, то есть различающимися по количеству расщепленных белков prM [89]. Поверхность таких частично зрелых вирионов представляет собой мозаику из регионов с шипообразной укладкой, характерной для незрелых частиц, и регионов с

гладкой паркетной (“herringbone”) укладкой, соответствующих зрелым вирионам [90]. Более 90% вирионов ДНГВ содержат хоть некоторое количество нерасщепленных ргМ [91]. Благодаря совершенно разной ориентации белков Е в этих регионах такие частично зрелые частицы могут обладать уникальными поверхностями взаимодействия с клеточными факторами и рецепторами. Частично зрелые вирионы также в основном более чувствительны к нейтрализации антителами, поскольку более плотная упаковка белков поверхности затрудняет доступ к различным эпитопам [92-96].

Инфицированными клетками также могут производиться неинфекционные *субвирусные частицы* (СВЧ) со средним диаметром 30 нм, хотя встречаются и частицы размером 50 нм. СВЧ содержат липидную мембрану, белки Е и ргМ, но РНК и белок С у них отсутствуют. СВЧ подвергаются такому же процессу созревания, что и целые вирионы, и способны сливаться с клеточными мембранами [97, 98]. *Рекомбинантные субвирусные частицы* (РСЧ) образуются в клетках, экспериментально трансфицированных только генами ргМ и Е, что указывает на достаточность этих белков для сборки частицы [99]. КЭМ и реконструкция изображений РСЧ ВКЭ указывает на иной способ укладки белков Е на поверхности частицы по сравнению с вирионами – 30 димеров Е образуют икосаэдрическую, а не паркетную упаковку [98].

#### 2.4.2. Укладка sE в зрелом вирионе

Данные КЭМ и реконструкции изображений зрелых ДНГВ, ВЖЛ и ВЛЗН свидетельствуют о паркетной укладке белков Е на поверхности зрелого вириона [67, 77, 80] [81, 84, 100, 101]. Он имеет относительно гладкую поверхность (диаметр частицы ~ 50 нм, нуклеокапсида – около 30 нм), липидный бислой мембраны полностью покрыт оболочкой из белков Е и М. 180 эктодоменов белка Е образуют 30 “плотов” (“protein rafts”) (рис. 9), каждый из которых состоит из 3 антипараллельных гомодимеров, собранных голова-к-хвосту (рис. 4Б). Белковые димеры формируют паркетную упаковку. Основные взаимодействия в димерах происходят в области соприкосновения доменов II (хотя для ВЯЭ показана важность и междимерных взаимодействий [71]). Сравнение конформаций белка Е в зрелом и незрелом состоянии показывает, что в основе способности белка Е принимать соответствующие конформации лежит гибкость региона, связывающего I и II домены.

#### 2.4.3. Динамический характер структуры вириона флавивирусов

Хотя КЭМ и предоставляет ценные данные о статических состояниях структур флавивирусов, динамическая структура вирионов довольно сложна и к настоящему моменту плохо изучена. Способность некоторых моноклональных антител эффективно связываться с вирионами при одних температурах и этого отсутствие взаимодействия при других

свидетельствуют о зависимости конформации вирионов от температуры. Флавивирусы, вероятно, существуют как ансамбль вирионов с различными конформациями белков оболочки; предполагается, что динамика структур флавивирусов заметно влияет на их распознавание антителами: при определенных температурах могут приниматься конформации, предоставляющие доступ к эпитопам, скрытым в других условиях [102, 103]. Зависимость эффективности нейтрализации от времени и температуры показана для всех известных на сегодняшний момент моноклональных антител к белкам Е флавивирусов [94, 104].

Дальнейшие исследования с помощью криоэлектронной томографии показали, что изменение температуры от 32 °С (соответствует условиям существования вируса в комарах) до 36–37 °С приводит к образованию более рыхлых, удлиненных структур, у которых липидная мембрана становится более открытой [105, 106]. Таким образом, структуры вирионов в организмах разных хозяев различаются.

## ГЛАВА 3. СЛИЯНИЕ

### 3.1. Классы белков слияния

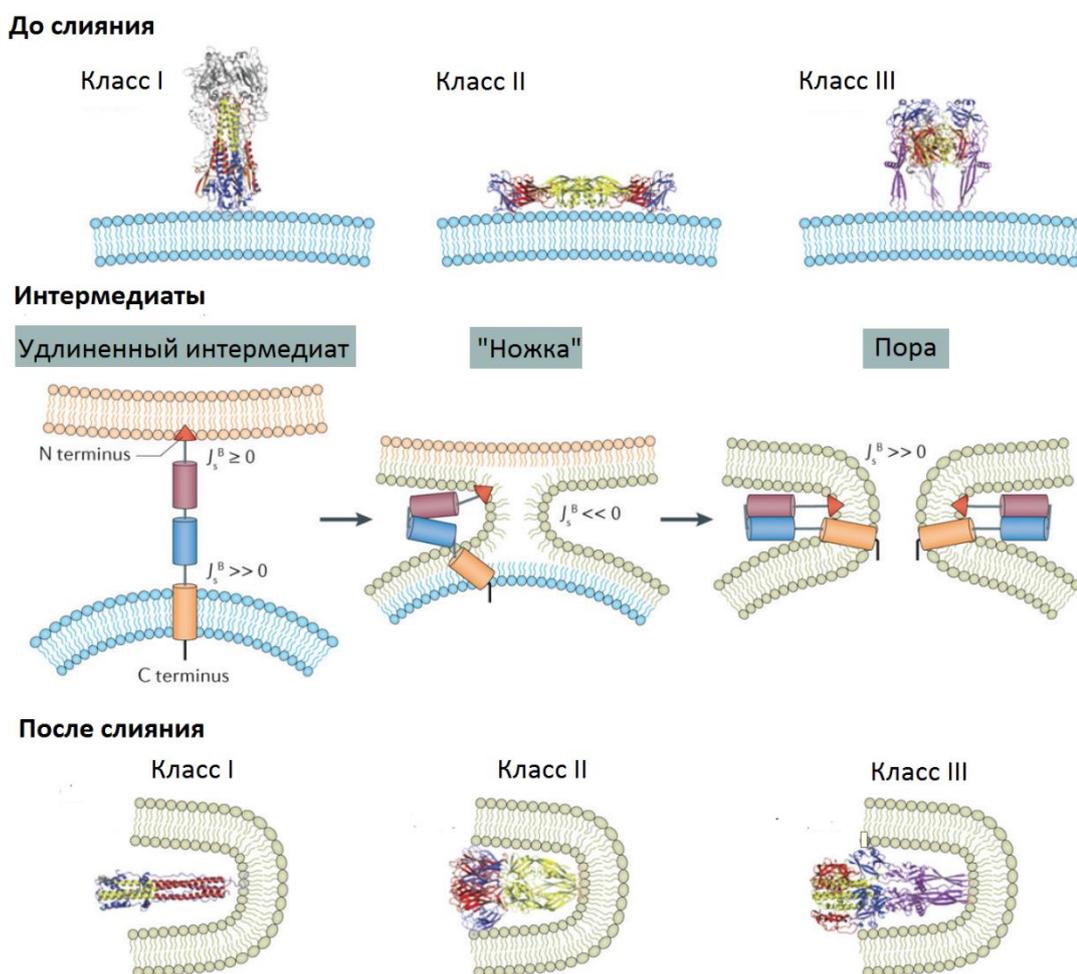
У вирусов с более чем одним белком оболочки белки, ответственные за связывание с рецептором, так же разнообразны, как и их рецепторы. В противоположность этому известные на данный момент белки, которые участвуют в слиянии вирусной и клеточной мембран, могут принадлежать лишь к одному из четырех структурно различных классов вирусных белков слияния (табл. 2) [107].

**Таблица 2.** Характеристика различных классов белков слияния [107].

Класс	Представители	Особенности структуры белков слияния	Триггеры слияния
I	Семейства: ортомиксовирусы, парамиксовирусы, ретровирусы, филовирусы, коронавирусы	Ядро, образованное пучком из трех $\alpha$ -спиралей, трансформируется в 6-спиральный пучок после слияния. N-Концевой пептид слияния образуется в результате протеолитического расщепления.	Изменение pH и/или связывание с рецептором, воздействие протеазы.
II	Рода: флавивирусы, альфавирусы, вирус краснухи (единственный представитель рода <i>Rubivirus</i> ), вирус лихорадки долины Рифт (род Флебовирус)	Трехдоменная организация преимущественно из $\beta$ -листов с плотно упакованной петлей слияния, служащей «якорем», который подтягивает клеточную мембрану при слиянии	Изменение pH
III	Семейства: герпесвирусы, рабдовирусы, бакуловирусы	Ядро из $\alpha$ -спиралей, как у белков класса I, с центральным доменом, состоящим из $\beta$ -листов, несущим один или несколько петель слияния, как у белков класса II.	Изменение pH
IV	Вирус диареи свиней, вирус гепатита С	?	?

Структуры белков классов II и III очень похожи, это, вероятнее всего, является результатом конвергентной эволюции, так как фолдинг и связность доменов слияния этих белков значительно различаются [108].

Изученные в 2013 году структуры белков E2 вируса диареи свиней и вируса гепатита С свидетельствуют о том, что эти белки слияния имеют отличную от ранее описанных трех классов четвертичную структуру [109-111]. Стоит отметить, что ВДС и ВГС относятся к родам *Pestivirus* и *Hepacivirus* одного семейства *Flaviviridae*, представителем которого также является род *Flavivirus* с типичными белками слияния класса II. Детали механизма этого потенциально нового класса белков слияния остаются неописанными, как и структура связанного с ним дисульфидной связью белка E1, который, как предполагается, также является непосредственным участником процесса.



**Рисунок 10.** Структуры белков различных классов слияния до, во время и после слияния. Ввиду отсутствия данных рентгеноструктурного анализа о структурах интермедиатов, они представлены схематически в виде мономеров (в слиянии, тем не менее, принимают участие тримеры). Адаптировано из [107]

Несмотря на все различия между классами белков слияния, и даже несмотря на то, что их переходные конформации не удастся наблюдать напрямую, все вирусные белки слияния, вероятнее всего, обеспечивают слияние мембран путем сходной последовательности

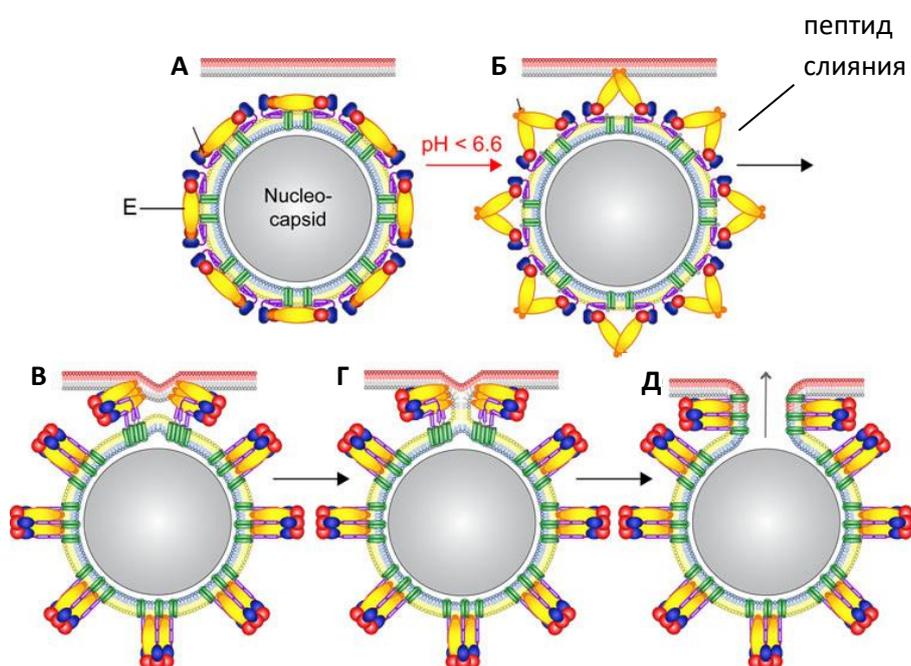
конформационных изменений (рис. 10) [107]. Все они до слияния находятся в метастабильном состоянии (в случае флавивирусов – собраны в димеры). Взаимодействие с рецептором или изменение рН приводят к их дестабилизации, что вызывает высвобождение и последующее «внедрение» пептида слияния (класс I) или петли слияния (классы II и III) в клеточную мембрану с образованием удлиненного интермедиата. Через эту структуру происходит образование комплементарных, но нестабильных  $\alpha$ -спиральных или  $\beta$ -листовых доменов, которые реорганизуются и/или олигомеризуются с образованием более энергетически выгодной структуры (белки E флавивирусов перегруппировываются в шипообразные тримеры). Структуры удлиненных интермедиатов были изучены с помощью КЭМ низкого разрешения лишь для вируса саркомы птиц и парамиксовирусов [112, 113]. Каскад конформационных перестроек белков оболочки обеспечивает объединение внешних слоев липидных мембран вируса и клетки (hemifusion) с образованием т.н. «ножки» (stalk) и последующее слияние внутренних липидных слоев с образованием поры [108, 114].

В то время, как мембрана эндосомы практически не изогнута или даже имеет отрицательную кривизну в процессе слияния (спонтанная кривизна бислоя  $J_s^B \leq 0$ ), вирусная мембрана имеет высокую положительную кривизну ( $J_s^B \gg 0$ ). Переход от  $J_s^B \gg 0$  к  $J_s^B \ll 0$  в процессе слияния обеспечивается сбалансированным составом вирусной липидной мембраны. Ее оптимальная текучесть вместе с текучестью клеточной мембраны также важна в процессе смещения липидных слоев [115]. Хотя слияние двух мембран является энергетически выгодным процессом, необходима высокая энергия активации для преодоления электростатического отталкивания между полярными группами фосфолипидов [116, 117]. Этот энергетический барьер преодолевается с помощью энергии конформационных перестроек белков слияния, закоренных в вирусных мембранах [115].

### **3.2. Перестройки белка E флавивирусов при слиянии**

С помощью КЭМ было показано, что в условиях низкого рН объем вирионов ДНГВ увеличивается: объем нуклеокапсида, покрытого липидной мембраной, не изменяется, но между ним и белковой оболочкой возникает зазор  $\sim 60$  Å. По всей вероятности, это происходит за счет выстраивания стебелька перпендикулярно поверхности мембраны [118]. Методом динамического светорассеяния было показано увеличение радиуса вирионов вируса Канжин ВЛЗН. Предполагается, что это происходит за счет диссоциации части димеров и последующего отворачивания второго домена мономеров E от поверхности вириона за счет изменения конформации петель между DI и DII. При этом петли слияния, ранее находившиеся в полости между I и III доменом гомодимера, высвобождаются, хотя и сохраняют структуру, сходную с той, что представлена в димере. Ароматические остатки (Trp101 и Phe108 sE ВКЭ)

оказываются открытыми и могут взаимодействовать с алифатическими группами липидного бислоя эндосомальной мембраны [76]. Присутствие мембраны хозяина, вероятно, заставляет мономеры организовываться в «открытые» тримеры, петли слияния которых удалены друг от друга (рис. 11) [119, 120]. Постепенно происходит переход в конечный шипообразный тример: фрагмент белка E, несущий спираль E-H1 (401-413 а.к.), перемещается в гидрофобную ложбинку на поверхности тримера между доменами II, под Arg401 (рис. 9Б), где контактирует с  $\alpha A$ - и  $\alpha B$ -спиралями домена II, создавая кластер из девяти  $\alpha$ -спиралей. По достижении конечной тримерной конформации белок E подтягивает закоренный в вирусной мембране сегмент E-H к петлям пептида слияния, встроенным в клеточную мембрану, что служит движущей силой слияния мембран (рис. 12) [121].

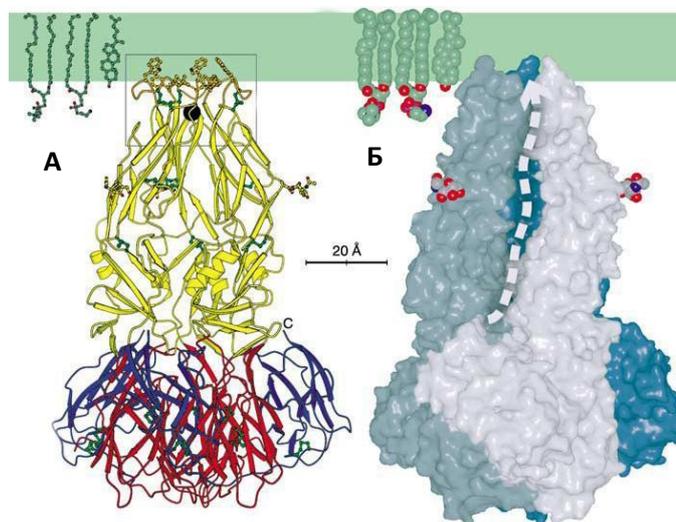


**Рисунок 11.** Схематическое представление стадий процесса слияния мембран клетки и флавивируса. **А)** Неспособные к слиянию димеры белка E на поверхности вириона. **Б)** Диссоциация димеров E в кислой среде ( $pH \sim 6,6$ ) приводит к экспонированию пептида слияния и взаимодействию его с мембраной клетки. **В)** Образование тримера, изменение положения III домена, подтягивание стебелька. **Г)** Сближение мембран, слияние только внешних липидных слоев. **Д)** Образование конечного тримера белка E, открытие поры. Оранжевым обозначен пептид слияния. Внешний липидный слой вирусной и клеточной мембран - желтый и черный, соответственно, внутренний – синий и красный (адаптировано из [120]).

В процессе тримеризации субъединиц домен III упаковывается между двумя субъединицами sE, контактируя с обоими первыми доменами и поверхностями между доменами I и II (рис. 11В), что придает стабильность тримерной форме. В тримерной форме  $\beta$ -тяжи IgC-подобной структуры домена III лежат строго параллельно тягам домена I, тогда как при нейтральном pH они почти ортогональны (рис. 7).

В результате изменения конформации в кислой среде нарушаются нековалентные взаимодействия доменов I и III, включавшие в себя ван-дер-ваальсовы взаимодействия,

солевые мостики и водородные связи. При этом протонирование остатков гистидина считается самым важным фактором в дестабилизации поверхности при понижении рН, так как перестройка происходит при рН ~ 6,6, что соответствует рК<sub>а</sub> имидазольной группы гистидина [122-124].



**Рисунок 12.** Гомотример белка E [120]. Схематически изображен внешний липидный слой клеточной мембраны (зеленый). **А)** Ароматические остатки пептида слияния (выделены оранжевым цветом) взаимодействуют с неполярными группами внешней липидной оболочки клетки. **Б)** Пунктирной стрелкой обозначена траектория движения стебелька

### 3.3. Условия слияния флавивирусов

Изучение кинетики слияния СВЧ ВЛЗН показало, что диссоциация димеров – быстрый и обратимый процесс. Лимитирующей является стадия тримеризации, скорость которой зависит от концентрации на поверхности активированных (т.е. направленных от поверхности) мономеров в контактной зоне между вирусной частицей и мембраной. Скорость слияния внешних липидных слоев зависит от числа соседних тримеров. Для вируса Канжин ВЛЗН минимальное число необходимых тримеров – 2 [125].

Слияние флавивирусов может протекать в кислой среде при максимальном значении рН ~ 6,6, т.е. слияние может происходить уже в ранних эндосомах [64]. Эти данные были получены для ДНГВ [126], ВЯЭ, вируса Сэнт-Луиса [127], ВЛЗН [52], вируса долины Мюррей [128] и ВКЭ [129] путем исследования слияния клеток под действием вирусных частиц или изучения слияния вирусов с липосомами. Данные о кинетике этого процесса также были получены для ВКЭ на модели слияния вирионов ВКЭ, меченных пиреном, и липосом [130]:

1) Для слияния не требуется присутствие белковых или углеводных рецепторов, что свидетельствует об отсутствии необходимости взаимодействия с рецептором для инициации слияния.

2) При низком рН среды в отсутствие липидной мембраны вирионы теряют

способность к слиянию и инфекционные свойства в результате необратимой перестройки белков Е в тримеры.

3) Слияние эффективно протекает в широком диапазоне рН, при оптимальных значениях 5,3 – 5,5 и пороговом значении 6,8.

4) Слияние протекает эффективно и начинается без задержек при температурах 15 – 37°C. Задержка порядка 2 с и значительное снижение начальной скорости и полноты слияния (~50%) наблюдались при 4 °С.

5) Процесс слияния чрезвычайно быстрый и эффективный. За первые 2 с сливается более 50% вирионов, всего сливаются ~70% вирионов.

В работах [130] и [131] было установлено, что наличие холестерина в мембранах липосом способно увеличивать эффективность слияния ВКЭ и ВЗЛН, хотя и не является обязательным требованием (в отличие от альфавирусов). Для ВКЭ было показано, что холестерин ускоряет ранние стадии слияния – адсорбцию на мембране и структурные преобразования белков Е. Важными в этом процессе являются 3β-гидроксильные группы молекул холестерина, хотя с ними и не наблюдается прямого взаимодействия [132]. Предполагается, что такая зависимость наблюдается из-за общего изменения гибкости и текучести мембран, в состав которых входит холестерин [133]. Вирионы ДНГВ также способны сливаться с искусственными мембранами, содержащими холестерин, а эффективность этого процесса в клетках без холестерина ощутимо снижается [134, 135].

На условия и эффективность слияния также оказывает влияние аминокислотный состав белков Е. В частности, некоторые мутации в области петель, соединяющих первый и второй домен, способны сдвигать интервалы оптимальных значений рН слияния у ДНГВ-2 (см раздел 3.6) [136, 137].

### **3.4. Методы исследования слияния**

Удобным модельным объектом для изучения слияния и влияния на него низкомолекулярных и пептидных соединений являются липосомы. Они лучше подходят для разнообразных испытаний, чем, к примеру, липидные пленки или мицеллы, так как содержат липидный бислой и точнее соответствуют изгибу поверхности клеточной мембраны [138]. Для изучения флавивирусов обычно используют липосомы, содержащие фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин и холестерин в молярном соотношении 1:1:1,5, также может присутствовать сфингомиелин. Так как в липосомах отсутствуют рецепторы, можно делать вывод о влиянии исследуемых веществ именно на стадию слияния, а не взаимодействия с клеточными рецепторами. В литературе встречается несколько подходов к изучению процесса слияния: кофлотация белков оболочки Е или целых вирионов с липосомами,

микроскопический анализ слияния флуоресцентно меченных вирионов и липосом, слияние с трипсин-содержащими липосомами.

Наиболее часто встречается описание применения меченных пиреном вирионов. Примечательным свойством пиренового флуорофора является эксимерная флуоресценция, возникающая, если две молекулы пирена расположены на небольшом расстоянии в параллельных плоскостях друг напротив друга (стопкой). При слиянии вирусной мембраны, содержащей меченные пиреном фосфолипиды, с липосомальной происходит диссоциация пиреновых эксимеров и, соответственно, наблюдается снижение интенсивности флуоресценции. В исследовании процесса слияния, подбирая разные флуоресцентные метки, также можно использовать такие явления, как тушение флуоресценции и ферстеровский резонансный перенос энергии (FRET) [139].

Слияние с трипсин-содержащими липосомами описано в [140]: вирусную суспензию смешивают с липосомами, содержащими трипсин, и закисляют. Слияние оболочки вируса и липосомы позволяет вирусному белку капсида С попасть внутрь липосомы, где он подвергается ферментативному расщеплению трипсином. Если же в системе присутствовал ингибитор слияния, определение белка С методом Вестерн-блотт выявляет полноразмерный белок С.

Метод кофлотации с липосомами описан в [141]. Вирионы или белки sE смешивают с липосомами, подкисляют для того, чтобы вирионы провзаимодействовали с липидной мембраной, и доводят рН до нейтрального. При центрифугировании в градиенте сахарозы происходит разделение фракций в соответствии с их плотностями. Фракции собирают по отдельности и в каждой определяют количество белка Е или РНК. Если произошло слияние белков Е или вирионов с липосомами, то они, соответственно, окажутся в одной фракции. Хотя этот метод не применялся для анализа механизма действия ингибиторов слияния флавивирусов, он может быть легко модифицирован для этой цели.

В работах [140] и [142] ингибирование процесса слияния низкомолекулярными соединениями проверялось с помощью флуоресцентной микроскопии так называемого «слияния изнутри» (fusion from within). В работе [127] было показано, что плазматические мембраны инфицированных вирусом денге клеток комаров могут сливаться в кислой среде, что вызывает образование синцития, клеточного агрегата, содержащего несколько ядер. В нейтральной среде или в присутствии антител к петле слияния образования синцития не происходит. Эти данные позволяют сделать заключение, что слияние мембран происходит в кислой среде под действием экспрессированных на поверхности клеток белков оболочки Е. Иммунофлуоресцентное окрашивание позволяет визуализировать эти белки, находящиеся на

поверхности зараженных клеток. Нарушение целостности клеточных мембран позволяет флуоресцентным красителям, к примеру, иодиду пропидия, не способному проникать через клеточные мембраны, окрашивать синцитий. В случае же присутствия ингибиторов слияния в среде с низким рН образование синцития не должно наблюдаться.

Эксперименты, в которых изменяется порядок инфицирования и добавления исследуемых соединений к клеткам, не позволяют установить точного механизма действия, но широко используются, потому что позволяют выяснить, действует ли соединение на ранних стадиях проникновения вируса в клетку или же влияет на репликацию. Эти эксперименты просты и удобны в исполнении.

### **3.5. Сенсоры кислотности среды и инициация слияния**

Белки оболочки являются своеобразными сенсорами рН среды, реагирующими на его понижение до рН ~5 при созревании эндосомы. Необходимые структурные перестройки происходят, по-видимому, из-за протонирования боковых групп аминокислотных остатков и возникающего в его результате электростатического отталкивания. Конечно, другие внутримолекулярные взаимодействия, такие как водородные связи, солевые мостики и гидрофобные взаимодействия, могут играть роль в конформационных перестройках, но они, в отличие от электростатического отталкивания, не могут приводить к дестабилизации структуры.

Вблизи указанного значения рН протонироваться могут только остатки гистидина: значение  $pK_a$  его боковой цепи в свободной форме равно 6,5, хотя оно может варьироваться в зависимости от аминокислотного окружения остатка в структуре белка. При протонировании имидазольное кольцо гистидина приобретает положительный заряд, что может приводить к отталкиванию от находящихся поблизости других положительно заряженных остатков (Lys, Arg, His) и дестабилизации димеров. Обычно остатки в таких гистидин-катионных кластерах находятся на расстоянии не более 7 Å [143]. Такие кластеры часто обнаруживаются на поверхностях между доменами или субъединицами, которые претерпевают сильные пространственные перестройки в процессе слияния [144]. К настоящему моменту собраны многочисленные свидетельства критической роли остатков гистидина в процессе структурных перестроек белков оболочек различных вирусов, проникающих в клетку посредством эндоцитоза (концепция гистидинового переключателя) [144-153].

Авторы [143] отмечают, что электростатическое отталкивание также может существовать и между отрицательно заряженными остатками аспарагиновой и глутаминовой кислоты, обычно находящимися на расстоянии от 4 до 2,5 Å. Asp и Glu имеют значение  $pK_a$  3,9 и 4,2, соответственно, но часто это значение увеличивается из-за эффекта соседей [154]. В

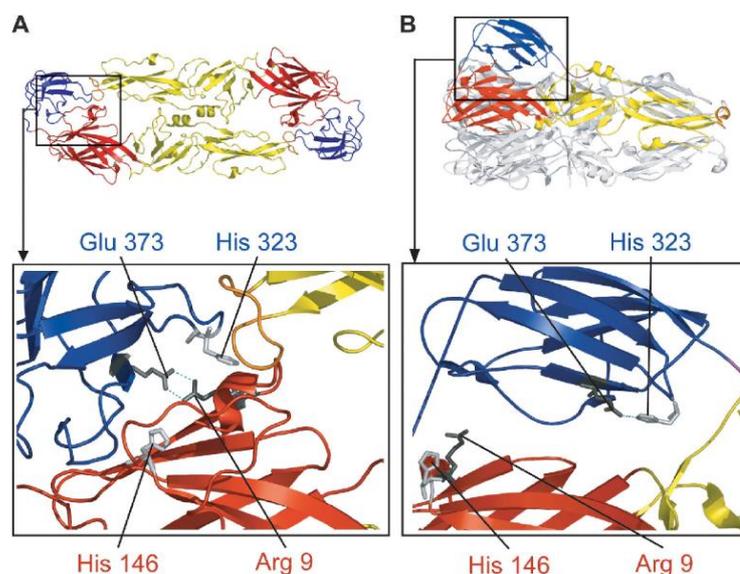
нейтральной среде эти остатки заряжены отрицательно, а при закислении они протонируются с образованием сопряженных кислот. Близость двух анионных боковых цепей в конформации белка после слияния не благоприятствует образованию такой пары при нейтральном pH. Тем не менее, с понижением pH отталкивание ослабевает, тем самым увеличивая стабильность тримерной формы белка. Также подобные кластеры могут регулировать время коллапса удлиненного интермедиата [143]. Гипотеза о роли анионных кластеров в конформационных перестройках вирусных белков оболочки при слиянии была предложена сравнительно недавно [149, 155, 156] и требует дальнейшего изучения.

### **3.6. Влияние остатков гистидина на слияние флавивирусов**

Пять остатков гистидина в белках E консервативны среди всех флавивирусов. Вследствие того, что слияние происходит при pH ~ 6,6, вполне вероятно, что эти остатки играют роль сенсоров кислотности среды и их протонирование играет роль спускового механизма процесса слияния. Два консервативных остатка гистидина расположены в пространстве между DI и DIII (His146 и His323 у ВКЭ), один - между DI и DII (His287 участвует в образовании тримерного интерфейса), один в DII (His248 в тримере располагается в канавке поблизости с петлей слияния) и один в регионе стебелька E-N3 (His438).

His323 и His146 являются частью сети контактов, состоящей из водородных связей, ван-дер-ваальсовых взаимодействий и солевого мостика (вместе с Arg9 и Glu373) между DI и DIII sE в димерной форме (рис. 13). Взаимодействие этих двух доменов чрезвычайно важно для стабилизации димерной формы, так как именно при такой специфической организации два домена образуют защитный карман для петли слияния, находящейся на соседней субъединице, и удерживаются в антипараллельной ориентации. Изучение мутантных инфекционных частиц и рекомбинантных субвирусных частиц ВЯЭ показало, что солевой мостик между Arg9 и Glu373 критически важен для вирусной репродукции: замена Arg9Ala нарушает процесс сборки вирионов, упакованные частицы с мутациями Glu373Ala и в петле *kl* не могут выходить в секреторные клеточные пути [157]. Как и несколько других остатков, расположенных в месте контакта доменов I и III, Arg9 и Glu373 абсолютно консервативны у флавивирусов.

Устранение связывающих DI и DIII контактов необходимо для высвобождения петли слияния и расхождения мономеров. Так как в димерной конформации His323 и His146 являются частью центрального солевого мостика между Arg9 и Glu373, их протонирование вносит вклад в диссоциацию этого мостика и последующую дестабилизацию интерфейса между DI и DIII.



**Рисунок 13.** Взаимодействия между His323, His146, Arg9 и Glu373 **А)** до слияния и **Б)** после слияния.

В состоянии после слияния His146 способен образовывать новую водородную связь и солевой мостик с консервативным Asp42 из DI [76]. His323 в свою очередь взаимодействует с Glu373, стабилизируя межмономерные контакты, обеспечиваемые ДПП, и/или обеспечивая правильное позиционирование стебелька при его «застегивании». То, что базовая конструкция этой сети в конформациях Е до и после слияния консервативна для ВКЭ и лишь отдаленно родственного ДНГВ-2, говорит в пользу схожего механизма инициации слияния для всех флавивирусов. Отсутствие этих взаимодействий может быть связано с потерей стабильности тримеров при замене His323 на Ala при изучении РСЧ ВКЭ. Примечательно, что одиночные мутации других консервативных гистидинов (кроме His146, при замене которого на любую другую аминокислоту не осуществляется сборка и/или секреция СВЧ) не влияют заметно ни на образование тримеров, ни на их стабильность.

При замене His323Ala лишь незначительное количество РСЧ сливалось с липосомами, также при низком рН значительно уменьшалось количество экспонированных петель слияния, что, вероятно, говорит о значении His323 в инициации процесса слияния. Аналогично, замены His319Ala и His144Ala ВЯЭ приводили к значительному снижению образования синцития в эксперименте «слияние изнутри» [157].

В опытах с РСЧ ВКЭ влияние, схожее с заменой His323Ala, на степень протекания слияния оказала двойная замена His248Asn + His287Ala, однако, хотя слияние было практически подавлено, эти мутантные частицы взаимодействовали с поверхностью липосом. Также замены His323Ala и His248Asn + His287Ala снижают количество образующихся при низком рН тримеров и их стабильность. Двойная замена не влияла на количество экспонированных петель слияния, из чего можно сделать вывод, что только His323 участвует именно в запуске слияния, хотя двойственность его роли заключается также в стабилизации

тримера путем образования стабилизирующей связи и/или участия в правильном «застегивании» стебелька. В свою очередь His248 и His287 играют роль на более поздних стадиях слияния. Также замены His323Ala и His248Asn + His287Ala снижают количество образующихся при кислом pH тримеров и их стабильность [141].

В исследовании [158] было показано, что His244 белка E ДНГВ-1 важен для взаимодействия с пептидом rg: замена His244Ala предотвращала связывание DI/II E с rg, однако не влияла на их связывание с липосомами в присутствии DIII при низком pH. Белки E с мутацией His244Ala, по-видимому, правильно упакованы и собираются в субвирусные частицы ДНГВ-1 в ЭПР, которые транспортируются в *транс*-АГ, но их выход в межклеточное пространство значительно снижен, что, вероятно, обусловлено недостаточной защитой частиц белком rg от преждевременного слияния в кислых условиях *транс*-АГ. Аналогично, замена His244Ala ДНГВ-2 снижала продукцию вирусных частиц [159]. Гистидин в этой позиции крайне желателен, но не является абсолютно необходимым, о чем говорят следующие факты: замена His248Ala/He E ВКЭ блокирует секрецию вирусоподобных частиц, хотя такого эффекта и не наблюдается при замене His248Asn [141]. Замены His246Ala/Gln и многие другие в этой позиции ингибируют выход репортерных вирусных частиц (в геном которых дополнительно введен ген зеленого флуоресцирующего белка) ВЛЗН из клеток, но замена на ароматические остатки, к примеру, фенилаланин, не влияет на выход и инфекционность частиц [160].

По результатам исследования [160], авторы утверждают, что протонирование индивидуальных остатков гистидина не требуется для инициирования процесса слияния. Такой вывод был сделан на основе измерения количества  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , необходимого для снижения степени протекания слияния репортерных вирусных частиц ВЛЗН с мутациями индивидуальных остатков гистидина на 50%. Разногласия с предыдущими исследованиями авторы объясняют возможными различными требованиями к условиям слияния, возникающими из-за различия в геометрии репортерных и рекомбинантных вирусоподобных частиц.

#### ГЛАВА 4. ИНГИБИТОРЫ РЕПРОДУКЦИИ ВКЭ

Мишенями антифлавивирусных препаратов могут быть как любые вирусные белки, так и биомолекулы, связанные с нормальным жизненным циклом клетки. Ввиду того, что клеточные белки обычно выполняют множество функций, разработка ингибиторов, действующих на клеточные мишени, представляется более трудоемкой: вещества должны угнетать только функцию, вовлеченную в репликацию вируса, не затрагивая нормального функционирования клеток организма. С другой стороны, лекарства, действующие на клеточные мишени, с меньшей вероятностью будут вызывать устойчивость к препарату, чем

действующие на определенные сайты белков легко мутирующего вируса.

#### **4.1. Биотехнологические препараты**

К настоящему моменту не существует препаратов для лечения КЭ. Специфический к ВКЭ сывороточный иммуноглобулин, ранее применявшийся для лечения или экстренной профилактики КЭ, сейчас не используется в Европе. Специфический сывороточный иммуноглобулин (ИГ производят из плазмы крови доноров, живущих в эндемичных регионах КЭ и используется для экстренной профилактики и лечения КЭ после присасывания клеща в России и Казахстане [20, 161]. Санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.1.3.2352-08 «Профилактика клещевого вирусного энцефалита» для экстренной профилактики КЭ рекомендован препарат – иммуноглобулин с титром антигемагглютининов к вирусу КЭ не менее 1:80. Специфический к ВКЭ ИГ демонстрирует хороший терапевтический эффект [162], но имеет ряд побочных действий: 1) использование донорской крови несет потенциальную возможность передачи инфекций; 2) необходимость использовать большие дозы препарата приводит к дополнительным рискам для пациентов с сердечной или почечной недостаточностью; 3) роль специфического ИГ в формировании хронической инфекции не изучена; 4) не изучена его эффективность при многократном применении; 5) высокая стоимость. Кроме того, проявляется нехватка таких препаратов во время эпидемических сезонов, связанных с ограниченным количеством доступной донорской крови [163].

Помимо специфического к ВКЭ ИГ в случае тяжелых инфекций предлагалось внутривенное введение больших доз неспецифических человеческих иммуноглобулинов, которые получают от доноров, проживающих на территории эндемичных по КЭ стран – Германии и Чехии, в результате чего они должны содержать примесь специфического к ВКЭ ИГ с неизвестным титром, однако такой тип терапии детально не изучался [164].

Логическим развитием идеи применения специфических ИГ является разработка гуманизированных моноклональных антител, содержащих высокоспецифичные к ВКЭ тяжелую цепь мышинового иммуноглобулина и легкую цепь ИГ человека. Такой подход снимает сразу несколько проблем. Препараты производятся в линии клеток, а не извлекаются из сывороток крови; состав антител постоянный, что облегчает их стандартизацию и дозирование; тяжелая цепь подобрана таким образом, чтобы обеспечивать оптимальное связывание с вирионом. Разработанные в России рекомбинантные гуманизированные антитела к ВКЭ оказались безопасными и способны защищать 100% мышей при введении доз 10 и 80 мкг/особь через сутки после инфицирования ВКЭ [165].

Менее обнадеживающие результаты были получены при изучении активности препаратов интерферонов (IFN). Интерфероны вовлечены в формирование иммунного ответа

на инфекции. Препараты IFN комбинации с рибавирином применяются для лечения гепатита С [166].

Активность препаратов интерферона была показана *in vitro* против многих флавивирусов [167], в том числе ПОВ [168]. Однако в экспериментах на животных были получены противоречивые результаты: IFN- $\alpha$ 2b проявил активность против ВКЭ *in vitro*, но не защищал мышей [169]. Воздействие IFN- $\alpha/\beta$  на нейрональные клетки, зараженные ВЛЗН, повышало их выживаемость [170].

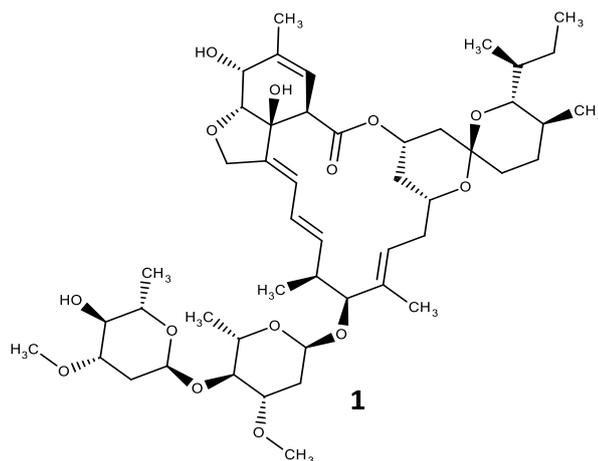
Профилактическое введение человеческого рекомбинантного IFN  $\alpha$  мышам увеличивало их выживаемость при последующем заражении вирусом энцефалита Сент-Луис [171]. Препараты IFN- $\alpha$  и пегилированного IFN при различных схемах применения повышали выживаемость иммунодефицитных мышей и снижали вирусную нагрузку при заражении вирусом Модок [172].

В клинических испытаниях применение IFN- $\alpha$ 2а для лечения ВЯЭ у детей не оказалось эффективным [173]. Проведившиеся в РФ испытания препаратов IFN для лечения КЭ содержат методологические ошибки и не позволяют сделать достоверные выводы об эффективности и безопасности исследованных препаратов [162].

#### **4.2. Низкомолекулярные соединения**

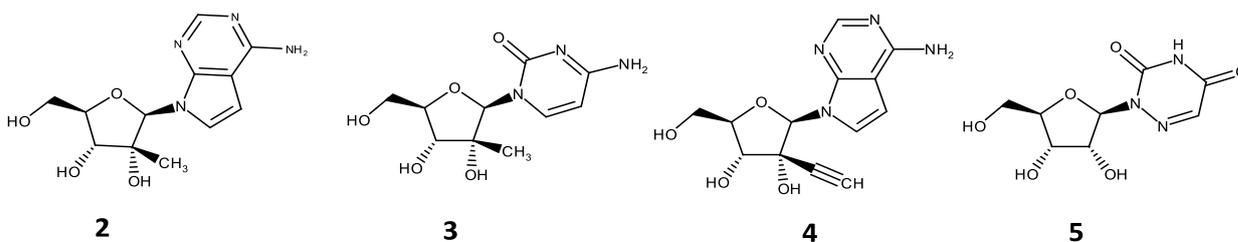
В настоящий момент не существует низкомолекулярных соединений – ингибиторов репродукции ВКЭ, эффективность которых была бы подтверждена в рандомизированных двойных слепых плацебоконтролируемых клинических испытаниях. Однако ведутся исследования по разработке таких препаратов.

Ивермектин **1**, найденный путем докинга в сайт связывания одноцепочечной РНК геликазы ВЛЗН, способен подавлять расплетание двухцепочечной вирусной РНК геликазами ВЛЗН, ВЖЛ и ДНГВ в субмикромольных концентрациях, однако не влияет на активность АТФ-азы NS3 [174]. Также было показано, что ивермектин ингибирует активность протеазы ДНГВ [175]. В клеточной культуре ивермектин способен ингибировать репродукцию флавивирусов ВЖЛ, ДНГВ, ВЯЭ, ВЛЗН, и в том числе ВКЭ с  $EC_{50} \sim 0,2$  мкМ при  $CC_{50} \sim 10$  мкМ [174]. Ивермектин – широко применяемое антигельминтное средство, однако его активность против флавивирусов еще не исследована *in vivo*.



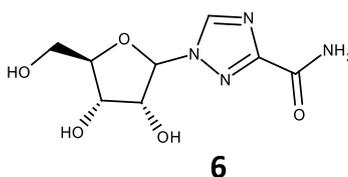
Аналоги нуклеозидов (АН) – самый большой класс противовирусных соединений, нашедших применение в клинической практике. АН в форме соответствующих нуклеозидтрифосфатов могут конкурировать с эндогенными субстратами и встраиваться в растущую цепь РНК вируса, таким образом предотвращая ее элонгацию. Помимо этого, такие АН, как рибавирин, могут быть встроены в РНК, но не приводят к терминации ее синтеза. С такой дефектной матрицы считывается мутированная РНК, что впоследствии приводит к нарушению вирусной репродукции [176].

Активность некоторых АН против ВКЭ была продемонстрирована в испытаниях *in vitro*. Так, 7-деаза-2'-С-метиладенозин **2** ингибирует репродукцию ВКЭ с  $EC_{50}$  7 мкМ при  $CC_{50} > 50$  мкМ [177]. Соединение активно против вируса гепатита С [178] и ДНГВ [179], а также имеет хорошие фармакокинетические свойства, подтвержденные в экспериментах на нескольких животных моделях. 2'-С-Метилцитидин **3** не только подавляет репликацию ВКЭ ( $EC_{50}$  14,2 мкМ), но и способен ингибировать цитопатическое действие ПОВ с  $EC_{50}$  5,5 мкМ [168], однако обладает заметной цитотоксичностью. Аналог аденозина – соединение NITD008 **4** – ингибирует *in vitro* репродукцию флавивирусов, переносимых комарами (ДНГВ1 – 4, ВЛЗН, ВЯЭ) и клещами (ВКЭ, ПОВ, вирус болезни леса Киасанур, вирус геморрагической лихорадки Алхурма, вирус омской геморрагической лихорадки), однако не эффективен против вируса западного энцефаломиелита лошадей (альфавируса, также относящегося к классу II белков слияния) и везикулярного стоматита (класс III). В форме трифосфата NITD008 ингибирует РНК-зависимую РНК-полимеразу, что свидетельствует о способности соединения выступать в роли терминатора цепи при синтезе РНК. Соединение полностью предотвращает гибель мышей, зараженных ДНГВ-2, имеет хорошие фармакокинетические свойства и обладает высокой биодоступностью при приеме внутрь у мышей [180, 181].

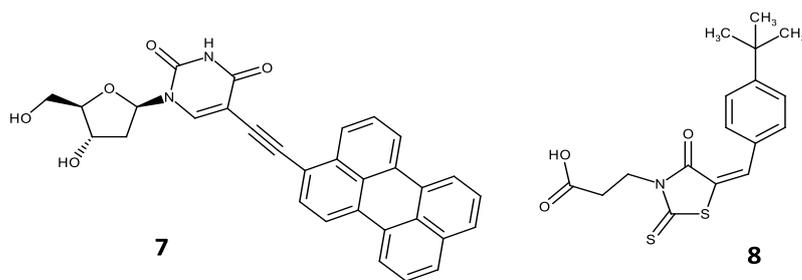


Ингибитор оротидинмонофосфатдекарбоксилазы 6-азауридин **5** блокирует клеточный синтез пиримидина [182] и активен против широкого спектра флавивирусов (ДНГВ1-4, ВЛЗН, ВЯЭ, вирус Зика и др.) с  $EC_{50}$  0,4 – 0,6 мМ [167], в том числе он способен подавлять цитопатический эффект ПОВ, однако ингибирует репродукцию ВКЭ лишь при концентрации 50 мкМ [177]. Цитотоксичность 6-азауридина варьируется от приемлемой до сильной для различных клеточных линий; соединение также проявляет цитостатический эффект [168], [177].

Рибавирин **6** не ингибирует репликацию ТВЕ *in vitro* при концентрации 50 мкМ [177], против других флавивирусов рибавирин также проявляет лишь слабый эффект и в клеточных линиях, и на животных моделях [183].



Другая группа аналогов нуклеозидов – жесткие амфипатические ингибиторы слияния (rigid amphiphilic fusion inhibitors, RAFI), обладающие активностью против широкого спектра оболочечных вирусов, в том числе вируса гриппа, гепатита С и вируса простого герпеса [184, 185]. Предложено два механизма их действия: 1) встраивание в клеточную или вирусную мембрану и механическое препятствование слиянию; 2) фотосенсилизация мембран в результате окисления двойных связей и встраивания гидропероксидной группы в гидрофобные ацильные цепи фосфолипидов [186]. Конечным итогом действия по обоим механизмам является снижение текучести и гибкости мембран, что повышает энергию активации процесса слияния и снижает его эффективность. Серия аналогов нуклеозидов с основаниями, модифицированными пиреновыми или периленовыми группами, была протестирована против ВКЭ *in vitro* [187]. Для лучшего из них соединения **7**, значение  $EC_{50}$  составило 24 нМ. Соединения активны против различных оболочечных вирусов со значениями  $EC_{50}$  2 – 283 нМ, однако не подавляют цитопатическое действие необолочечных вирусов в микромолярных концентрациях.



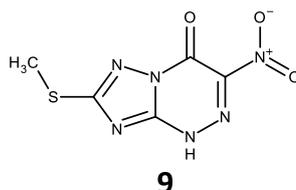
N-Концевой домен белка NS5 ответственен не только за связывание ГТФ, но и за метилтрансферазную и РНК-гуанилилтрансферазную активность, необходимую для формирования кэп-структуры [188]. Мутации в аминокислотной последовательности этого домена у ДНГВ подавляют репликацию вируса [189]. Высокопроизводительный скрининг библиотеки из 235456 соединений позволил идентифицировать серию производных 2-тиоксотиазолидин-4-она, конкурирующих с ГТФ за связывание с кэп-ферментом. Анализ соотношений структуры и активности соединений привел к идентификации соединения-лидера BG-323 **8**, которое конкурентно ингибирует связывание ГТФ, ингибирует *in vitro* гуанилилтрансферазную активность NS5, а также репликацию ВЛЗН, ВЖЛ и ПОВ при  $CC_{50}$  184 мкМ (72 ч) [190, 191]. При концентрации 75 мкМ BG-323 снижает титр ПОВ на 5 порядков. За 6 пассажей в присутствии BG-323 ВЛЗН не был способен выработать устойчивости к соединению. Соединение оказалось нетоксичным для мышей, однако не проявило активности против ВЛЗН *in vivo* - авторы связывают это с коротким временем полувыведения соединения ввиду его активного связывания с белками плазмы крови [190].

Отдельный пласт российских исследований посвящен индукторам интерферона: амиксин (тилорон), циклоферон, ридостин, йодантипирин, панавир, полипренилфосфат, ларифан, амантадин сульфат, а также препараты IFN- $\alpha$ , некоторые из которых допущены к применению в РФ как средства для лечения КЭ, проявили некоторую эффективность против флавивирусных инфекций на экспериментальных моделях. Наибольшую активность они демонстрируют только при применении до заражения вирусом, что объясняется способностью флавивирусов подавлять интерферон-обусловленный иммунный ответ. Тем не менее, проводившиеся клинические испытания безопасности и эффективности различных схем использования этих препаратов для экстренной профилактики КЭ имеют низкое качество, не соответствуют принципам доказательной медицины и требуют дальнейших исследований. Для некоторых препаратов, имеющих КЭ в качестве показания к применению, например, римантадина, вообще отсутствуют публикации по доклиническому и клиническому исследованию [192].

Аналогичные проблемы с доказательной базой по безопасности и эффективности в

лечении КЭ можно отметить для препаратов цитофлавин [193] и мексидол [194], для которых заявлена антиоксидантная активность.

Исследования низкого качества так же были проведены для изучения активности препарата триазавирин **9**. Из приведенного в работе [195] описания результатов следует, что *in vitro* активность препарата изучалась при концентрации 440 мкМ, при этом соединение **9** снижало титр ВКЭ с 5 log<sub>10</sub>БОЕ/мл до 2 log<sub>10</sub>БОЕ/мл. Выводы работы [196] об увеличении продолжительности жизни зараженных мышей, которым вводили препарат, не подкреплены статистическим анализом, также отсутствуют данные о размерах выборок.



Таким образом, к настоящему моменту не существует препаратов, терапевтическое действие которых на стадии после заражения можно считать доказанным.

#### 4.3. Ингибиторы слияния

Для ДНГВ имеются данные об атомной структуре белка Е, белка капсида С, белка NS3 (протеазный, геликазный домен и полноразмерная структура), доменов НТФазы, РНК-зависимой РНК-полимеразы NS5, что облегчает дизайн противовирусных препаратов [50], [51].

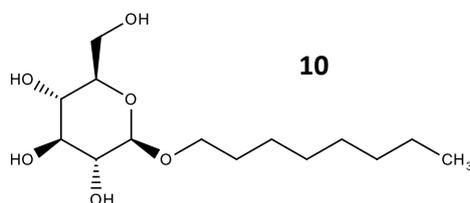
Со структурами белков ВКЭ и ПОВ дело обстоит иначе. В базе PDB имеются только данные о кристаллической структуре sE ВКЭ. Исходя из этого, наиболее обоснованным является решение о поиске веществ, действующих именно на белок Е. Чтобы остановить развитие вирусной инфекции на ранних этапах, можно воздействовать на стадию взаимодействия вируса с рецепторами поверхности клетки. В случае флавивирусов это не представляется возможным, поскольку конкретный специфический рецептор ещё не был найден, и существует большой спектр молекул, способных опосредовать проникновение этих вирусов. Вторым подходом к остановке вирусной инфекции является стадия проникновения. Поскольку флавивирусы проникают в клетку хозяина путём эндоцитоза, во время которого происходит рН-зависимый конформационный переход молекулы белка Е, запускающий процесс слияния мембран вириона и клетки. Эта стадия является весьма перспективной для прекращения инфекции ВКЭ ещё до его репликации. Одним из наиболее развивающихся подходов в этой области является поиск ингибиторов слияния, связывающихся в гидрофобном кармане белка Е, обнаруженном в одной из кристаллических структур sE ДНГВ-2 (код доступа

в PDB 1OKE).

Наличие нескольких противовирусных ингибиторов слияния, вышедших на фармацевтический рынок, свидетельствуют о перспективности такого подхода к борьбе с вирусами. Например, Маравирик связывается с вирусным корцептором CCR5 ВИЧ [197], Энфувиртид блокирует вирусный белок GP41 ВИЧ, снижая слияние вирусных и клеточных мембран [198]. Препарат Мерклюдекс-*b*, липопептид на основе последовательности домена *preS1* белка оболочки вируса гепатита В, успешно прошел фазу *IIb* клинических испытаний [199].

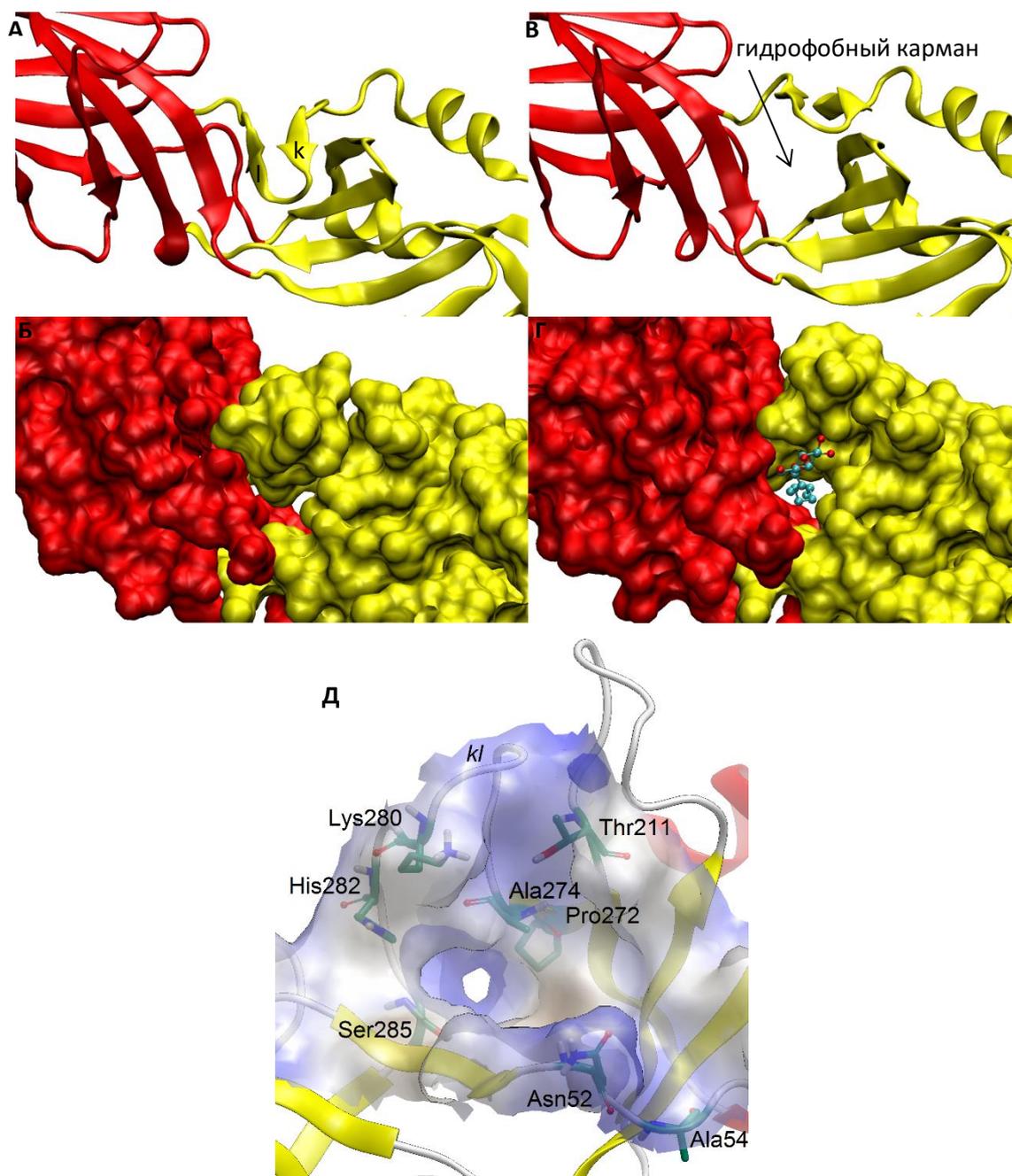
#### 4.3.1. Лиганд-связывающий карман

Из сравнения кристаллографических данных о структурах белков Е ДНГВ и ВКЭ до и после слияния известно, что в белке Е домен II разворачивается примерно на 30° относительно домена I за счет движения *kl*-шпильки, находящейся между этими доменами (рис. 14). Эта шпилька провоцирует переключение между «закрытой» и «открытой» формой гидрофобного кармана. В открытой форме шпилька *kl* смещается в сторону межмономерного контакта, образуя солевой мостик и водородные связи с тяжами *i* и *j* соседнего мономера. Для осуществления этого смещения необходимо, чтобы тяжи *k* и *l* перестроились из листа  $F_0E_0D_0lk$  в  $efgkl$ . В результате этого закрывается «отверстие» вдоль оси димерных контактов и открывается продолговатый гидрофобный карман между доменами I и II. Этот карман может связывать одну молекулу детергента – *n*-октил- $\beta$ -D-глюкозида **10** ( $\beta$ -OG).



Аминокислотные остатки, входящие в состав кармана, влияют на различные аспекты жизненного цикла вируса (рис. 14Д): pH слияния, скорость репликации и инфекционность вирусных частиц. Мутации в петлях могут приводить к потере нейроинвазивности или нейровирулентности. Реверсивная замена Met282Tyr (нумерация по sE ВКЭ) в химерном ВЖЛ, содержащем гены белков *rgM-E* от ВЯЭ, значительно увеличивает нейровирулентность для мышей и обезьян, но снижает висцеротропизм [200]. Мутация остатка 280 приводит к аттенуации вируса долины Мюррей: замена гидрофильного остатка на гидрофобный Ser280Phe снижает нейроинвазивность и уровень репродукции в культуре клеток Vero и мозге мышей, а также подавляет способность вируса агглютинировать эритроциты [201]. Аналогично, мутация Phe272Ser снижает нейроинвазивность ВЯЭ, подавляет способность вируса агглютинировать эритроциты и способствует формированию иммунного ответа [202]. У

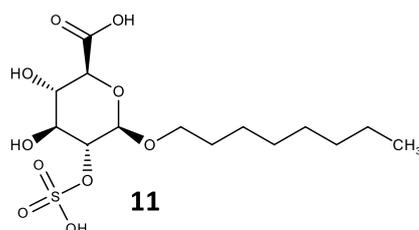
ДНГВ-2 замены Gln52Arg, Ile274Trp, Thr285Tyr вызывают смещение интервала значений рН, при которых может протекать процесс слияния, а также вызывают появление компенсирующих замен. Замена Thr285Tyr приводит к снижению способности вирионов ДНГВ-2 к слиянию во всем диапазоне значений рН [136]. Мутация Ala54, консервативного среди всех флавивирусов, также изменяет рН слияния у ДНГВ-3 [137] и вызывает задержку начала репликации ДНГВ-2 в культуре клеток Vero. Замены Ile274Val/Ser и Tyr211Arg смещают рН слияния ДНГВ-3 в сторону нейтрального.



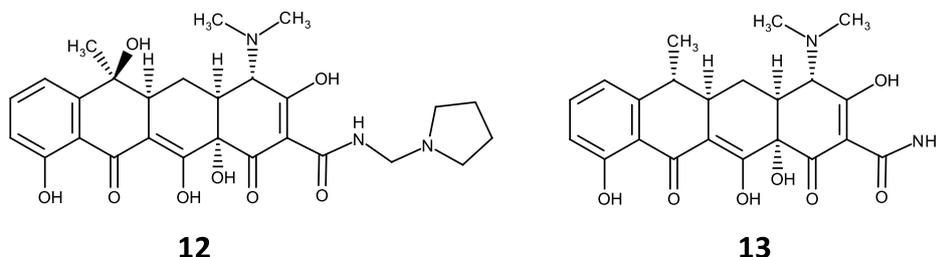
**Рисунок 14.** А, Б) Фрагмент структуры sE ДНГВ 1OAN с карманом, закрытым kl-шпилькой. В) Фрагмент структуры sE ДНГВ 1OKE. Гидрофобный карман открыт. Г) В открытом кармане может связываться молекула n-октил-β-D-глюкозида. Д) Расположение аминокислотных остатков в кармане белка E, замены которых влияют на различные аспекты жизненного цикла флавивирусов.

#### 4.3.2. Поиск ингибиторов слияния, связывающихся в гидрофобном кармане

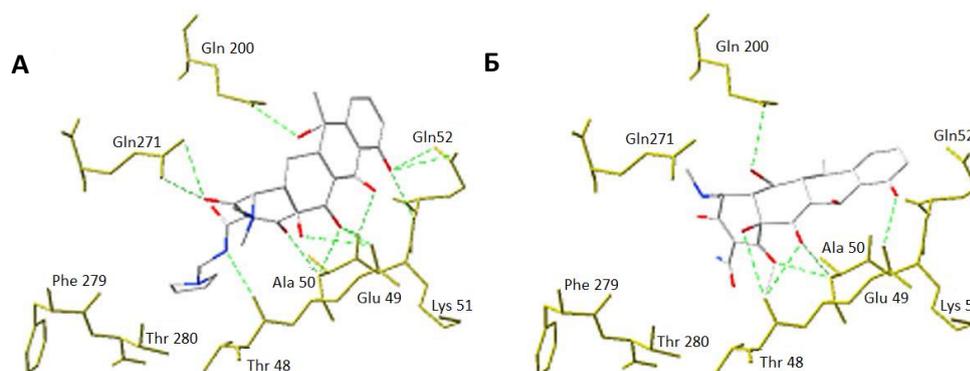
Авторы [203] предположили, что аналоги  $\beta$ -OG, содержащие гидрофильные группы в углеводном фрагменте, могут иметь более высокую аффинность к гидрофобному карману белка E. Авторами были синтезированы и испытаны методом ингибирования образования фокусов в культуре клеток против ДНГВ-1 четыре карбокси- и сульфопроизводных  $\beta$ -OG. Наибольшую активность проявила *n*-октил-2-О-сульфо- $\beta$ -D-глюкуроновая кислота **11** ( $EC_{50}$  116 мкМ), тогда как для  $\beta$ -OG  $EC_{50} > 500$  мкМ.



Виртуальный скрининг библиотеки “Comprehensive medicinal chemistry database”, содержащей 5331 молекулу, был произведен методом докинга в гидрофобный карман белка E вируса денге [204] с использованием программы GEMDOCK [205]. Было отобрано 173 структуры (3%), из которых для биологических испытаний против ДНГВ-2 методом ингибирования образования бляшек в культуре клеток были отобраны два производных тетрациклина (тетрациклин и ролитетрациклин). Также были испытаны доксициклин и окситетрациклин, имеющие схожую структуру, но не входившие в библиотеку. Приемлемую активность проявили ролитетрациклин **12** ( $EC_{50}$  67,1 мкМ) и доксициклин **13** (55,6 мкМ).



Авторы предположили, что ингибиторы не только создают стерические помехи для изменения конформации белка, но и взаимодействуют с аминокислотными остатками, которые влияют на pH слияния (рис. 15).

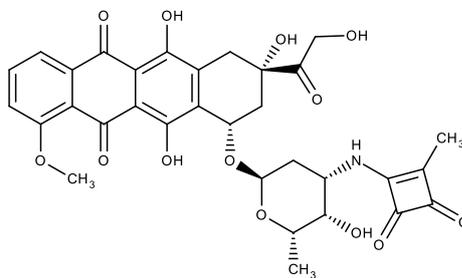


**Рисунок 15.** Предполагаемые способы связывания соединений А) 12 и Б) 13 в гидрофобном кармане белка [204].

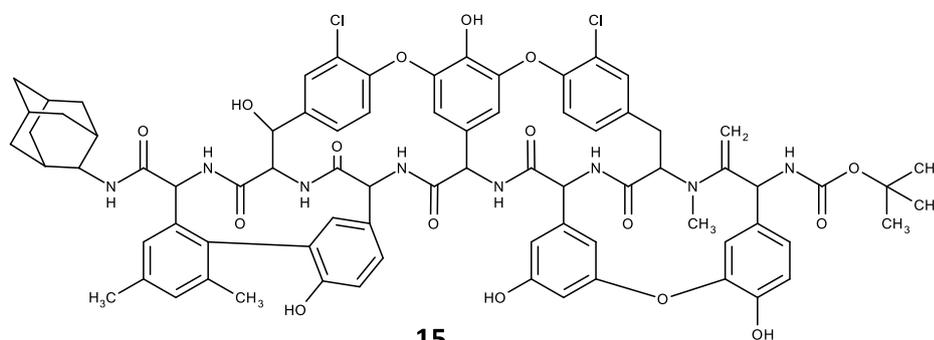
Для доказательства факта действия соединений именно на вирионы, а не на клетки, выполнялся эксперимент по изучению влияния порядка добавления веществ и вируса к клеткам (time-of-addition). При введении соединений в момент заражения клеток наблюдалось уменьшение количества бляшек вируса до 3% и менее по сравнению с контрольным. В случае введения соединения через два часа после заражения количество бляшек составляло порядка 75% от контрольного. Эти данные свидетельствуют в пользу гипотезы о действии соединений на стадии проникновения вируса в клетку. Вероятность действия найденных антибиотиков на участки вирусной РНК, схожие по структуре с сайтами связывания тетрациклиновых антибиотиков в рибосомальных РНК или транспортных РНК бактерий, мала, так как для того, чтобы достичь РНК, молекулам было бы необходимо проникнуть через вирусную мембрану, что представляется затруднительным. В случае же действия на РНК внутри клетки не должно было наблюдаться зависимости ингибиторной активности от времени введения. Для определения точного места связывания белка с ингибитором необходимо проведение других экспериментов, таких как кристаллизация комплекса и последующее определение его структуры методом РСА.

Производные антибиотиков доксорубин SA-17 **14** и тейкопланина LCTA-949 **15**, активные против широкого спектра флавивирусов, были идентифицированы группой под руководством Е. Нейтса [206, 207]. Эксперименты с изменением порядка добавления соединений и инфицирования показали, что оба соединения действуют на ранних стадиях вирусного инфекционного цикла. Для обоих соединений было показано, что их противовирусное действие не обусловлено разрушением вирионов (для этого вирус инкубировали с веществом в присутствии РНКазы, после чего вирусную РНК амплифицировали и показывали отсутствие отличий в количестве РНК по сравнению с пробой, инкубированной в отсутствие вещества). Ни одно из соединений не ингибирует репликацию репликона ДНГВ, у которого отсутствуют гены структурных белков. Все эти

факты указывают на то, что данные соединения, вероятней всего, действуют на белок оболочки Е на стадиях присоединения вирионов к клетке или слияния. Прохождение 20 пассажей ДНГВ-2 в присутствии найденных соединений не вызывает появления мутантов, что свидетельствует о связывании соединения в критическом для жизненного цикла вируса регионе белка Е.



14



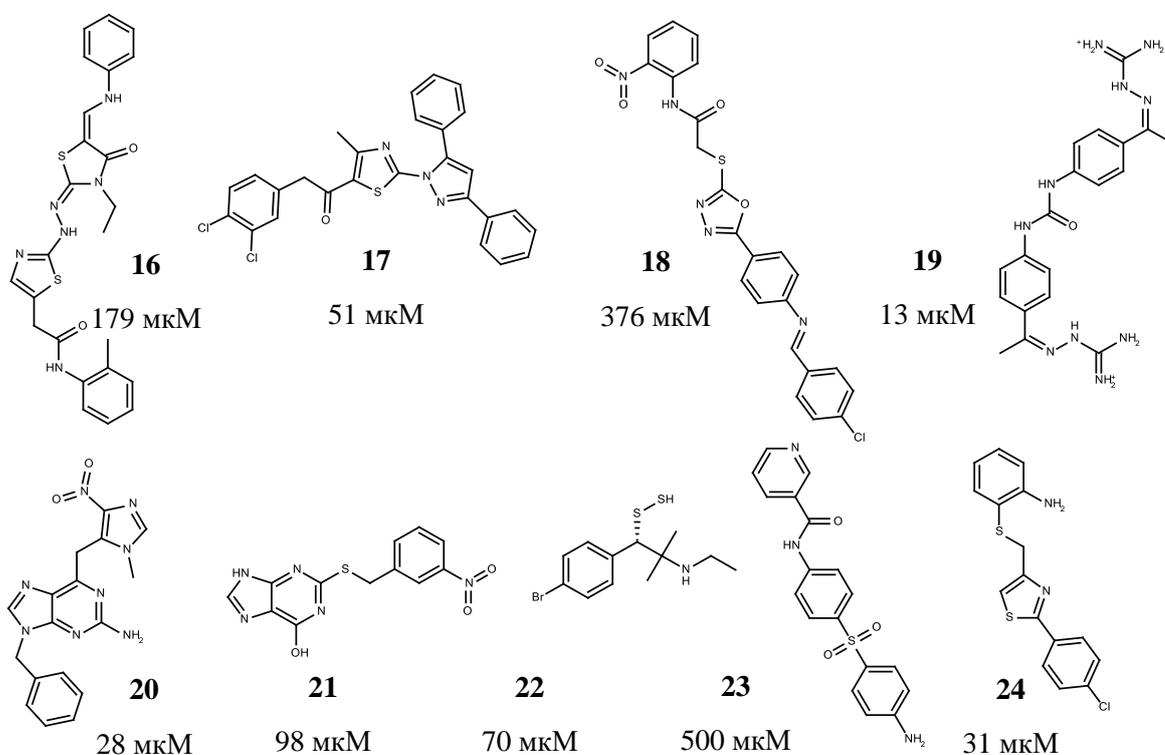
15

SA-17 подавляет репликацию ДНГВ-1, 2, 3, ВЖЛ и вируса Модок в микромолярных концентрациях, однако оно неактивно против ДНГВ-4, ВКЭ, ВЯЭ и ВЛЗН. Так как неродственные безоболочечные вирусы не чувствительны к действию SA-17, предполагается, что оно специфично взаимодействует с белком оболочки некоторых флавивирусов. По результатам докинга предполагается, что соединение может связываться в гидрофобном кармане белка Е, образуя водородные связи с Ala50, Tyr137 и Gln200 [206].

Соединение LCTA-949 ингибирует репродукцию ДНГВ-2, ВЯЭ, ВЖЛ, ВЛЗН, вируса Модок, но наибольшую активность проявило против ВКЭ ( $EC_{50}$  0,3 мкМ,  $CC_{50}$  > 100 мкМ). С помощью исследований связывания и слияния клеток и флуоресцентно меченых вирионов было показано, что соединение, вероятно, предотвращает прикрепление вириона к клеточной поверхности. Однако необходимы дополнительные исследования, чтобы установить, связывается ли оно непосредственно с белком Е. LCTA-949 предотвращает антителозависимое усиление инфекции ДНГВ. Так как в данном случае связанные с антителами вирионы проникают в клетку посредством Fc-рецепторов, которые не являются специфическими вирусными рецепторами, это наблюдение подтверждает гипотезу о связывании соединения с белком оболочки вируса.

Ранее было показано, что LCTA-949 обладает активностью против ВИЧ, коронавируса человека и кошек и вируса гепатита С. Установлено, что в первых двух случаях соединение влияет на проникновение вирусов в клетку, тогда как в случае гепатита С оно ингибирует стадию репликации [207].

Виртуальный скрининг библиотек Национального института рака (NCI) D (diversity), M (mechanistic) и P (plated), состоящих из более чем 142 тыс. низкомолекулярных соединений, методом докинга (программа Glide) в сайт связывания  $\beta$ -OG белка E ДНГВ и последующего визуального анализа позволил выявить 23 потенциально активных вещества, которые были испытаны *in vitro* против вируса желтой лихорадки со встроенным геном люциферазы [8]. Активность против псевдоинфекционных частиц ВЖЛ (с отсутствующими генами структурных белков), способных заразить клетку только единожды, была измерена для 9 соединений (рис. 16), проявивших активность на предыдущей стадии.



**Рисунок 16.** Ингибиторы репродукции ВЖЛ, описанные в работе [8]. Под номерами соединений указаны значения  $EC_{50}$ .

У соединений **21** – **23** значение  $EC_{50}$  против псевдоинфекционных частиц оказалось выше, чем для вируса, что свидетельствует о действии ингибитора на стадии созревания вириона или его проникновения в клетку. Для соединений **19** и **20** эти величины имеют сходные значения, и можно предполагать их действие на несколько мишеней. Авторы отмечают, что соединение **19** снижает титр ВЖЛ на 2 порядка при концентрации 100 мкМ. Применение метода ЯМР с переносом насыщения (STD NMR) позволило подтвердить, что

соединение **19** связывается с оболочкой вириона, а также выявить конкуренцию соединения **19** и  $\beta$ -OG за связывание с белком E ДНГВ, что свидетельствует в пользу гипотезы о действии его именно на сайт связывания  $\beta$ -OG.

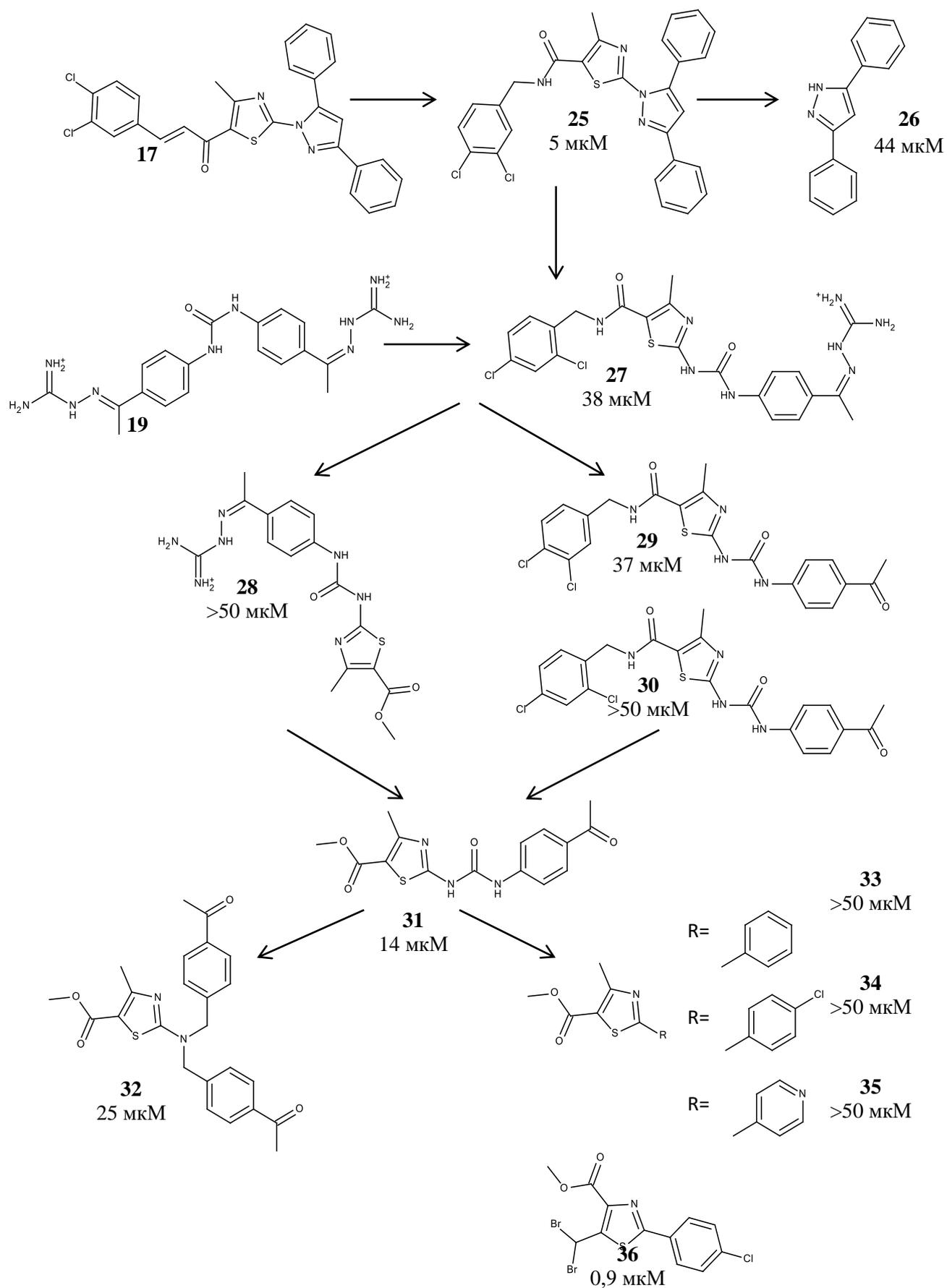
Выбрав в качестве исходных соединения **17**, **18** и **24**, авторы [208] произвели их оптимизацию, синтез аналогов и определили их активность против ВЖЛ на клетках.

Схема дизайна структур ингибиторов приведена на рисунке 16. Соединение **25** имеет большую активность и меньшую цитотоксичность по сравнению с исходным **17**, причиной чего является замена акцептора Михаэля, 1,3-ненасыщенной кетогруппы, биоизостерной амидной группой. Сам по себе 3,5-дифенил-1H-пиразол **26** более активен, чем **17**. Сложноэфирные аналоги соединения **25**, полученные путем замещения дихлорбензиламидной группы, не проявили активности, что легко объясняется их неустойчивостью при гидролизе.

Далее авторами были сконструированы и синтезированы соединения, центральной в которых являются фенилкарбамидная группа **19** и тиазольный цикл **17**. Соединения **27**, **29**, **31** подавляли репликацию вируса желтой лихорадки в биологических испытаниях на клетках эффективнее, чем исходное **17**, но не **19**. Ядро молекулы, состоящее из тиазольного цикла, связанного посредством карбамидной группы с ароматическим фрагментом, может быть весьма многообещающей исходной структурой для дальнейшего поиска противовирусных соединений. Активность **31** исчезает при переходе к соответствующей кислоте. Замена гуанидинового фрагмента на карбамидный приводит к потере веществами активности.

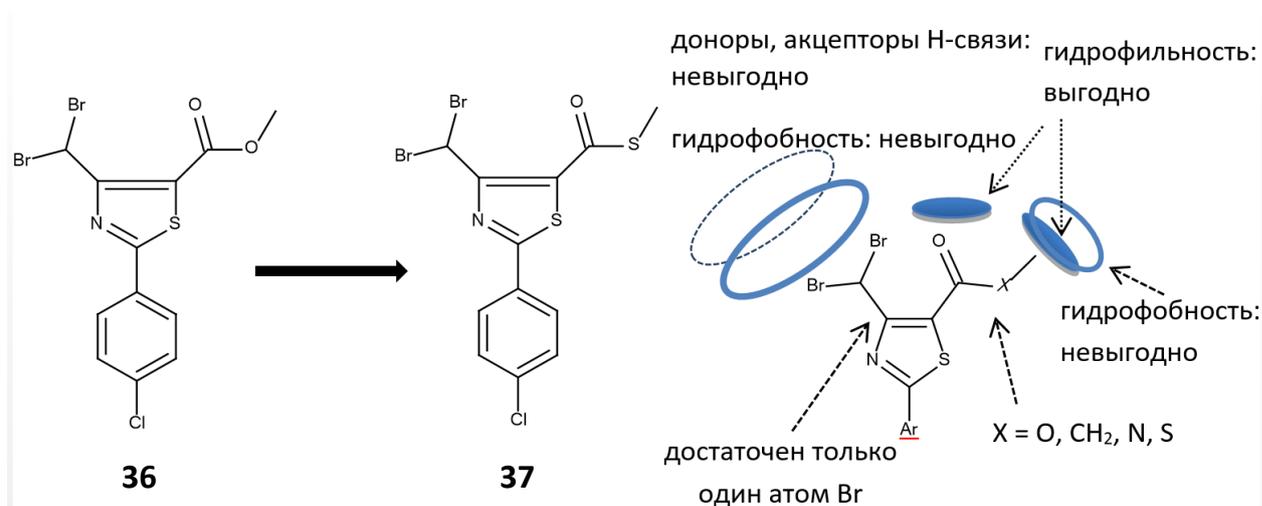
Важно, что наиболее активное соединение **36** ( $EC_{50}$  0,9 мкМ) малотоксично ( $CC_{50}$  153 мкМ), несмотря на наличие дибромметильного заместителя в тиазольном кольце, который может алкилировать биологические молекулы. Сравнение с соединением **35**, неактивным по отношению к ВЖЛ, показывает, что наличие дибромметильной группы необходимо для проявления противовирусной активности. Авторы предполагают, что соединение **36** имеет перспективы в качестве ведущего соединения для дальнейшего дизайна противофлавивирусных соединений.

Другая группа аналогов была получена путем варьирования положения аминогруппы в одном фенильном кольце соединения **24**, а также путем изменения положения атома хлора в другом. Такие изменения не привели к значительным изменениям противовирусной активности, что позволяет сделать вывод, что биологическая активность этой группы веществ определяется их физико-химическими свойствами.



**Рисунок 17.** Дизайн ингибиторов слияния ВЖЛ в работе [208]. Под номерами соединений указаны значения  $EC_{50}$ .

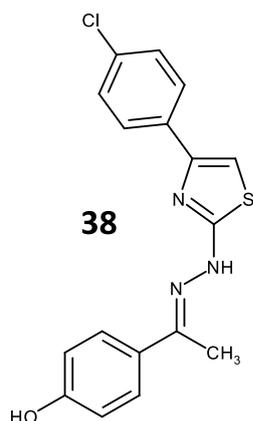
Выбрав в качестве ведущего соединения **36**, те же авторы исследовали связь между активностью и структурой заместителей в положениях 4 и 5 (4-хлорфенил)тиазольного цикла [209]. На первом этапе была проведена оптимизация заместителя в положении 5 тиазольного кольца с целью увеличения метаболической стабильности и активности ведущего соединения. Сложноэфирная группа была замещена на более устойчивые к метаболизму амидную, тиоэфирную и кетогруппы. Производные незамещенного амида и метиламида проявили чуть большую активность по отношению к ВЛЗН, чем соединение-лидер. Сравнение активностей производных моноалкил- и диалкилзамещенных амидов позволило заключить, что потеря способности атома азота быть донором водородной связи, увеличение гидрофобности и стерической нагруженности способствуют снижению активности. Результаты, полученные для производных сложных эфиров, также свидетельствуют об уменьшении активности с увеличением гидрофобности заместителя. Была высказана гипотеза, что заместитель находится в гидрофильном регионе кармана связывания или в доступной растворителю области, подтвержденная путем исследования активности производных моноалкилзамещенных амидов, содержащих в алкильной цепи разное количество гидроксильных групп (рис. 18). Производное метилкетона и метилового тиоэфира **37** проявило противовирусную активность вдвое большую, чем исходное соединение, причем цитотоксичность **37** также ниже, чем у **36**, и терапевтический индекс для **37** достигает 263.



**Рисунок 18.** Соединения **36**, **37** и модель фармакофора ингибиторов слияния вируса желтой лихорадки, предложенная в работе [209].

На следующем этапе было исследовано влияние заместителя в положении 4 тиазольного кольца. Дибромметильная группа была замещена на различные алкильные и арильные группировки. Все такие производные имели меньшую активность, чем соединение-лидер. Поэтому далее дибромметил заменили различными более полярными группами (альдегидными, эфирными, сложноэфирными и цианогруппами). Все эти производные имели

низкую активность. Так как замещение дибромметила и полярными, и неполярными группами не вызвало уменьшения  $EC_{50}$ , авторы испытали другие галогенпроизводные. Дихлорметильный аналог соединения-лидера проявил очень низкую активность, монобромпроизводное имело чуть меньшее значение  $EC_{50}$ . Цитотоксичность этого соединения составляет 74,6 мкМ, но это соединение может быть более подвержено атаке эндогенных нуклеофилов, чем дибромпроизводное, из-за отсутствия стерических затруднений.

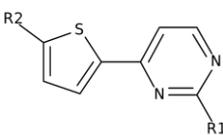
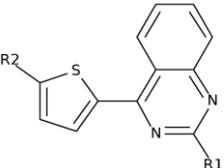
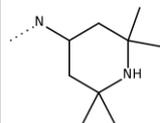
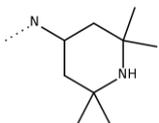
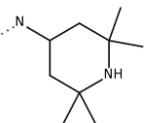
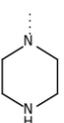
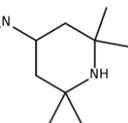
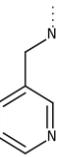
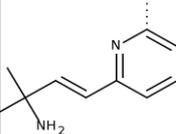
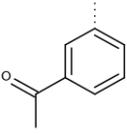
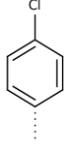
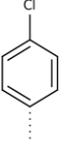
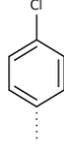
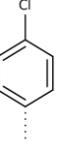


Дальнейшая модификация структур соединений **24**, **27**, **36** недавно была проведена в работе [210]. Из двух синтезированных серий соединений наибольшую активность проявило соединение **38** ( $EC_{50}$  1,39 мкМ в тесте ингибирования образования бляшек ДНГВ-2,  $CC_{50}$  125 мкМ). Докинг соединения **38** позволяет предположить, что ключевыми факторами для связывания этого соединения в кармане  $\beta$ -OG являются гидрофобные взаимодействия с Leu207,  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействия с Phe193 или Phe297 и водородные связи с Ile270 и Leu277.

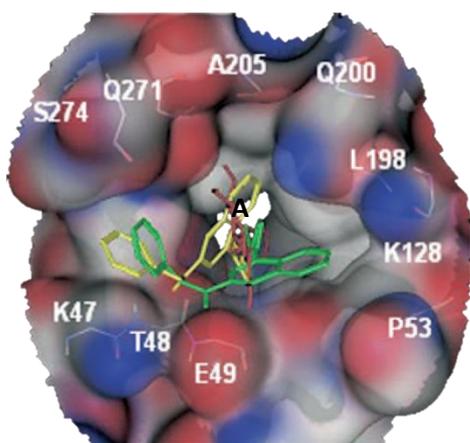
В работе [211] виртуальный скрининг библиотеки соединений компании Novartis (586 829 соединений) методом докинга в гидрофобный карман белка E ДНГВ был произведен с помощью программы Glide. В результате было отобрано 10 тыс. соединений, среди которых был проведен фармакофорный поиск, основанный на двух донорных сферах, расположенных перед карбонильными атомами кислорода основной цепи остатков Ala50 и Thr48, акцепторной сфере вблизи амидного азота основной цепи Ala50 и гидрофобной сфере в центре октилового хвоста  $\beta$ -OG. В результате скрининга и последующего удаления дубликатов было отобрано 671 соединение. Визуальный анализ позволил отобрать 111 соединений для биологических испытаний *in vitro* против ДНГВ-2, в результате которых были выявлены вещества **39** и **40**, послужившие отправной точкой для синтеза аналогов (табл. 3). Было обнаружено, что и амин R1, и арильная группа R2 важны для противовирусной активности. Оптимальным вариантом заместителя R2 оказался *орто*-хлорфенил. Первичные и вторичные амины, алкил- и ариламины проявили ингибиторный эффект, но пиперазиновый заместитель оказался наилучшим в этом отношении. Замена пиримидинового цикла на хиназолиновый оказалась очень удачной и привела к увеличению активности.

Соединение **44** полностью подавляло образование  $7 \log_{10}$ БОЕ/мл ДНГВ-2. Это соединение оказалось активным против всех подтипов ДНГВ ( $EC_{50}$  0,11, 0,07, 0,50, 0,3 мкМ, соответственно), а также против ВЖЛ, ВЛЗН и ВЯЭ ( $EC_{50}$  0,5, 0,6, 1,4 мкМ, соответственно).

Таблица 3. Соединения, описанные в работе [211].

№ соединения	39	40	41	42	43	44
Центральный фрагмент						
R1						
R2						
EC <sub>50</sub> , мкМ	1,69	0,90	0,27	0,09	0,04	0,07
CC <sub>50</sub> , мкМ	>20	>20	>20	>20	18,64	>20

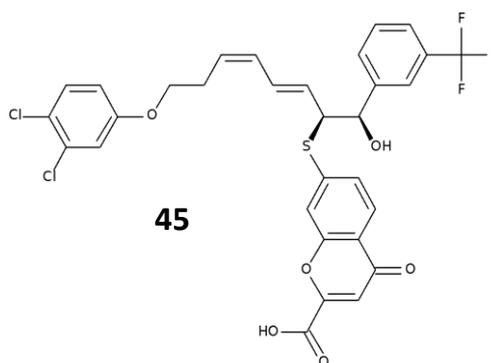
В эксперименте с изменением порядка добавления и инфицирования соединение **44** показало дозозависимый эффект только в экспериментах, в которых вирус и вещество добавлялись к клеткам одновременно (без предварительного совместного инкубирования) или если вещество и вирус присутствовали на всем протяжении эксперимента. При добавлении соединения после заражения активность снижалась и отсутствовала зависимость доза-эффект. С помощью иммунофлуоресцентной микроскопии было показано, что вирус после попадания в эндосомы не выходит из них в присутствии **44**. Установлено, что соединение **44** не влияет на pH эндосом, следовательно, его действие не связано с закислением. Также с помощью метода гель-фильтрации показано, что **44** связывается с вирионом. Дальнейший иммунофлуоресцентный анализ позволил установить, что соединение локализуется с белком E в клетках. Однако после интенсивных синтетических усилий, предпринятых для улучшения фармакокинетических свойств соединений с хинолиновым ядром, низкая активность и значительное связывание с белками плазмы крови из-за высокой липофильности не позволили проводить дальнейшую разработку этих структур [176]. В экспериментах на мышцах было показано, что соединение **44** выпадает в осадок в желудочно-кишечном тракте, что, соответственно, не позволило исследовать его активность *in vivo* [212].



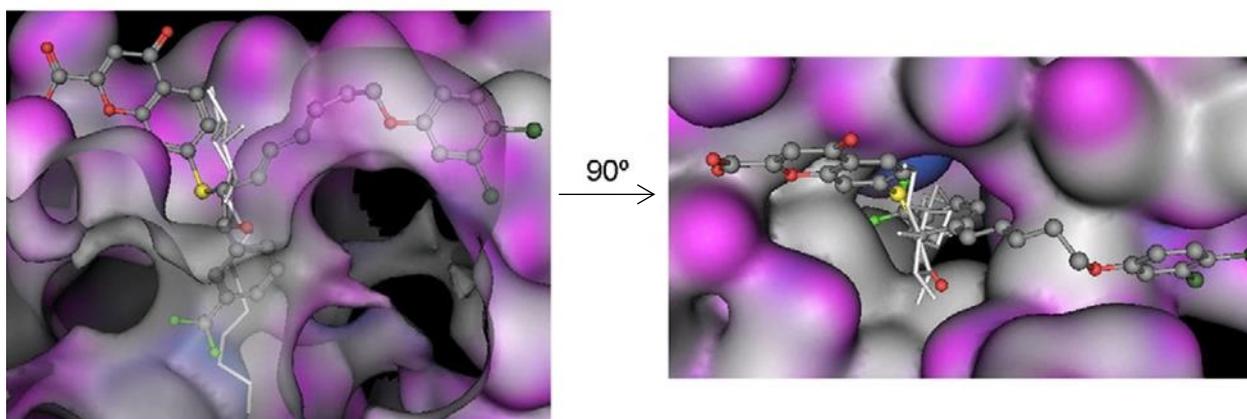
**Рисунок 19.** Два предполагаемых способа связывания соединения **44** (желтые и зеленые стержни) в кармане белка E, розовые стержни –  $\beta$ -OG [211].

По результатам докинга предполагается, что хлорфенилтиофеновый остаток молекулы располагается в гидрофобном кармане между DI и DII белка E, а пиридилметилхиназолиламин контактирует с внешней средой, причем либо фенильная группа связана гидрофобными взаимодействиями с Leu198 и Pro53, и аминный атом водорода образует водородную связь с боковой цепью Glu49, а пиридиновый атом азота – с боковой группой Gln271, либо хиназолиновое кольцо связано гидрофобным взаимодействием с Leu198 и Ala205, а атом водорода аминогруппы взаимодействует с основной цепью Thr48 (рис. 19) [211].

В другом исследовании докинг библиотеки Novartis также проводился в гидрофобный карман белка E ДНГВ с помощью программы Glide. Изомеры, получившие плохие оценки, были удалены, слишком похожие молекулы были отфильтрованы на основе молекулярного подобия. Для оставшихся 1367 кандидатов была произведена визуальная оценка. Аналогичный алгоритм был применен к библиотеке природных соединений компании Novartis. В итоге, библиотека из 365 низкомолекулярных соединений была подготовлена для дальнейших испытаний против ДНГВ *in vitro*. Биологические тесты позволили выявить соединение **45** с EC<sub>50</sub> 9,8 мкМ и CC<sub>50</sub> 49 мкМ. При концентрации 25 мкМ соединение полностью подавляет репродукцию 7,7 log<sub>10</sub> БОЕ/мл ДНГВ.



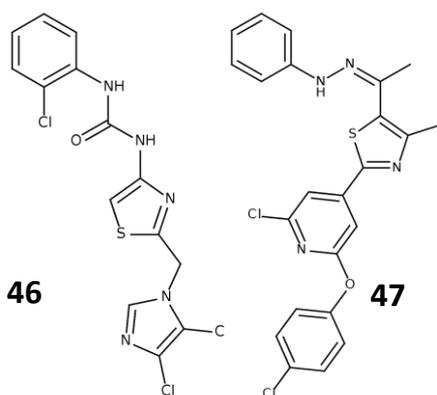
По результатам докинга предполагается, что молекула ориентирована в гидрофобном кармане таким образом, что хроменоновый фрагмент взаимодействует с Lys128 и Gln52 белка E (рис. 22), тогда как трифторфенильный фрагмент спрятан в гидрофобной полости аналогично хлорфеноксипиридиновому заместителю соединения **45** [140].



**Рисунок 22.** Расположение *h*-OG (стержневая модель) и соединения **45** (шаро-стержневая модель) в кармане белка *E* ДНГВ [140].

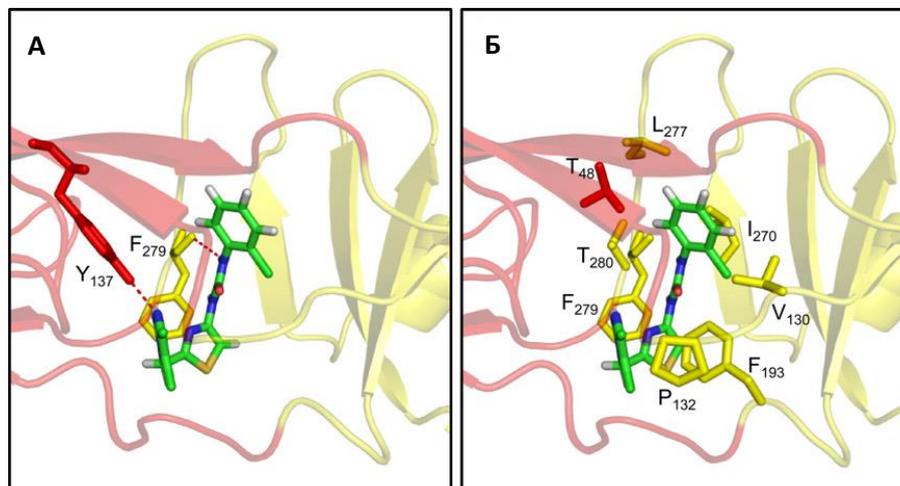
Соединение **45** ингибирует рост бляшек только при инкубировании совместно с вирусом в момент заражения, но не при инкубировании с клетками до или после заражения, что свидетельствует об его активности на стадии входа вируса в клетку.

В опыте с трипсин-содержащими липосомами добавление соединения **45** предотвращало деградацию белка капсида. Соединение **45** также ингибирует образование клеточного синцития. Эти данные свидетельствуют о действии соединения на стадии слияния. Однако из-за большого молекулярного веса, низкой селективности и неприемлемых фармакокинетических свойств разработка серии аналогов была прекращена [176].

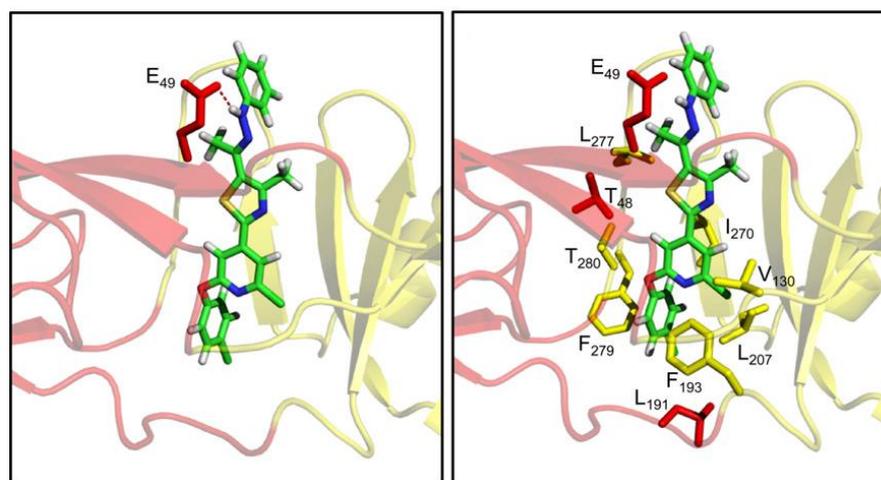


Еще одна серия соединений была обнаружена при докинге базы Maybridge (~ 135 тыс. соединений). Докинг в гидрофобный карман белка *E* ДНГВ производился с помощью программы Gold и позволил отобрать 359 потенциально активных соединений. Затем на основе визуального анализа и расчета липофильности ( $\log P$ ) были отобраны 5 соединений для определения активности против ДНГВ-2 *in vitro*. Соединения **46** ( $EC_{50}$  32 мкМ) и **47** ( $EC_{50}$  1,2 мкМ,  $CC_{50}$  > 100 мкМ) оказались активными и по отношению к ВЖЛ ( $EC_{50}$  16 и 1,6 мкМ, соответственно), **47** также проявило активность против ВЛЗН ( $EC_{50}$  3,8 мкМ). Авторы исключили неселективный механизм противовирусного действия **46**, показав отсутствие активности против неродственного оболочечного респираторного синцитиального вируса. Предположение о воздействии именно на стадию слияния проверялось в опыте по изучению «слияния изнутри»: соединение **47** предотвращает образование синцития. При анализе предположительного способа связывания **46** выявлены водородные связи между атомом азота имидазольной группы и гидроксильной группой Tyr137, атомом азота

карбамидной группы и кислородом основной цепи остатка Phe279. Хлорфеноксипиридиновый заместитель соединения **47** расположен в гидрофобной полости аналогично трифторфенильному фрагменту **45**. Атом водорода гидразонной группы **47** образует связь с карбоксильным атомом кислорода Glu49 (рис. 20, 21) [142]. Соединение **46** содержит ту же центральную группу (спейсер), что и соединение **31**.



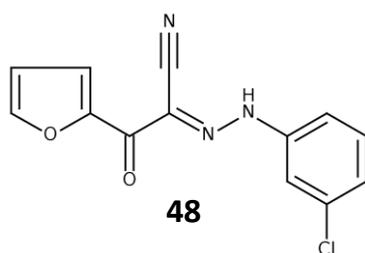
**Рисунок 20.** Способ связывания соединения **46** в кармане белка E [142]. **А)** Водородные связи. **Б)** Ван-дер-ваальсовы взаимодействия.



**Рисунок 21.** Способ связывания соединения **47** в кармане белка E [142]. **А)** Водородные связи. **Б)** Ван-дер-ваальсовы взаимодействия.

Дипептид GluPhe, сконструированный с помощью докинга отдельных аминокислот в карман связывания  $\beta$ -OG, продемонстрировал активность против образования бляшек ДНГВ-2 с  $EC_{50}$  97 мкМ. Он также снижает образование фокусов ДНГВ-1,3,4 при концентрации 100 мкМ на 20 – 40% [213].

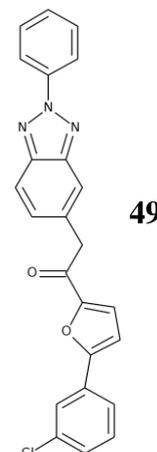
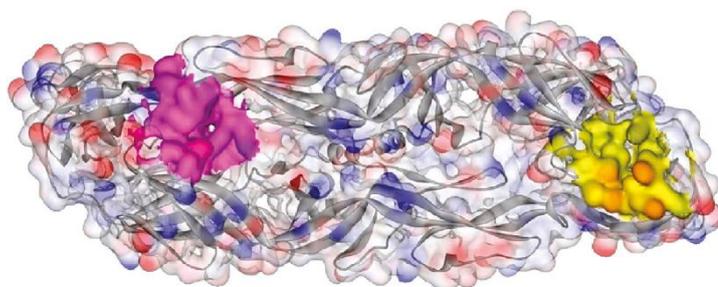
Авторам работ [214, 215] удалось получить полипептид, схожий с полипептидом области стебелька белка E, связывающийся с тримером sE на стадии, предшествующей слиянию. Этот пептид способен связываться с эктодоменом белка E и препятствовать связыванию стебелька



вдоль соответствующего второго домена в тримере, которое приводит к слиянию мембран. Из библиотеки Maybridge были отобраны соединения, препятствующие связыванию эктодомена с найденным пептидом и потому являющиеся потенциальными ингибиторами слияния мембран. Соединение **48** и его аналоги обратимо ингибируют слияние ДНГВ путем связывания с димерной формой белка E до проникновения вируса в клетку: связывание с фрагментом sE, содержащим DI-II, подтверждено с помощью поверхностного плазмонного резонанса и восстановления инфекционности вируса в присутствии DI-II и соединений. Они также предотвращают слияние вириона с трипсин-содержащими липосомами. Соединение **48** ингибирует образование бляшек ДНГВ-2 с EC<sub>50</sub> ~50 мкМ при CC<sub>50</sub> > 100 мкМ. Некоторые аналоги **48** проявляли активность и против ДНГВ-4, но активность против ДНГВ-1 и 3 оставалась незначительной. Найденные соединения не проявляли активности против неродственного оболочечного вируса везикулярного стоматита.

Предполагается, что найденные соединения связываются в кармане β-OG белка E. Хотя этот карман закрыт в форме, соответствующей тримеру после слияния, вход в него полностью доступен, и изменение конформации петли *kl* и открытие кармана не должно вызывать диссоциации тримера и стерические затруднения. Вероятно, что такие вещества, как **48**, запирают тример в состоянии с открытым карманом, в котором теряется аффинность к пептиду стебелька и которое не может произвести финальное подтягивание его к мембране клетки.

Авторам [216] удалось идентифицировать два других места возможного связывания низкомолекулярных соединений в белке E (рис. 23), которые бы предотвращали структурную перестройку из димера в тример. С помощью докинга в карман, обнаруженный на поверхности ДIII белка E ДНГВ, было отобрано соединение **49** с EC<sub>50</sub> порядка 4 мкМ. Предположение о его связывании именно с белком E не было доказано экспериментально.



**Рисунок 23.** Гомодимер sE. Желтым и фиолетовым обозначены возможные сайты связывания низкомолекулярных соединений, найденные в работе [216]

Таким образом, на основе проведенного анализа литературных данных, можно сделать заключение, что поиск ингибиторов слияния, связывающихся в кармане белка Е флавивирусов, является весьма перспективным направлением в разработке антифлавивирусных препаратов. Показано, что действующие таким образом соединения способны оказывать значительный ингибиторный эффект на репродукцию флавивирусов и обладать широким спектром активности по отношению к различным флавивирусам, переносимым комарами. Однако для идентифицированных соединений характерен ряд проблем, касающихся растворимости и фармакокинетических свойств, что свидетельствует о необходимости продолжения работы в поиске и разработке ингибиторов слияния. Для переносимых клещами на данный момент не описано ни одного соединения с подобным механизмом действия.

# МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## ГЛАВА 1. МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

### 1.1. Структуры для моделирования

Аминокислотные последовательности шаблонов (sE ДНГВ-2 и ВКЭ) были извлечены из файлов белковых структур PDB [217, 218] (табл. 4). Аминокислотные последовательности моделируемых белков E штамма Абсеттаров ВКЭ и штамма Повассан24 вируса Повассан (ПОВ) были получены из базы GenBank (табл. 4).

**Таблица 4.** Коды доступа шаблонных и моделируемых белков E в RCSB PDB и GenBank.

	ДНГВ-2	ДНГВ-2 (в комплексе с $\beta$ -OG)	ВКЭ штамм Найдорфл	ВКЭ штамм Абсеттаров	ПОВ штамм Повассан24
Код доступа в PDB	1OAN	1OKE	1SVB	–	–
Код доступа в базе GenBank	FJ158608		NC001672	KU885457	NC003687

### 1.2. Выравнивание аминокислотных последовательностей

На первой стадии было построено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей шаблонных и моделируемых белков. Для построения выравнивания была использована программа ClustalX2 [219] (матрица замен BLOSUM62 [220], штрафные значения: 11 для открытия делеции, 1 для продолжения).

### 1.3. Моделирование структур белков E ВКЭ и ПОВ по гомологии

Координаты атомов димерного шаблона для структуры 1SVB были восстановлены по данным кристаллографической симметрии с помощью CCP4mg [221]. Исходную субъединицу димера и соответствующие субъединицы моделей в дальнейшем мы будем называть субъединицей А, вторую субъединицу, координаты атомов которой были восстановлены по симметрии, и соответствующие субъединицы моделей будем называть субъединицей В.

Модель димера белка E ВКЭ штамма Абсеттаров в “закрытой” форме была построена в программном комплексе Sybyl-X1.3 [222] путем замены в обеих цепях структуры 1SVB остатка Ile167 на Val с сохранением конформаций боковых цепей всех остальных остатков.

Процедура моделирования по гомологии состояла из следующих стадий. Сначала для моделирования структуры димера белка E ПОВ в “закрытой” форме в качестве шаблона использовались структуры 1OAN и 1SVB. С использованием модуля *automodel* программы Modeller9.10 [223] проводилось построение 50 моделей. Каждая модель оптимизировалась методом моделирования отжига (набор параметров приведен в таблице 5). Достоверность укладки белка в моделях проверялась в программе Prosa2003 [224]. Основными критериями выбора наилучшей модели в рамках каждой серии были качество карты Рамачандрана, полученной с помощью программы Procheck [225], и минимум значения оценочной функции

DOPE (Discrete Optimized Protein Energy [226]). Данный потенциал рассчитывается суммированием значений псевдоэнергетической функции от всех межатомных расстояний в белке. Параметризация этой функции базируется на частотах встречаемости атомов заданных типов на определенном расстоянии в известных структурах белков. Геометрию наилучшей модели из каждой серии в дальнейшем оптимизировали с использованием программного комплекса Sybyl-X1.3. Проводилось 200 шагов минимизации методом Пауэлла в силовом поле Tripos [227], после добавления атомов водорода следовало 200 шагов минимизации с использованием силового поля AMBER ff02 [228].

**Таблица 5. Параметры протокола моделирования по гомологии.**

Силовое поле	CHARMM
Алгоритм численного интегрирования	метод Верле
Интервал интегрирования	4 фс
Нагревание, T °C	150, 250, 400, 700, 1000
Режим нагревания	200 итераций, 20 шагов оптимизации
Охлаждение, T °C	1000, 800, 600, 500, 400, 300
Режим охлаждения	600 итераций, 200 шагов оптимизации

В дальнейшем наилучшая модель “закрытой” формы белка Е ПОВ была использована для построения модели структуры соответствующей “открытой” формы. Для этого из указанной структуры исключали регион *kl*-шпильки (а.о. 273 – 287) и проводили его моделирование по гомологии, используя в качестве шаблона белок Е вируса денге в комплексе с  $\beta$ -OG (1OKE). Использовался тот же алгоритм моделирования, валидации и оптимизации моделей, что и в случае построения структур “закрытой” формы белка ПОВ. “Открытая” форма модели белка Е ВКЭ была построена аналогично.

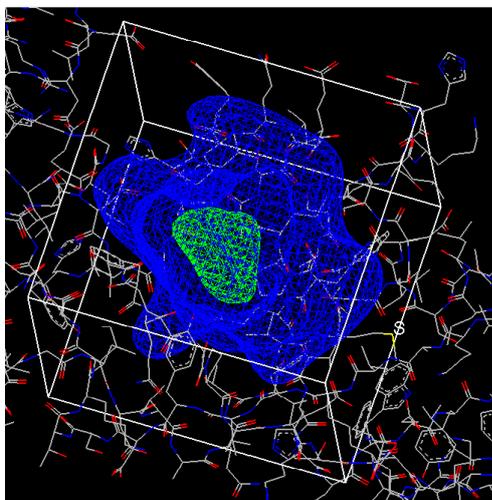
## 1.4. Виртуальный скрининг

### 1.4.1. Подготовка структур соединений и белков

В работе была использована библиотека низкомолекулярных органических соединений Химэкс Восточноукраинского национального университета им. Владимира Даля (Луганск, Украина) и библиотека 4-фтортетрагидрохиназолин N-оксидов, синтезированная сотрудниками Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова Авериной Е. Б. и Седенковой К. Н.

Стандартизация структур химических соединений в базах путем удаления явно заданных атомов водорода и описания структур с помощью формул Кекуле проводилась в модуле Standardizer программы ChemAxon [229].

Добавление атомов водорода проводилась в программе OpenEye Vabel 3.3 [230]. Генерирование оптимальных таутомерных форм и состояний протонирования производилось в OpenEye QuacPac 1.5.0 [231]



**Рисунок 24.** Бокс, генерируемый программой Fred-receptor вокруг активного сайта. Внешний контур – синяя поверхность, внутренний – зеленая.

будет учитываться как жесткая. Генерация энантиомеров для соединений с незаданной конфигурацией стереоцентров и генерация исчерпывающего набора конформаций для каждой структуры соединений на более ранних этапах (в работах [234, 235]) осуществлялась с помощью программы OMEGA 2.4.3, далее – в версии программы 2.4.6 [236, 237]. Использовалось силовое поле MMFF94s без электростатического потенциала [238]. Максимальное количество конформеров задавалось равным 5000, минимальное среднеквадратичное отклонение координат атомов для признания конформаций различными составляло 0,5 Å.

Подготовка структуры кармана “открытых” форм белков E для докинга проводилась в программе Fred-receptor, которая позволяет определить размер полости для докинга, а также рассчитать электростатические и стерические поля, сформировать ее внешний и внутренний контур (рис. 24). Это осуществляется с помощью создания решетки, окружающей активный центр, в узлах которой рассчитываются энергии ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий с пробными атомами.

#### 1.4.2. Процедура докинга

На первой стадии докинга находятся все возможные ориентации (позы) лиганда в активном сайте путем поступательного и вращательного движения каждого конформера. Далее удаляются позы, при которых центры всех неводородных атомов лиганда не вмещаются во внешний контур рецептора, и те, у которых ни один тяжелый атом не попадает во

внутренний контур (рис. 24). Оставшимся позам приписывается оценка функции Chemgauss3 [239]. 1000 первых поз с наилучшими оценками сохраняются, остальные отбрасываются. Далее проводится оптимизация положения оставшихся поз в полости с помощью функции Chemgauss3. Формирование хит-листов проводится в два этапа: на первом отбирается лучшая поза каждого соединения. Для этого все позы независимо оцениваются функциями Shapegauss, Chemgauss3 [239], Chemscore, OEChemscore [240], PLP [241], Screenscore [242] или консенсусом функций PLP, Chemgauss3 и OEChemscore (вес каждой функции принимался равным 1). При оценке консенсусом функций каждой позе приписывается оценка, эквивалентная сумме номеров в хит-листах соответствующих функций. На втором этапе лучшая поза каждого соединения участвует в составлении конечного хит-листа каждой функции или консенсуса. Для этого все соединения ранжируют по оценкам их лучших поз, приписанным каждой функцией.

На последнем этапе проводилась визуальная оценка лиганд-белковых комплексов на предмет формирования нежелательных взаимодействий (близкое расположение двух доноров или акцепторов водородных связей).

Визуальная оценка результатов докинга осуществлялась в программе VIDA 4.2.1 [243].

#### *1.4.3. Оценочные функции*

**Shapegauss** (sg) и **Chemgauss3** (cg) – оценочные функции, основанные на представлении всех атомов в виде гладких Гауссовых функций. Парный потенциал между атомами лиганда и белка направлен на максимизацию площади поверхностного контакта и минимизацию объемного перекрытия (т.е. наиболее благоприятна ситуация, когда атомы соприкасаются, но не перекрываются). Chemgauss3 (cg) основана на представлении только неводородных атомов в виде гауссовых функций. Отличие cg от sg состоит в том, что учитывается химическая природа лиганда, оценочная функция учитывает вклад стэкинг-взаимодействия и водородной связи, но не учитывает их направление [239].

**Chemscore** (cs) – эмпирическая оценочная функция, которая представляется в виде суммы членов, описывающих водородные связи и стерические взаимодействия. Вклад водородной связи учитывает как ее направление, так и расстояние между донором и акцептором. Функция также назначает штрафы за уменьшение энтропии при потере связью вращательной степени свободы в случае связывания лиганда с белком. Она также включает член, описывающий взаимодействия липофильных групп [240]. OEChemscore (oecs) почти полностью идентична функции Chemscore, отличие составляет отсутствие члена, описывающего вращательные степени свободы связей.

**PLP** (Piecewise Linear Potential) – эмпирическая функция, оценивающая расстояние между центрами неводородных атомов (т.е. положение водородных атомов не имеет значения, в отличие от их наличия или отсутствия, которое может влиять на присвоение атому типа) [241].

**Screenscore** (ss) представляет собой линейную комбинацию двух оценочных функций (PLP и оценочная функция FlexX, построенная аналогично Chemscore, но параметризованная на меньшем числе структур). Также добавлен энтропийный член, пропорциональный числу связей, склонных к вращению [242].

### 1.5. Моделирование молекулярной динамики

Моделирование молекулярной динамики (МД) моделей белков E ПОВ и их комплексов с молекулами ингибитора было проведено в комплексе программ AMBER 11 [244]. Для аминокислотных остатков было использовано силовое поле AMBER ff99SB [245], для низкомолекулярных соединений – поле GAFF [246]. Заряды атомов белка были автоматически заданы модулем LeAP, для лиганда заряды атомов были рассчитаны в модуле Antechamber по схеме AM1-BCC.

Оценка значений  $pK_a$  боковых цепей остатков гистидина была произведена с помощью программ PROPKA [247], H++ [245] и MCCE [248, 249]. Разный уровень pH моделировался только с помощью различного уровня протонирования боковых цепей остатков гистидина: в нейтральном pH только атом N $\epsilon$  был связан с протоном (условное обозначение остатка в AMBER - HIE), при низком pH гистидины были протонированы по обоим атомам имидазольного кольца (условное обозначение остатка в AMBER - HIP).

Перед проведением моделирования МД энергия системы была минимизирована: 1000 итераций методом скорейшего спуска и 500 итераций по методу сопряжённых градиентов.

Шаг интегрирования МД составлял 2 фс. Алгоритм SHAKE [250] был применён для обработки связей с атомами водорода с целью сокращения времени расчетов. Эффекты растворителя учитывались в неявном виде с применением обобщенной модели растворителя Борна [251]. Температура системы поддерживалась равной 300 К с использованием Ланжевенского термостата (частота столкновений 1 пс<sup>-1</sup>). Отсечка ван-дер-ваальсовых взаимодействий составляла 12 Å. Запись данных производилась каждые 500 шагов, число итераций составило 15 млн., длина траекторий – 30 нс. Расчеты проводились с использованием суперкомпьютеров iSCALARE (Московский физико-технический институт) и “Ломоносов” (МГУ им. М. В. Ломоносова).

Анализ траекторий проводился в модуле ptraj пакета AMBER 11 и программе VMD [252]. Визуальный анализ траекторий проводился в программе VMD.

## ГЛАВА 2. ВИРУСОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Клетки и вирусы

#### 2.1.1. Культуры клеток

Перевиваемую культуру клеток почек эмбриона свиньи версенезированную (СПЭВ) поддерживали при температуре 37 °С по ранее описанной методике [253]. В качестве среды для роста клеток использовалась смесь среды 199 на растворе Хенкса и среды 199 на растворе Эрла (2:1) (ФГУП ПИПВЭ им. М.П. Чумакова), содержащая 5% сыворотки крупного рогатого скота (Биолот). Клетки СПЭВ растили до образования монослоя на 24- или 96-луночных планшетах (Corning) 72 – 96 ч. Работу по культивированию клеток СПЭВ проводила н.с. ФГБНУ ИПВЭ им. М.П. Чумакова Ю. В. Рогова.

Перевиваемую культуру клеток рабдомиосаркомы человека (RD) поддерживали при температуре 36,5°С. В качестве среды роста клеток использовалась среда Игла MEM с двойным набором витаминов и аминокислот (2×MEM, ФГУП ПИПВЭ им. М.П. Чумакова), содержащая 5% фетальной телячьей сыворотки (ФТС, Gibco). Всю работу по культивированию клеток RD проводила с.н.с. ФГБНУ ИПВЭ им. М.П. Чумакова А. М. Мустардина.

#### 2.1.2. Вирусы

В работе использовали штаммы переносимых клещами flavivirusов ВКЭ и Повассан из коллекции лаборатории биологии арбовирусов и полиовируса из коллекции лаборатории полиомиелита и других ЭВИ, описанные в таблице 6. Полиовирус хранили в виде культуральной жидкости (КЖ) заражённых клеток RD, остальные – в виде КЖ СПЭВ, содержащей 10% сорбита, при температуре -70 °С.

**Таблица 6. Характеристика использованных в работе вирусов.**

Вирус	Штамм	Район и год выделения	Происхождение	Пассажи*	Код в GenBank	Подтип
ВКЭ	Абсетгаров	Ленинградская область, 1951	кровь больного КЭ	МхМ5V1	KU885457	Европейский
ВКЭ	ЭК-328	Эстония, 1972	<i>I. persulcatus</i>	М6С1М2С1-2	DQ486861	Сибирский
ВКЭ	256	Белоруссия, до 1968	<i>I. ricinus</i>	М>20С1	AF091014	Европейский
ВКЭ	Лесопарк11	Новосибирск, 1986	<i>I. persulcatus</i>	МхМ4С1-2	GU121966	Сибирский
ВКЭ	ДВ 936к	Приморский край, 1975	<i>I. persulcatus</i>	5 МхС1-2	GU125722	Дальне-восточный
ВКЭ	205КГГ	Хабаровский край, 1973	<i>I. persulcatus</i>	М>20С1	GU121964	Дальне-восточный
ВКЭ	Васильченко	Новосибирская обл., 1969	от больного КЭ	хМ2V1	AF069066	Сибирский
ВКЭ	ТВ08-Т2546	Респ. Тыва, 2008	<i>I. persulcatus</i>	М2С1	AMZ80006	Сибирский
ВКЭ	Софьин	Приморский край, 1937	Мозг больного КЭ, клонирование	Мх и Р2-5 после клонирования	GU121963	Дальне-восточный
ПОВ	Повассан24	Приморский край, 1975	<i>I. persulcatus</i>	М4V1	KU160627	-
Полио-вирус	Сэбин1	-	Референтный штамм, получен от NIBSC, UK	МхRхR3	V01150	-

\* М – пассажи через мозг белых мышей; V – пассажи в клетках Vero; С – пассаж в клетках СПЭВ, R – пассаж в клетках RD, P – пассаж в культуре клеток почки сирийского хомячка.

## **2.2. Определение титра ВКЭ**

Серию 10-кратных разведений вирусной суспензии в среде 199 на растворе Эрла в объеме 100 мкл добавляли к клеткам в 24-луночных планшетах. Инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение часа при 37 °С, затем клетки покрывали 1 мл раствора 1,26% метилцеллюлозы (Sigma), приготовленной на средах 199 на растворе Хенкса и 199 на растворе Эрла (2:1), содержащей 2% ФТС. Через 6 суток покрытие удаляли, клеточный монослой, промытый натрий-фосфатным буфером (НФБ, Sigma), фиксировали 96% этанолом и окрашивали 0,4% раствором генцианового фиолетового в 10%-ном этиловом спирте. Далее подсчитывали количество бляшек и рассчитывали титр вируса. Титр вируса представляли в log<sub>10</sub>БОЕ/мл.

## **2.3. Приготовление растворов соединений**

Для исследования токсичности стоковые растворы исследуемых соединений с концентрацией 50 или 25 мМ готовились путем растворения навесок веществ в требуемом объеме ДМСО (Sigma). Из этих растворов готовились рабочие растворы в ДМСО с концентрацией 10 или 5 мМ для определения противовирусной активности соединений. Растворы хранили при -20 °С.

## **2.4. Определение цитотоксичности**

Для определения концентрации, приводящей к гибели 50% клеток (CC<sub>50</sub>), использовали следующий тест на цитотоксичность.

Серии двукратных разведений растворов исследуемых веществ (от 500 до 1,2 мкМ) и ДМСО в качестве контроля в среде 199 на растворе Эрла добавляли к полному трехдневному монослою клеток СПЭВ в 96-луночных панелях и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С. Через 24 часа (острая токсичность) или 7 суток (хроническая токсичность) среду удаляли, монослой трижды промывали НФБ. К монослою добавляли 100 мкл 0,001% раствора нейтрального красного в НФБ и инкубировали 30 мин. в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С, чтобы вакуоли живых клеток заполнились красителем. После этого краситель удаляли, монослой трижды промывали НФБ и фиксировали 100 мкл 96% этанола, при этом краситель, захваченный клетками, переходил в спирт. Результаты учитывали фотокolorиметрическим методом: светопоглощение спиртовых растворов измеряли при 450 нм на Thermo-labsystems Multiskan FC. Определение значений CC<sub>50</sub> проводили по методу Рида и Менча [254].

## **2.5. Определение противовирусной активности соединений**

### *2.5.1. Определение противовирусной активности методом ингибирования бляшек или фокусов*

Для определения концентрации  $EC_{50}$ , необходимой для ингибирования образования 50% бляшек или фокусов ВКЭ или ПОВ использовали следующий подход.

К серии двукратных разведений растворов исследуемых веществ (концентрации от 10 или 50 мкМ) и ДМСО в качестве контроля в среде 199 на растворе Эрла, добавляли равный объем суспензии вируса в среде 199 на растворе Эрла, содержащей порядка 20 БОЕ/лунку или ФОЕ/лунку. Вирус и вещество инкубировали при 37 °С в  $CO_2$ -инкубаторе 1 час, после чего добавляли по 100 мкл к трехдневному монослою клеток СПЭВ в 24-луночных планшетах. Инкубировали 1 час при 37 °С в  $CO_2$ -инкубаторе для адсорбции вируса на клетках. Далее клетки покрывали раствором 0,85% [234, 235, 255] или 1,26% метилцеллюлозы (Sigma), приготовленной на средах 199 на растворе Хенкса и 199 на растворе Эрла (2:1), содержащей 2% ФТС.

Для учета количества фокусов покрытие удаляли через 4 суток, монослой промывали НФБ, фиксировали 96% этанолом и проводили иммуноокрашивание заражённых клеток: добавляли 200 мкл разведения первичных поликлональных мышинных антител к белку Е (VR79, ATCC) в среде 199 на растворе Эрла (1:1500) в каждую лунку, инкубировали 15 часов при 4 °С, промывали НФБ и добавляли 200 мкл раствора вторичных антител к иммуноглобулину IgG мыши, меченных пероксидазой хрена (Promega) в среде 199 на растворе Эрла (1:2500) и инкубировали в  $CO_2$ -инкубаторе при 37 °С 2 ч. Далее клетки промывали НФБ, добавляли 100 мкл раствора красителя (5 мг диаминобензидинтетрахлорида (Sigma), 5 мкл 30%  $H_2O_2$  в 10 мл НФБ), инкубировали в темноте при комнатной температуре до появления чётко видимых фокусов, стряхивали краситель с панелей, промывали их водой и учитывали фокусы.

В случае учета бляшек покрытие удаляли через 6 суток. Монослой, промытый НФБ и зафиксированный 96% этанолом, окрашивали 0,4% раствором генцианового фиолетового.

Расчет  $EC_{50}$  проводили по методу Рида и Менча [254].

### *2.5.2. Эксперименты по изменению порядка добавления веществ и заражения клеток*

Для проведения экспериментов по изменению порядка добавления веществ и заражения (time-of-addition) с целью определения стадии, на которой действуют ингибиторы, стандартный протокол (п. 2.5.1) был модифицирован:

1) Разведения веществ и ДМСО в качестве контроля в объеме 100 мкл добавляли к монослою клеток СПЭВ и инкубировали 1 час при 37 °С. Далее монослой дважды промывали средой 199 на растворе Эрла и добавляли 100 мкл суспензии вируса, содержащего около 20

ФОЕ/лунку. В качестве отрицательного контроля к клеткам добавляли аналогичный объем среды 199 на растворе Эрла.

2) Суспензию вируса инкубировали с клетками СПЭВ в течение 1 часа при 37°C, клетки отрицательного контроля инкубировали с равным объемом среды 199 на растворе Эрла. После двукратного промывания средой к клеткам добавляли разведения веществ или ДМСО. К клеткам отрицательного контроля добавляли тот же объем разведений соединений. После инкубации в течение 1 час при 37°C, клетки дважды промывали средой.

Далее, аналогично п. 2.5.1 клетки покрывали раствором 0,85% метилцеллюлозы, через 4 дня монослой промывали НФБ, фиксировали 96% этанолом, проводили иммуноокрашивание заражённых клеток и подсчет фокусов.

#### *2.5.3. Определение падения титра ВКЭ в присутствии ингибитора*

Постановка опыта была аналогична пункту 2.2. Перед добавлением к клеткам разведения вирусной суспензии смешивали с равным объемом раствора соединения для получения концентрации последнего 50 мкМ или с соответствующим объемом ДМСО в качестве контроля и инкубировали в течение 1 час при 37°C.

#### *2.5.4. Определение активности соединений в отношении полиовируса*

Готовили серии двукратных разведений растворов исследуемых веществ (от 50 до 6,25 мкМ) и ДМСО в качестве контроля в среде 2×МЕМ. Растворы добавляли к равному объему суспензии полиовируса, содержащего около 100 TCID<sub>50</sub> (50% tissue cell infective dose). Инкубировали 1 час при 36°C, после чего добавляли 100 мкл суспензии клеток RD (~10<sup>5</sup> клеток) в среде 2×МЕМ, содержащей 5% ФТС.

Для определения точной дозы полиовируса использовался метод обратного титрования.

После 5-дневной инкубации при 37 °C визуально оценивалось цитопатическое действие. Титр вируса рассчитывался по формуле Кербера [256].

## **2.6. Определение количеств РНК ВКЭ методом ПЦР в реальном времени**

### *2.6.1. Выделение РНК*

К 125 мкл КЖ инфицированных клеток добавляли 4 мкл РНК СПЭВ (250 нг/мкл), любезно предоставленной Козловской Л. И., 2 мкл суспензии полиовируса штамма Сэбин 1 типа, использовавшегося в качестве внутреннего контроля. РНК выделяли с помощью TRI Reagent LS (Sigma) согласно инструкции производителя. Осадок сушили в термостате при 37 °C, растворяли в 10 мкл тридистиллированной воды (ФГУП ПИПВЭ им. М.П. Чумакова ) и сразу использовали для обратной транскрипции.

### 2.6.2. Обратная транскрипция

Для обратной транскрипции использовали специфические олигонуклеотиды (праймеры), приведенные в таблице 7, обратную транскриптазу M-MLV и буфер к ней (Promega). Обратную транскрипцию проводили согласно методике, прилагаемой к обратной транскриптазе M-MLV.

**Таблица 7.** Последовательности использованных в работе праймеров.

Вирус	Название	Нуклеотидная последовательность	Положение в нуклеотидной последовательности
ВКЭ ЭК-328	GTB1R	CCATTCCGGCTCTGAACTTG	8056–8037
Остальные штаммы ВКЭ	Pow/TBE 3'	AGCGGGTGTTTTTCCGAGTC	10908–10927
Полиовирус	PVR1	CGAACGTGATCCTGAGTGTT	7209–7228

### 2.6.3. Полимеразная цепная реакция с детекцией в реальном времени (ПЦР-РВ)

ПЦР-РВ проводили на приборе DNAEngine фирмы BioRad с использованием Taq-полимеразы и олигонуклеотидов (праймеров), приведенных в Таблице 8 и набора реагентов для ПЦР-РВ (Синтол).

К 2,5 мкл кДНК добавляли 2,5 мкл 10x буфера для ПЦР, 2,5 мкл 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 мкл 2,5 mM смеси dNTP, по 2 мкл прямого и обратного праймеров (5 пмоль/мкл), 1 мкл зонда (5 пмоль/мкл), 0,25 мкл рекомбинантной Taq-полимеразы и 9,75 мкл тридистиллированной воды.

**Таблица 8.** Последовательности использованных в работе праймеров.

Вирус	Название	Нуклеотидная последовательность	Положение в нуклеотидной последовательности
ВКЭ	F-TBE1	GGGCGGTTCTTGTTCTCC	10840–10857
	R-TBE1	ACACATCACCTCCTTGTCAGACT	10885–10907
	TBE-зонд	FAM-TGAGCCACCATCACCCAGACACA-BHQ-1	10859–10881
Полиовирус	PVR1	CGAACGTGATCCTGAGTGTT	7209–7228
	PVL1	GGCAGACGAGAAATACCCAT	7121–7140
	PVP1-зонд	R6G-TTGATTCATGAATTCCTTCATTG GCA-BHQ-1	7185–7159

Стандартные кривые были построены на основе серии разведений РНК полиовируса и ВКЭ, очищенных и сконцентрированных из культуральной жидкости зараженных клеток с помощью центрифугирования в градиенте сахарозы [257].

## **2.7. Определение общего количества белка Е методом иммуноферментного анализа (ИФА)**

Определение содержания белка Е в вирусных образцах методом иммуноферментного анализа (ИФА) проводили в соответствии с [258]. Для получения препарата стандарта S1 белка Е ВКЭ штамма Софьин размножали в культуре клеток СПЭВ до первых признаков цитопатического действия (ЦПД). Вирусосодержащую КЖ осветляли центрифугированием, осадок суспендировали в среде 199 на растворе Эрла, полученную суспензию хранили при -20 °С до использования.

К пробе стандарта S1 белка Е ВКЭ добавляли 2×Sample буфер (1:1) и проводили электрофорез в 2%-ном агарозном геле (Fermentas) в денатурирующих условиях одновременно с серией растворов двукратных разведений белка бычьего сывороточного альбумина (БСА, Combithek) с массой от 1 до 0,01 мг. Гель фиксировали в растворе, содержащем 7% уксусной кислоты и 25% этанола, окрашивали кумасси ярко-синим. Полосы окрашенных белков денситометрировали в программе One-Dscan (DSP Inc., США). Строили калибровочную кривую зависимости оптической плотности полос от массы БСА, по ней определяли количества белка Е (мол. масса 53 кДа) в стандартной пробе S1.

Измеряли оптическую плотность серии растворов двукратных разведений стандарта белка Е ВКЭ S1 в ИФА с помощью набора Вектор-Бест для выявления антигена ВКЭ D1154 согласно инструкции производителя. Строили стандартную кривую зависимости оптической плотности растворов от концентрации белка Е.

ВКЭ штамма ЭК-328 размножали в культуре клеток СПЭВ до первых признаков ЦПД, вирусосодержащую КЖ осветляли центрифугированием. Осадок суспендировали в среде 199 на растворе Эрла, концентрацию белка в полученных пробах определяли по результатам ИФА по калибровочной кривой S1, готовили аликвоты полученной суспензии и хранили при -70 °С. В дальнейшем полученные пробы использовались в качестве стандартов S2 для определения концентраций белка Е в исследуемых препаратах с неизвестным содержанием белка Е. Для этого определяли оптическую плотность растворов исследуемых препаратов с неизвестным содержанием белка Е и серии двукратных разведений образца стандарта S2, иммуноокрашенных с помощью набора Вектор-Бест для выявления антигена ВКЭ в ИФА. Строили стандартную кривую зависимости оптической плотности растворов от концентрации белка Е в разведениях S2 и по ней определяли концентрацию белка Е в исследуемых образцах.

# РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

## ГЛАВА 1. МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУР БЕЛКОВ sE И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДА ДОКИНГА

Ввиду отсутствия рентгеноструктурных данных об “открытых” формах белка sE ВКЭ и ПОВ, необходимых для докинга, в данной работе было предпринято моделирование этих структур по гомологии и последующий виртуальный скрининг библиотек низкомолекулярных гетероциклических соединений методом докинга в карманы полученных моделей.

### 1.1. Выравнивание последовательностей

В базе белковых структур PDB имеются кристаллографические данные об атомной структуре только “закрытой” формы эктодомена белка E вируса клещевого энцефалита, код доступа 1SVB (табл. 3). Для вируса Повассан они отсутствуют вовсе. Рентгеноструктурные данные об “открытой” форме белка E, пригодной для докинга, имеются только для ДНГВ-2 (код доступа 1OKE). Ввиду этого было принято решение о построении моделей открытых форм белков E вирусов клещевого энцефалита и Повассан по гомологии с открытой формой белка E ДНГВ-2.

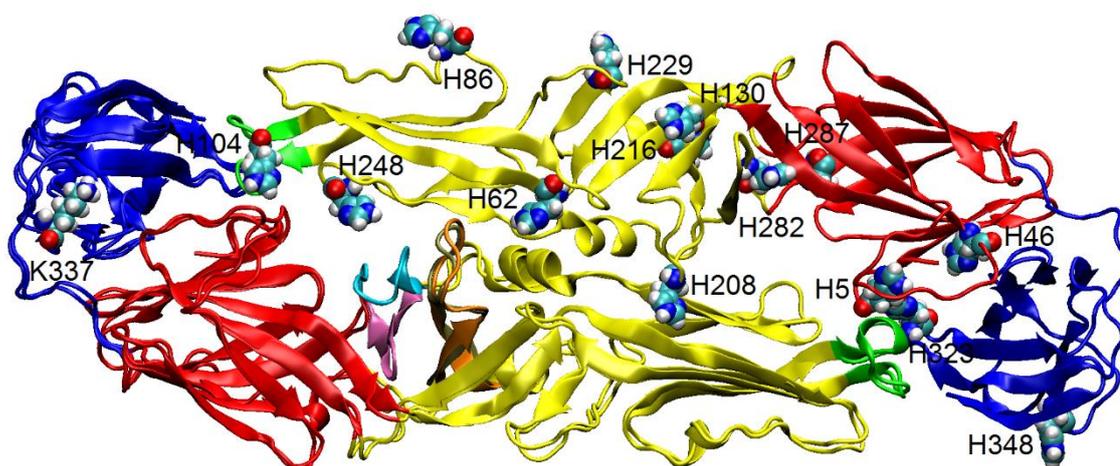
В аминокислотных последовательностях белков sE ВКЭ, ПОВ и ДНГВ содержится, соответственно, 395, 396 и 394 аминокислотных остатка. Выравнивание последовательностей приведено на рис. 25. Идентичность аминокислотных последовательностей варьируется от 30% между ДНГВ и ПОВ до 63% между ВКЭ и ПОВ, для ДНГВ и ВКЭ эта величина составляет 36%. Идентичность последовательностей более 20% позволяет использовать метод моделирования по гомологии. Сходство структур sE флавивирусов, доступных в PDB, позволяет предположить, что и структура белка E ПОВ будет схожа с вышеуказанными ввиду большей идентичности аминокислотных последовательностей с ВКЭ. Использование в качестве шаблона лишь структуры 1SVB для моделирования структуры димера sE ПОВ не выглядит оптимальным, так как в структуре 1SVB он лишь восстановлен по симметрии, использование же в качестве дополнительного шаблона структуры 1OAN позволяет лучше смоделировать контакты между субъединицами димера.

Аминокислотная последовательность белка E ВКЭ штамма Абсеттаров отличается от штамма Найдорфл одним остатком (Ile167 у ВКЭ штамма Найдорфл заменен на Val167 у ВКЭ штамма Абсеттаров), поэтому для построения модели белка требуемого штамма было достаточно провести точечную замену остатка.

		<u>A<sub>0</sub></u>	<u>B<sub>0</sub></u>	<u>C<sub>0</sub></u>	<u>D<sub>0</sub></u>	<u>a</u>	<u>b</u>	80			
1SVB		SRCTHLENRD	FVTGTQGTTR	VTLVLELGGC	VTITAEGKPS	MDVWLDAIYQ	ENPAKTREYC	LHAKLSDTKV	AARCPTMGPA		
Absettarov		SRCTHLENRD	FVTGTQGTTR	VTLVLELGGC	VTITAEGKPS	MDVWLDAIYQ	ENPAKTREYC	LHAKLSDTKV	AARCPTMGPA		
Powassan		TRCTHLENRD	FVTGTQGTTR	VSLVLELGGC	VTITAEGKPS	IDVWLEDIFQ	ESPAETREYC	LHAKLNTTKV	EARCPTTGPA		
1OKE		MRCIGISNRD	FVEGVSGGSW	VDIVLEHGSC	VTTMAKNKPT	LDFELIKTEA	KQPATLRKYC	TEAKLTNTTT	ESRCPTQGEF		
		<u>c</u>	<u>d</u>	<u>e</u>	<u>E<sub>0</sub></u>			160			
1SVB		TLAEEHQGGT	VCKRDQSDRG	WGNHCGLFGK	GSIVACVKAA	CEAKKATGH	VYDANKIVYT	VKVEPHTG-D	YVAANETHSG		
Absettarov		TLAEEHQGGT	VCKRDQSDRG	WGNHCGLFGK	GSIVACVKAA	CEAKKATGH	VYDANKIVYT	VKVEPHTG-D	YVAANETHSG		
Powassan		TLPEEHQANM	VCKRDQSDRG	WGNHCGFPGK	GSIVACAKFE	CEEAKKAVGH	VYDSTKITVY	VKVEPHTG-D	YLAANETNSN		
1OKE		TLNEEQDKRF	VCKHSMVDRG	WGNCGLFGK	GGIVTCAMFT	CKKN--MEGK	IVQPENLEYT	VVITPHSGEE	HAVGNDTGRK		
		<u>F<sub>0</sub></u>	<u>G<sub>0</sub></u>	<u>H<sub>0</sub></u>	<u>f</u>	<u>g</u>	<u>αA</u>	<u>h</u>	240		
1SVB		RKTASFTISS	EKTILTMGEY	GDVSLLCRVA	SGVDLAQTVI	LELDKTVEHL	PTAWQVHRDW	FNDLALPWKH	EG---AQNWN		
Absettarov		RKTASFTVSS	EKTILTMGEY	GDVSLLCRVA	SGVDLAQTVI	LELDKTVEHL	PTAWQVHRDW	FNDLALPWKH	EG---AQNWN		
Powassan		RKSAQFTVAS	EKVILRLGDY	GDVSLTCKVA	SGIDVAQTVV	MSLDSSKDHL	PSAWQVHRDW	FEDLALPWKH	KD---NQDWN		
1OKE		GKEVKITPQS	SITEAELTGY	GTVTMECSPP	TGLDFNEMVL	LQMKD-----	-KAWLVHRQW	FLDLPLPWL	GADTQGSNWI		
		<u>i</u>	<u>j</u>	<u>αB</u>	<u>k</u>	<u>l</u>	<u>I<sub>0</sub></u>	<u>A<sub>x</sub></u>	<u>A</u>	320	
1SVB		NAERLVEFGA	PHAVKMDVYN	LGDOTGVLLK	ALAGVPPVAHI	EGTKYHLKSG	HVTCEVGLEK	LKMKGLTYTM	CDKTKFTWKR		
Absettarov		NAERLVEFGA	PHAVKMDVYN	LGDOTGVLLK	ALAGVPPVAHI	EGTKYHLKSG	HVTCEVGLEK	LKMKGLTYTM	CDKTKFTWKR		
Powassan		SVEKLVEFGP	PHAVKMDVFN	LGDOTAVLLK	SLAGVPLASV	EGQKYHLKSG	HVTCFVGLEK	LKLGTTYISM	CDKAKFKWKR		
1OKE		QKETLVTFKN	PHAKKQDVVV	LGSQEGAMHT	ALTGATEIQM	S-SGNLLFTG	HLKCRLRMDK	LQLKGMYSYM	CTG-RFKVVK		
		<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C<sub>x</sub></u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>D<sub>x</sub></u>	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	400
1SVB		APTDSGHDTV	VMEVTFSG-T	KPCRIPVRVAV	AHGSPDVNVA	MLITPNPTIE	NNGGGFIEMQ	LPPGDNIIVY	G----ELSHQ		
Absettarov		APTDSGHDTV	VMEVTFSG-T	KPCRIPVRVAV	AHGSPDVNVA	MLITPNPTIE	NNGGGFIEMQ	LPPGDNIIVY	G----ELSHQ		
Powassan		VPVDSGHDTV	VMEVSYTGS	KPCRIPVRVAV	AHGVPVAVNA	MLITPNPTIE	TNGGGFIEMQ	LPPGDNIIVY	G----DLSQQ		
1OKE		EIAETQHGTI	VIRVQYEGDG	SPCKIPPEIM	DLEKRHLVGR	LITVNPVITE	KDSPVNIEAE	PPFGDSYIII	GVEPGQLKLN		
		<u>G</u>									
1SVB		WFQK									
Absettarov		WFQK									
Powassan		WFQK									
1OKE		WFKK									

**Рисунок 25.** Выравнивание аминокислотных последовательностей шаблонных и моделируемых структур. Красным выделены остатки, относящиеся к первому домену, желтым – ко второму, синим – к третьему, согласно структуре 1SVB. Сверху обозначены элементы вторичной структуры.

Эктодомены E ВКЭ и ПОВ имеют две вставки, отличающие переносимые клещами флавивирусы от флавивирусов, переносимых комарами, в петлях, располагающихся вблизи региона связывания  $\beta$ -OG: вставка из 6 аминокислот (205 – 210) в петле *fg* и единичная вставка остатка 278 в петле *kl*. Делеции по сравнению с sE ДНГВ наблюдаются в шпильках *E<sub>0</sub>F<sub>0</sub>*, *hi* и *FG*. Специфической особенностью sE ПОВ является наличие дополнительного по сравнению с другими флавивирусами, переносимыми клещами, остатка 337 в домене III, типичного для переносимых комарами вирусов, хотя основными переносчиками ПОВ являются клещи. Таким образом, использование двух шаблонов (структур sE ВКЭ и ДНГВ) для моделирования закрытой и открытой формы sE ПОВ вполне обосновано, несмотря на меньшую идентичность аминокислотной последовательности с ДНГВ.



**Рисунок 26.** Модель димера sE ПОВ, окрашенная по доменам: D1 – красный, DII – желтый, DIII – синий. Внизу субъединица A в открытой форме выравнена с субъединицей в закрытой форме: петли kl окрашены в голубой и розовый цвет, соответственно. Отмечены регионы со вставками по сравнению с шаблонами: Lys337, петля kl, петля fg (окрашена в оранжевый в открытой форме sE, в коричневый - в закрытой). Расположение остатков His представлено на верхней субъединице. Регионы петель слияния окрашены в салатовый.

## 1.2. Качество моделей

Как можно предполагать из моделирования по гомологии, sE ПОВ имеет все структурные особенности эктодоменов E флавивирусов. Он обладает тремя четко выраженными доменами, преобладающей вторичной структурой в которых являются  $\beta$ -листы. Форма и размер моделей также очень близки к форме и размерам структур-шаблонов. Среднеквадратичное отклонение координат всех атомов построенных моделей от координат лучшей модели в среднем составляло 1,41 и 0,47 Å для закрытых и открытых форм, соответственно (табл. 9). Так как моделирование выполнялось без ограничений на симметричность субъединиц димера, среднеквадратичное отклонение координат тяжелых атомов между субъединицами оказалось равным 1,14 и 1,36 Å для закрытой и открытой формы, соответственно.

**Таблица 9.** Средние значения среднеквадратичных отклонений координат атомов моделей sE ПОВ от координат лучшей модели.

	$C_{\alpha}$	Атомы основной цепи	Атомы боковых цепей	Все тяжелые атомы
Закрытая форма	$1,15 \pm 0,26$	$1,15 \pm 0,25$	$1,63 \pm 0,19$	$1,41 \pm 0,22$
Открытая форма	$0,17 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,03$	$0,66 \pm 0,09$	$0,47 \pm 0,07$

Стереохимическое качество структур шаблонов и моделей было оценено в программах PROCHECK и ProSa (табл. 10). В модели закрытой формы sE ПОВ не было обнаружено

остатков в неблагоприятных областях карты Рамачандрана; в открытой форме sE в этих областях были обнаружены три остатка – Asp178A и Ala249A,B, конформация последних неблагоприятна и в структуре шаблона 1SVB. Однако эти остатки расположены вдалеке от кармана связывания  $\beta$ -OG, поэтому общее стереохимическое качество моделей было признано удовлетворительным. Это было также подтверждено низкими оценками z-score при анализе укладки структур в ProSa.

**Таблица 10. Стереохимическое качество моделей и шаблонов sE.**

Структура	Число остатков	Благоприятная область <sup>[a]</sup>	Допустимая область <sup>[a]</sup>	Условно допустимая область <sup>[a]</sup>	Неблагоприятная область <sup>[a]</sup>	z-score
1OAN	788	492 (73,2%)	178 (26,5%)	2 (0,3%)	0	-11,39
1OKE	788	554 (82,4%)	114 (17,0%)	4 (0,6%)	0	-11,02
1SVB	790	620 (91,2%)	54 (7,9%)	4 (0,6%)	2 (0,3%)	-11,74
ВКЭ sE						
открытая форма	790	610 (89,7%)	64 (9,4%)	4 (0,6%)	2 (0,3%)	-11,45
ПОВ sE						
закрытая форма	792	636 (92,4%)	47 (6,8%)	5 (0,7%)	0	-11,41
ПОВ sE						
открытая форма	792	577 (83,9%)	102 (14,8%)	6 (0,9%)	3 (0,4%)	-11,12

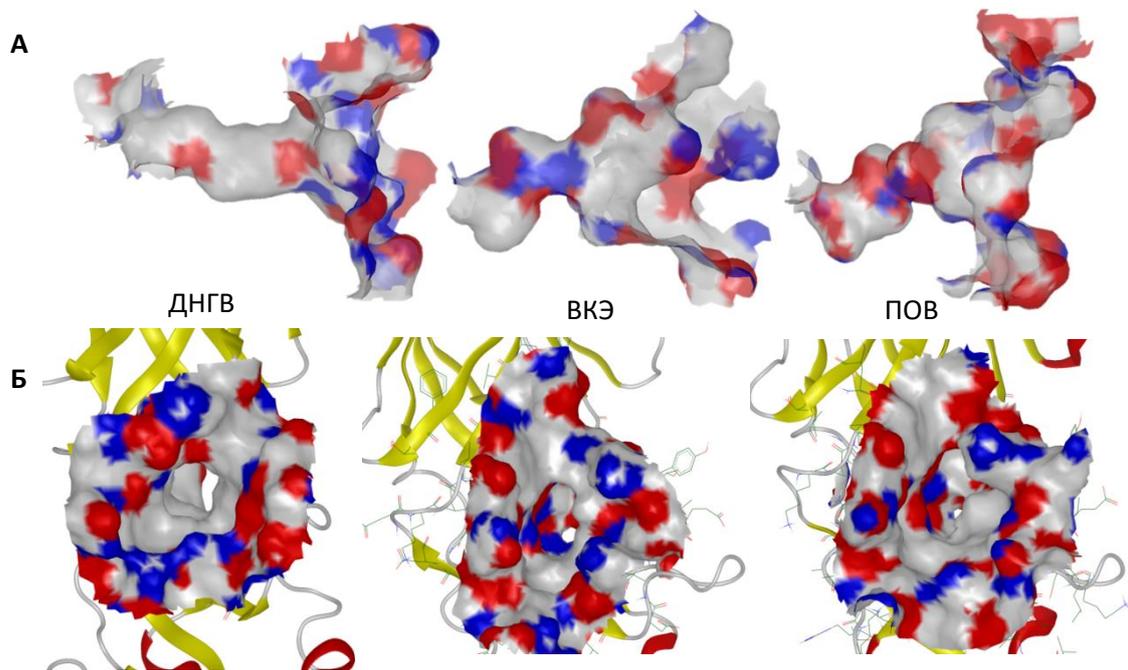
<sup>[a]</sup> Количество неглициновых остатков в указанных областях и их процент от общего числа неглициновых остатков.

### 1.3. Сравнение областей связывания *n*-октил- $\beta$ -D-глюкозида белков E ДНГВ, ВКЭ и ПОВ

На следующем этапе работы был проведен анализ замен (рис. 27) и визуальная оценка кармана связывания  $\beta$ -OG кристаллической структуры 1OKE sE ДНГВ и соответствующих полостей в моделях белков E ВКЭ и ПОВ (рис. 28). Область связывания детергента в структуре 1OKE представляет собой вытянутый гидрофобный канал с широким входом, располагающийся на внешней стороне белка (по отношению к поверхности вириона) у шпилек *kl* и *fg*, и сильно сужающийся у внутренней стороны белка. Соответствующие полости моделей белков sE ВКЭ и ПОВ по форме схожи с сайтом связывания  $\beta$ -OG ДНГВ, но канал в них, в отличие от последнего, практически закрыт со стороны, прилегающей к липидной оболочке вириона, а входы в карман более широкие (рис. 28). Также эти каналы нельзя назвать гидрофобными со всей строгостью, поскольку в них присутствует больше гидрофильных остатков, чем в структуре 1OKE (рис. 27).

	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	128	129	130	131	132	140	142	199	201	204	205	206	211	212	214	273	274	275	278	279	280	282	284	285
ВКЭ	D	A	I	Y	Q	E	N	P	A	K	T	G	H	V	Y	T	K	I	E	K	T	V	T	A	Q	V	A	H	G	T	K	H	K	S
ПОВ	E	D	I	F	Q	E	S	P	A	E	V	G	H	V	Y	V	K	V	S	S	S	K	S	A	Q	L	A	S	G	Q	K	H	K	S
ДНГВ	I	K	T	E	A	K	Q	P	A	T	E	G	K	I	V	T	V	L	Q	D	-	-	K	A	L	E	I	Q	-	S	G	L	F	T
	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	126	127	128	129	130	138	140	198	200	203			204	205	207	269	270	271		274	275	277	279	280

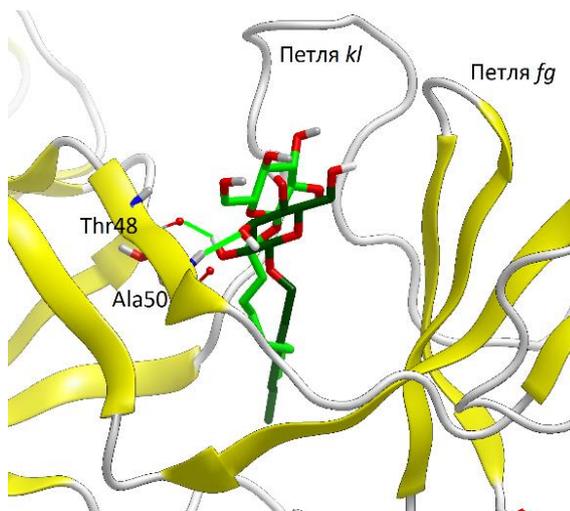
**Рисунок 27.** Аминокислотный состав карманов флавивирусов. Сверху указана нумерация по последовательностям ВКЭ и ПОВ, снизу – соответствующие номера аминокислот. ДНГВ. Красным выделены отрицательно заряженные а.о., голубым – заряженные положительно, желтым – гидрофобные и небольшие неполярные остатки, фиолетовым – полярные.



**Рисунок 28.** Поверхности карманов белков E ДНГВ, ВКЭ и ПОВ. А) Вид на карман сбоку. Б) Вид на карман сверху. Красный цвет соответствует регионам, в которых находятся акцепторы водородной связи, синий соответствует донорам, белый – их отсутствию.

#### 1.4. Валидация метода докинга

Для оценки качества воспроизведения экспериментальных результатов программой докинга был проведен докинг *n*-октил- $\beta$ -D-глюкозида ( $\beta$ -OG) в гидрофобный карман белка E ДНГВ-2, структура 1OKE. Десять поз с наилучшими оценками были сравнены с кристаллической структурой  $\beta$ -OG: усредненное среднеквадратическое отклонение координат тяжелых атомов составляет 3,65 Å. Детергент докируется в ту же область, где находится в кристаллической структуре, но несколько глубже, гликозидный фрагмент развернут таким образом, что возможно образование водородных связей с остатками Thr48 и Ala50 (рис. 30).

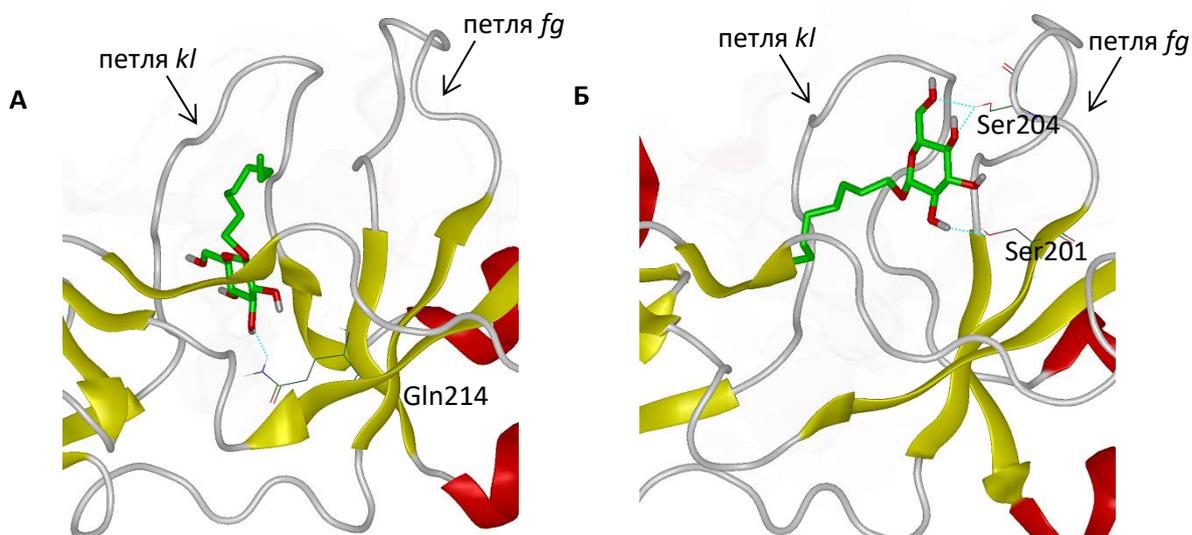


**Рисунок 30.** Расположение  $\beta$ -OG в гидрофобном кармане ДНГВ (салатовый – конформация  $\beta$ -OG из 1OKE, темно-зеленый – конформация, полученная в результате докинга). Водородные связи обозначены салатовым.

По результатам докинга предполагается, что в случае модели белка E ВКЭ детергент располагается так же глубоко, как и в случае ДНГВ, гликозидный фрагмент направлен внутрь кармана, где образует водородную связь с Gln214 (рис. 31). Среди поз, отобранных для ДНГВ, не встречается подобного расположения  $\beta$ -OG, что говорит о большем объеме сайта связывания белка E ВКЭ и способности к направленным взаимодействиям в глубине кармана, не характерным для ДНГВ.

Объемы внешних контуров карманов, использованных для докинга (см. раздел 1.4.2. материалов и методов), для ДНГВ составляет 1361 Å<sup>3</sup>, для ВКЭ – 1620 Å<sup>3</sup>, самая обширная область для докирования у ПОВ – 1779 Å<sup>3</sup>.

В случае белка Е ПОВ гликозидный фрагмент располагается ближе к петле *fg*, октиловый фрагмент направлен в глубь кармана (рис. 31), но не под таким большим углом, как в случае кристаллической структуры 1ОКЕ. Среди альтернативных поз присутствуют и схожие с таковыми для ВКЭ.



**Рисунок 31.** Расположение  $\beta$ -OG в карманах белка Е **А)** ВКЭ и **Б)** ПОВ по результатам докинга.

## ГЛАВА 2. ПРОИЗВОДНЫЕ 1,4-ДИГИДРОПИРИДИНА И 1,3,5-ТИАДИАЗИНА КАК ИНГИБИТОРЫ ВКЭ И ПОВ

Для поиска низкомолекулярных соединений – потенциальных ингибиторов слияния флавивирусов, переносимых клещами, в программе FRED проводился докинг библиотек низкомолекулярных органических гетероциклических соединений в карманы моделей белков sE ВКЭ и ПОВ.

### 2.1. Характеристика базы химических соединений ХимЭкс

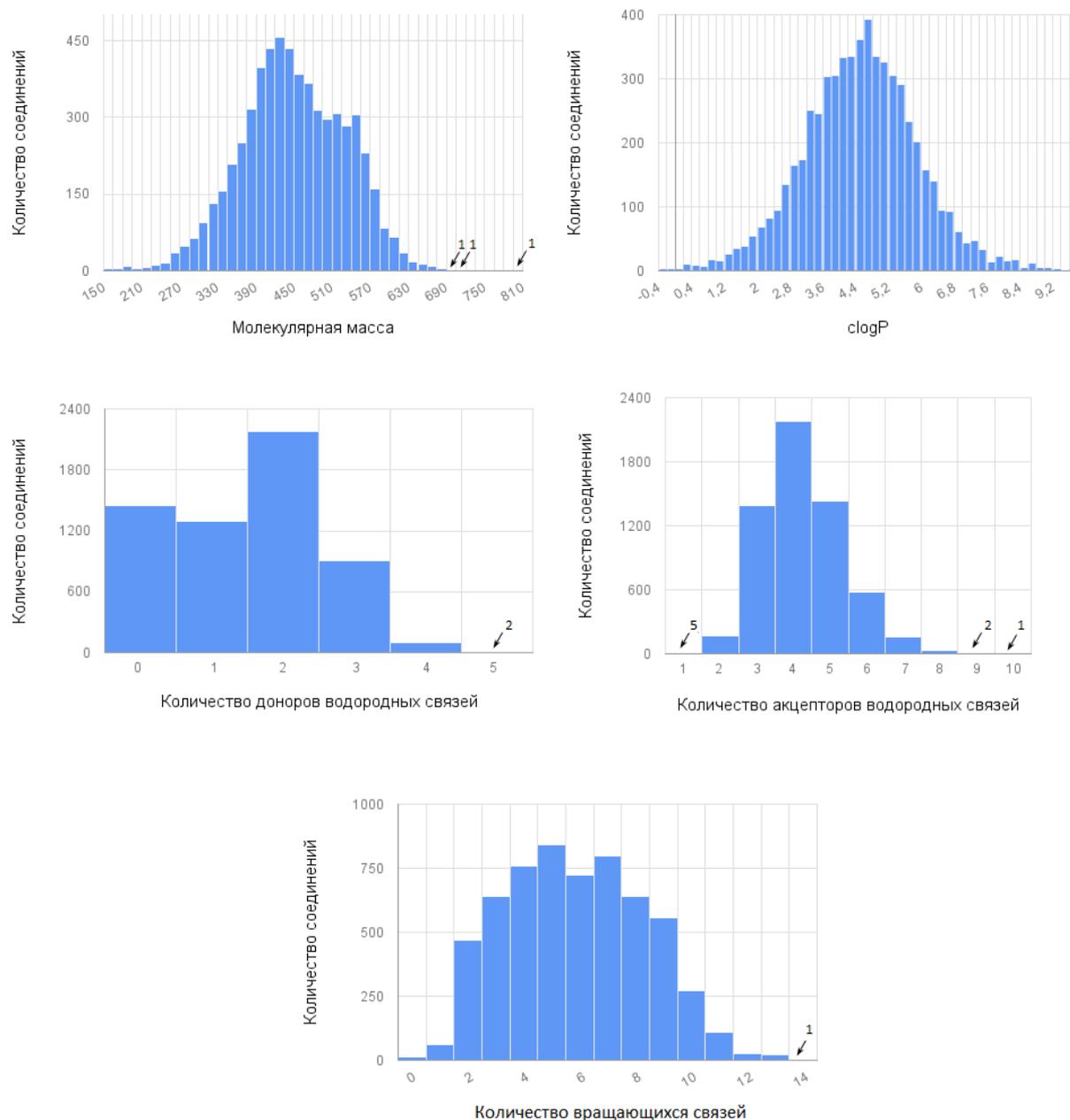
Библиотека низкомолекулярных органических соединений Восточноевропейского национального университета им. Владимира Даля (Луганск, Украина) ХимЭкс, содержит 5886 соединений (по состоянию на 2010 год). Соединения базы – удлиненные гетероциклические молекулы. Характеристики библиотеки представлены на рис. 32 (значения  $\text{slogP}$  рассчитаны в программе Instant JChem [259] по методу, модифицированному из [260]).

Свойства 83% соединений библиотеки удовлетворяют правилу Липински [261], согласно которому перорально доступные лекарства имеют не более одного нарушения следующих условий:

- 1) молекулярная масса  $< 500$ ;
- 2) количество акцепторов водородной связи  $\leq 10$ ;
- 3) количество доноров водородных связей  $\leq 5$ ;
- 4) коэффициент распределения октанол – вода ( $\log P$ )  $\leq 5$ .

### 2.2. Докинг и испытания

Докинг библиотеки ХимЭкс в карман модели белка E ПОВ проводился в программе FRED 2.2.5. Из хит-листов всех 6 оценочных функций, содержащих по 500 соединений, конечный хит-лист формировался путем отбора соединений, вошедших по крайней мере в 3 хит-листа, и соединений с наилучшими оценками каждой функции. Таким образом было отобрано 201 соединение. При последующем визуальном анализе результатов с целью избежать структур, формирующих нежелательные взаимодействия (такие как водородные связи донор – донор или акцептор – акцептор), и отбросить соединения, принадлежащие к плохо представленным в выборке классам, было отобрано 89 соединений (приложение 2), 12 из которых относились к классу 1,3,5-тиадазинов, а остальные – к классу 1,4-дигидропиридинов.



**Рисунок 32.** Диаграммы распределения различных физико-химических свойств соединений, представленных в базе ХимЭкс.

Для отобранных соединений было проведено предварительное определение ингибирующей активности против ВКЭ и ПОВ методом ингибирования образования бляшек или фокусов, соответственно, при концентрации 10 мкМ. Для 7 соединений, подавивших образование 50% и более бляшек или фокусов в этом тесте, было проведено определение значений  $EC_{50}$  против 20 ФОЕ/лунку ВКЭ и 30 БОЕ/лунку ПОВ и определение цитотоксичности [262]<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Данная часть работы была выполнена совместно с зав. лаб. в ФГБНУ ИПВЭ им. М.П. Чумакова к.б.н. Козловской Л. И.

Значения  $CC_{50}$  острой (24 часа) и хронической (7 дней) токсичности по отношению к клеткам культуры СПЭВ для данных соединений оказались выше 10 мкМ, что было расценено приемлемым для первых соединений в классе.

Представители класса 1,4-дигидропиридинов проявили активность против ВКЭ в микромолярном диапазоне. Несмотря на гораздо меньшую представленность 1,3,5-тиадиазинов, они в целом были более активны: **54** и **55** обладают  $EC_{50}$  90 и 70 нМ соответственно, при этом соединения **55** и **56** подавляют репродукцию и ВКЭ, и ПОВ, несмотря на различия в аминокислотном составе белков.

Соединение **55** было представлено в двух формах – чистой и в виде сольвата с ацетоном в мольном соотношении 2:1 (все измерения проводились для этой формы), однако при сравнении их активности против 45 БОЕ ВКЭ Абсеттаров значения  $EC_{50}$  оказались близки для обеих форм:  $2,2 \pm 0,7$  мкМ и  $1,4 \pm 0,4$  мкМ, соответственно.

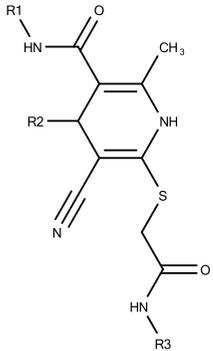
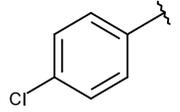
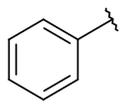
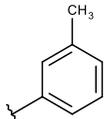
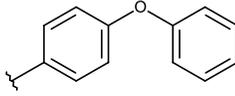
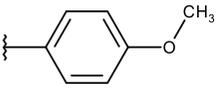
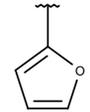
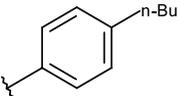
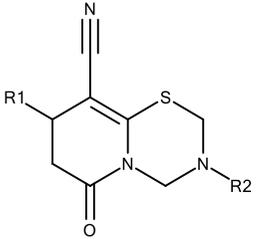
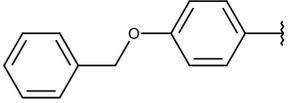
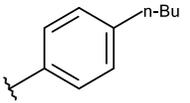
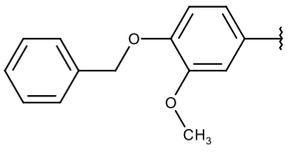
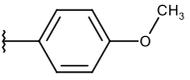
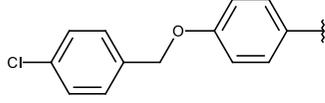
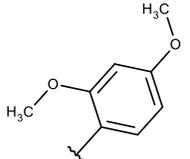
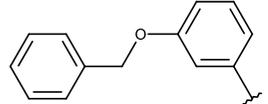
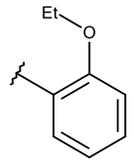
### **2.3. Идентификация стадии инфекционного цикла ПОВ, ассоциированной с ингибированием репродукции соединением 55**

Механизм антифлавивирусной активности соединения **55** был изучен путем оценки влияния порядка добавления соединения и инфицирования клеток на значение  $EC_{50}$ . В дополнение к стандартному тесту по ингибированию роста 50% фокусов, в котором вирус предварительно инкубируется с раствором изучаемого соединения, а затем добавляется к клеткам, были выполнены два дополнительных эксперимента: соединения добавлялись к клеткам за 1 час до через час после инфицирования. В этих модификациях эксперимента соединение не продемонстрировало активности. Дозозависимый эффект наблюдался лишь в стандартном тесте с предварительным инкубированием вируса и вещества перед инфицированием. Следовательно, противовирусное действие является результатом взаимодействия исследованных соединений с поверхностью вириона на стадии его проникновения в клетку, но не на более поздних стадиях или в результате взаимодействия соединений с поверхностью клеток.

### **2.4. Взаимодействие с неродственным безоболочечным вирусом**

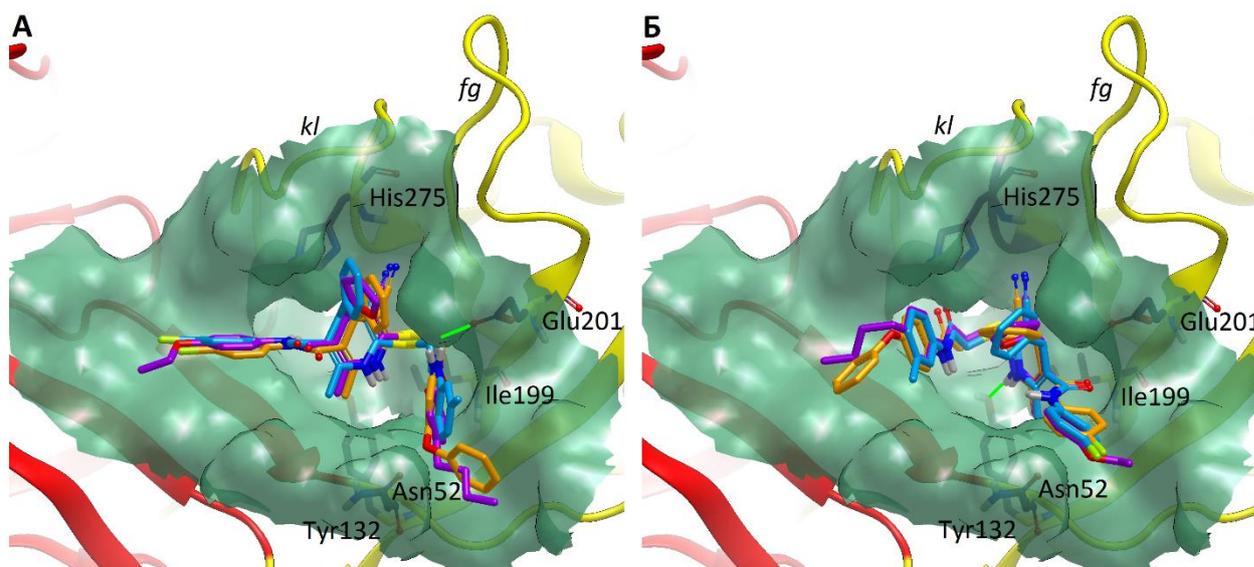
Специфичность взаимодействия соединения **55** с флавивирусами была также подтверждена путем изучения его активности в отношении структурно неродственного безоболочечного вируса полиомиелита первого типа (штамм Сэбин1) в культуре клеток RD. Соединение не проявило активности при концентрации 50 мкМ, что является еще одним указанием на специфичность взаимодействия **55** с оболочкой флавивирусов.

**Таблица 11.** Цитотоксичность и активность соединений в отношении репродукции ВКЭ штамма Абсеттаров и ПОВ штамма Повассан 24 (концентрация в мкМ вещества).

Центральный фрагмент	R1	R2	R3	Соединение	CC <sub>50</sub> , мкМ		EC <sub>50</sub> , мкМ	
					острая	хроническая	ВКЭ	ПОВ
				<b>50</b>	>250	41	2,0 ± 0,4	>10
				<b>51</b>	>250	38	2,8 ± 0,6	>10
				<b>52</b>	64	14	2,5 ± 0,5	>10
				<b>53</b>	>250	35	1,9 ± 0,4	>10
				<b>54</b>	>250	53	0,09 ± 0,01	>10
				<b>55</b>	109	39	0,07 ± 0,02	1,3 ± 0,1
				<b>56</b>	>250	116	2,6 ± 0,4	2,2 ± 0,3

## 2.5. Анализ способов связывания соединений

Анализируя списки 20 наиболее высоко оцененных поз соединений **50** – **52** в кармане белка E ВКЭ, для каждого стереоизомера, полученные по результатам докинга, можно выделить такие положения, которые будут характерны для всех указанных соединений с соответствующей конфигурацией хирального центра (рис. 33). Тем не менее, для (*R*)-стереоизомеров наблюдается большее количество вариантов положений в кармане по сравнению с (*S*)-стереоизомерами, для которых характерно наличие 2 – 3 вариантов с высокой заселенностью.

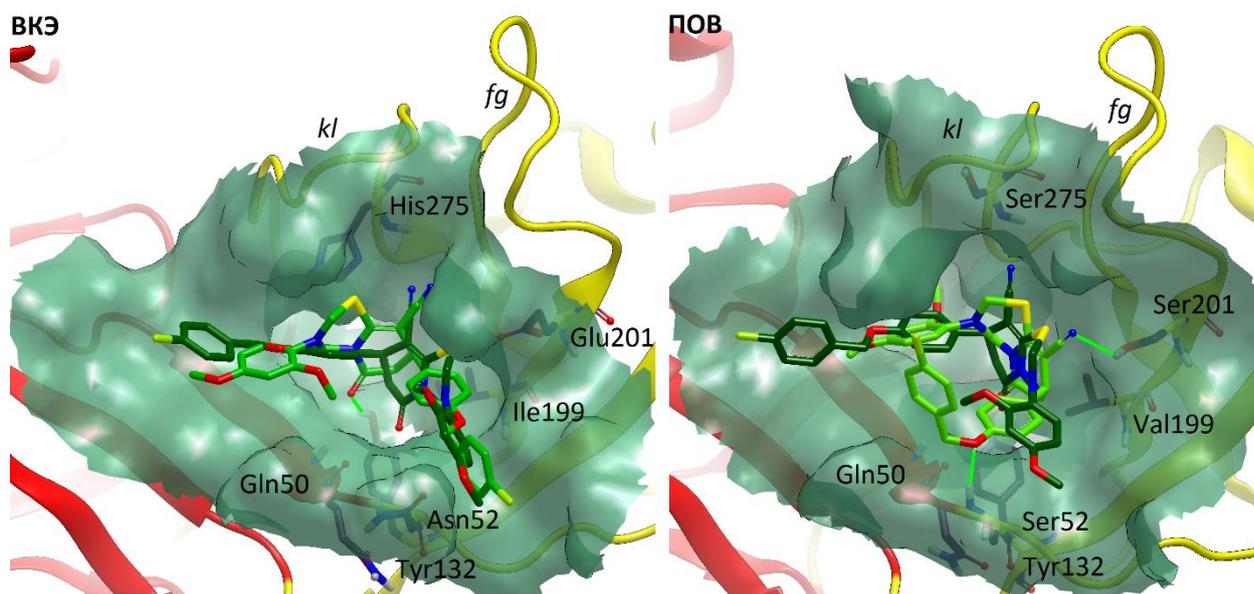


**Рисунок 33.** Способы связывания **A)** (*R*)- и **Б)** (*S*)-энантиомеров 1,4-дигидропиридинов (**50** – фиолетовый, **51** – оранжевый, **52** – голубой) по результатам докинга.

Для молекул (*S*)-стереоизомеров характерно образование водородных связей между атомом азота дигидропиридинового кольца, направленного внутрь кармана, с Tyr132. В случае (*R*)-изомера возможно формирование водородной связи с Glu201. Однако данные о способах связывания молекул данного класса в кармане sE, полученные методом докинга, не позволяют сделать однозначного заключения о структурных особенностях молекул, предопределяющих противовирусную активность с EC<sub>50</sub> выше 10 мкМ, так как похожие способы связывания характерны и для неактивных соединений. Использование порога EC<sub>50</sub> в 10 мкМ для отнесения соединения к активным оказалось весьма жестким критерием, при использовании метода ингибирования образования бляшек или фокусов. Поэтому с целью более детального изучения взаимосвязей между структурой и противовирусной активностью в последующих испытаниях пороговой была принята концентрация в 50 мкМ.

То же характерно и для молекул 1,3,5-тиадиазинов. И активные, и неактивные соединения располагаются в кармане sE схожим образом. Для энантиомеров характерно, что их молекулы по-разному ориентированы в кармане. К примеру, в случае ПОВ **55** докируется

таким образом, что (*R*)-**55** образует водородные связи с Ser201 и Ser52, а его бициклическое ядро образует ван-дер-ваальсовы контакты с Val199, в то время как (*S*)-**55** не образует водородных связей с аминокислотными остатками белка (рис. 34). В кармане sE ВКЭ (*R*)-**55** также способен формировать водородную связь, в отличие от (*S*)-энантиомера.



**Рисунок 34.** Способы связывания (*R*)-**55** (салатовый) и (*S*)-**55** (зеленый) в карманах E ВКЭ и ПОВ.

При докинге в карман sE ПОВ три оценочные функции (cg, sg, ss) показывают сильное преимущество (*S*)-изомера над (*R*)-, в то время как функция Chemscore чуть лучше оценивает (*R*)-изомер, а функция PLP оценивает оба изомера практически одинаково (табл. 12).

**Таблица 12.** Оценки результатов докинга для изомеров **55**.

	sg	PLP	cg	cs	OECs	ss
( <i>S</i> )- <b>55</b>	-482,7	-47,6	-50,7	-19,7	-34,2	-116,6
( <i>R</i> )- <b>55</b>	-438,3	-47,4	-39,3	-21,1	-35,8	-91,8

Лучшие по результатам докинга в карман субъединицы А ПОВ конформеры (*S*)- и (*R*)-**55** были докированы в карман субъединицы В. Полученные в результате комплексы sE с двумя молекулами ингибитора были в дальнейшем использованы для моделирования молекулярной динамики (МД).

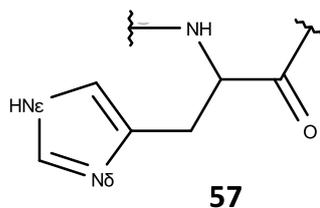
## ГЛАВА 3. МОДЕЛИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Несмотря на то, что механизм ингибирования слияния соединениями, связывающимися в кармане  $\beta$ -OG, плохо изучен, до настоящего момента не предпринимались попытки моделирования МД белков E в комплексе с ингибиторами. С помощью МД были получены оценки стабильности димеров ВКЭ [263] и ДНГВ [122, 123, 264] при различных уровнях pH, которые моделировались при помощи различной степени протонирования остатков гистидина. С применением метода моделирования «метадинамики» исследовался «путь» мономера sE из конформации, характерной для высокого pH, к характерной для низкого [124]. Было показано, что димерная конформация стабильнее при нейтральном pH, в то время как тримеры стабильнее при низком pH [122-124, 264]. При нейтральном pH также было отмечено сгибание и скручивание структур димеров [123, 263]. Приводились данные о том, что некоторые характеристики таких движений (например, угол изгиба димеров) коррелируют с физико-химическими свойствами вирионов такими, как термостабильность: у вариантов ВКЭ, белки E которых демонстрируют более масштабное изменение конформации, вирионы быстрее теряют инфекционность под действием нагревания и детергентов [263]. Однако схожие конформации не наблюдались в моделировании методом Монте-Карло полноразмерной модели E, включающей как трансмембранные регионы, так и белок M [262].

Мы провели моделирование МД димеров sE ПОВ с тем, чтобы исследовать влияние уровня pH, состояния петли *kl* и наличия лигандов на конформационное поведение белка [235].

### 3.1. Оценка $pK_a$ остатков гистидина

Разный уровень pH моделировался с помощью различного уровня протонирования боковых цепей остатков гистидина **57**: при нейтральном pH только атом  $N_\epsilon$  имидазольного кольца был связан с протоном, при низком pH гистидины были протонированы по обоим атомам азота. Значение  $pK_a$  отдельных остатков гистидина зависит от их окружения, поэтому весьма вероятно, что при закислении эндосом не все остатки протонируются одновременно. До сих пор продолжаются дискуссии по поводу того, протонирование каких остатков гистидина необходимо и достаточно для инициации процесса слияния (см. раздел 3.6 обзора литературы). Для моделирования кислой среды эндосом нам было необходимо определить, какие из остатков His будут протонированы при  $pH \sim 6,6$ . Для этого оценки значений  $pK_a$  боковых цепей остатков гистидина были рассчитаны с помощью программ PROPKA [247], H++ [245] и MCCE [248, 249] (табл. 13).



**Таблица 13.** Рассчитанные значения  $pK_a$  остатков гистидина для цепей А и В димеров sE в открытой и закрытой форме.

№ остатка	Закрытая форма, субъединица А			Открытая форма, субъединица А			Закрытая форма, субъединица В			Открытая форма, субъединица В		
	Propka	H++	MCCE									
5	5,02	3,3	3,52	4,52	1,0	1,36	4,43	3,6	2,95	4,38	2,7	3,10
62	5,07	2,8	3,75	5,67	5,0	5,16	5,92	5,4	5,47	5,22	4,0	4,41
86	6,41	6,5	6,79	6,45	6,9	7,24	6,43	6,5	6,79	6,46	6,7	7,06
104	6,27	6,0	6,61	6,16	5,2	5,98	6,23	5,4	5,91	6,08	5,9	6,60
130	5,01	5,4	7,11	5,69	6,0	6,94	4,96	5,3	5,53	5,85	6,5	7,56
146	6,81	5,1	6,36	6,09	3,7	1,38	6,87	4,8	7,40	6,68	3,1	4,92
208	6,46	6,9	7,65	5,51	5,7	6,06	6,14	5,5	6,60	5,88	6,4	6,85
216	6,42	4,5	2,78	6,44	5,0	5,21	6,35	4,6	4,47	6,42	4,8	3,58
229	6,07	5,7	6,26	6,62	5,6	6,48	6,21	5,9	6,58	6,12	6,1	6,54
248	5,90	6,2	6,91	7,14	8,0	8,09	6,87	7,3	7,19	7,03	7,6	7,14
282	5,54	5,1	6,29	5,58	6,5	7,02	5,32	4,4	5,17	5,59	6,4	7,12
287	6,71	7,0	7,40	6,35	6,7	7,10	6,78	6,7	6,48	6,35	6,4	7,19
323	5,27	6,6	6,58	5,41	6,3	0,85	5,61	6,9	5,18	5,27	7,7	7,41
348	6,52	6,7	7,33	6,50	6,4	6,89	6,46	6,2	6,43	6,50	6,5	7,11

Для большинства из них предсказанные значения  $pK_a$  близки к 6, тем не менее, для некоторых остатков, в частности His216, 287, 348, эти значения не могут быть предсказаны корректно, так как они, вероятно, могут взаимодействовать с липидной мембраной вириона или же с трансмембранными регионами белков E и M. Для некоторых остатков значения  $pK_a$ , рассчитанные разными методами, сильно различались (His5, 130, 216). Ввиду этого для упрощения при моделировании низкого pH все остатки гистидина были представлены в виде протонированных форм.

### 3.2. Докинг молекул 55 карман модели sE ПОВ

Исходные структуры лиганд-белковых комплексов для проведения моделирования МД были получены с помощью докинга обоих энантиомеров 55 в карман субъединицы А модели открытой формы sE ПОВ (см. раздел 2.5.). Далее конформер с наилучшей оценкой консенсуса оценочных функций докировался в карман субъединицы В без изменения конформации.

Полученный комплекс белка с двумя молекулами ингибитора в дальнейшем использовался как стартовая структура для моделирования МД.

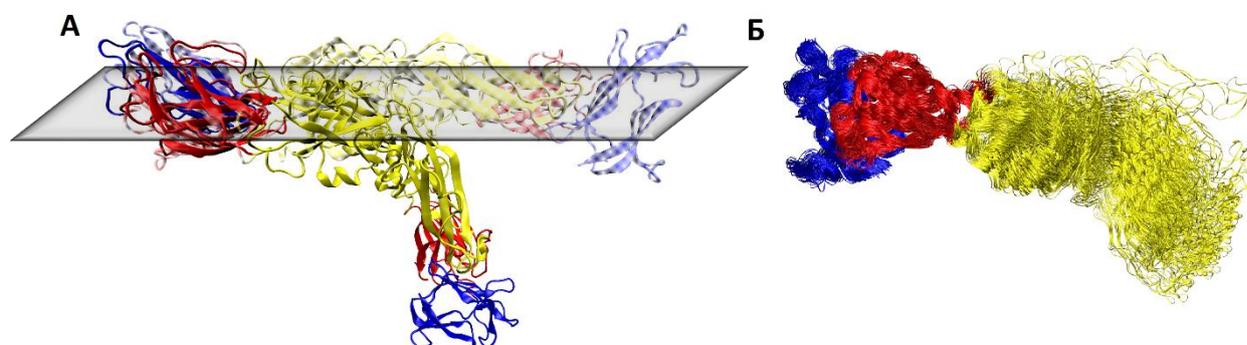
Траектории МД длительностью 30 нс с неявно заданным растворителем были получены для димеров sE ПОВ в открытой и закрытой формах и в комплексах с двумя молекулами ингибитора с нейтрально или положительно заряженными остатками гистидина, Характеристики систем приведены в табл. 14.

**Таблица 14.** Параметры систем, для которых проводилось моделирование МД.

Состояние карманов sE	Заряд остатков His	Обозначение
Закрытый	0	apo_c_H <sup>0</sup>
Закрытый	+1	apo_c_H <sup>+</sup>
Открытый	0	apo_o_H <sup>0</sup>
Открытый	+1	apo_o_H <sup>+</sup>
В комплексе с (R)-55	0	R_H <sup>0</sup>
В комплексе с (R)-55	+1	R_H <sup>+</sup>
В комплексе с (S)-55	0	S_H <sup>0</sup>
В комплексе с (S)-55	+1	S_H <sup>+</sup>

### 3.3. Изгибание структуры белка

Главным видимым компонентом движения во всех системах является изгибание (рис. 35), которое описывалось и в предшествующих работах [263]. Совмещение структур, полученных на протяжении всей траектории по атомам основной цепи доменов I и III позволяет сказать, что изгибание происходит вследствие вращения домена II относительно доменов I и III в плоскости, перпендикулярной плоскости димера (рис. 35). Как и в работе [263], основным параметром, описывающим изгибание структуры, был угол  $\varphi$  между центром масс домена III субъединицы А, точкой, соответствующей центру масс начальной структуры димера, и центром масс домена III субъединицы В. Во всех системах этот угол изменяется квази-периодически.

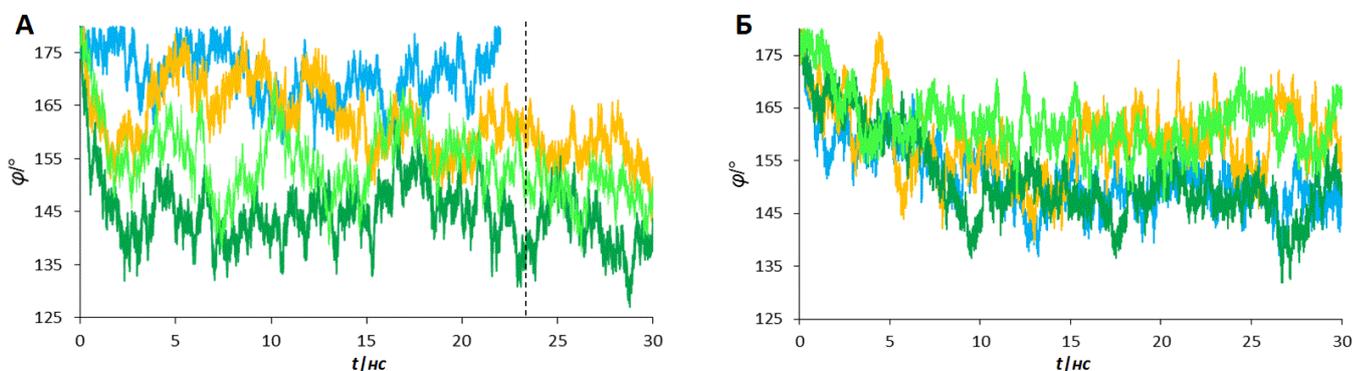


**Рисунок 35.** Изгибание структуры димера sE ПОВ в процессе моделирования МД. Приведены выравнивания по DI и DIII **А)** начальной структуры и структуры с наименьшим углом  $\varphi$  системы R\_H<sup>0</sup> (угол  $\varphi$  тупой и уменьшается при изгибании); **Б)** каждого 1000-го фрейма R\_H<sup>0</sup>. Фрейм – фрагмент (кадр) молекулярной динамики, соответствующий моменту записи данных в файл.

Начиная с практически плоской конформации ( $\varphi = 176^\circ$ ), димеры sE изгибаются в разной степени (табл. 15). В условиях нейтрального pH амплитуда изгиба меньше для систем без лигандов, по сравнению с комплексами (рис. 36). Наиболее ощутимые изменения угла наблюдаются в системе R\_H<sup>0</sup>, в которой значение  $\varphi$  достигает  $127^\circ$ .

**Таблица 15.** Характеристики изгиба структур sE для различных систем. Среднее значение и его стандартное отклонение для угла  $\varphi$  рассчитаны для отрезка траектории после 5-ой нс моделирования.

	аро_с_H <sup>0</sup>	аро_о_H <sup>0</sup>	R_H <sup>0</sup>	S_H <sup>0</sup>	аро_с_H <sup>+</sup>	аро_о_H <sup>+</sup>	R_H <sup>+</sup>	S_H <sup>+</sup>
Минимальное значение $\varphi$ , °	157	143	127	137	137	140	132	147
Среднее значение $\varphi$ , °	170	162	144	153	150	157	149	161
Стандартное отклонение, °	4,62	6,33	5,20	5,74	4,74	5,63	5,25	4,25

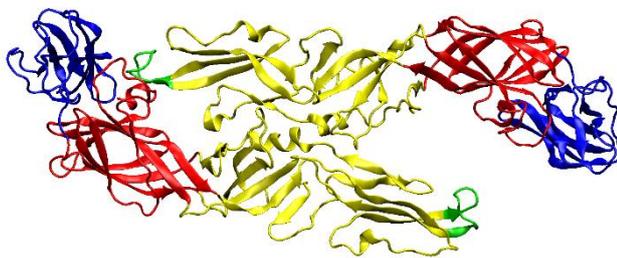


**Рисунок 36.** Изменение угла  $\varphi$  во времени **А)** при нейтральном pH (пунктиром отмечен момент диссоциации димера в системе аро\_с\_H<sup>0</sup>; **Б)** при низком pH. Голубые графики соответствуют закрытой форме sE, оранжевые – открытой, темно-зеленые – комплексу с (R)-55, светло-зеленый график – комплексу с (S)-55.

Хотя при нейтральном pH закрытая форма претерпевает наименьший изгиб, в этой системе происходит потеря контакта между петлей слияния цепи А и доменом III соседней субъединицы после 22 нс моделирования, чего не наблюдается в других системах. В процессе этого субъединица А подвергается изгибанию, а субъединица В пытается вернуться в начальную плоскую конформацию путем вращения ДII, что в результате приводит к потере контакта между петлей слияния и ДIII соседней субъединицы В. Такой диссоциации не наблюдается для системы аро\_с\_H<sup>+</sup>.

Моделирование МД при низком pH характеризуется незначительным изменением среднего и минимального угла  $\varphi$  в сравнении с моделированием МД при нейтральном pH в

системе  $\text{aro\_o\_H}^+$ , их увеличение наблюдается для систем  $\text{R\_H}^+$  и  $\text{S\_H}^+$ , значительное уменьшение (на  $20^\circ$ ) наблюдается для закрытой формы.



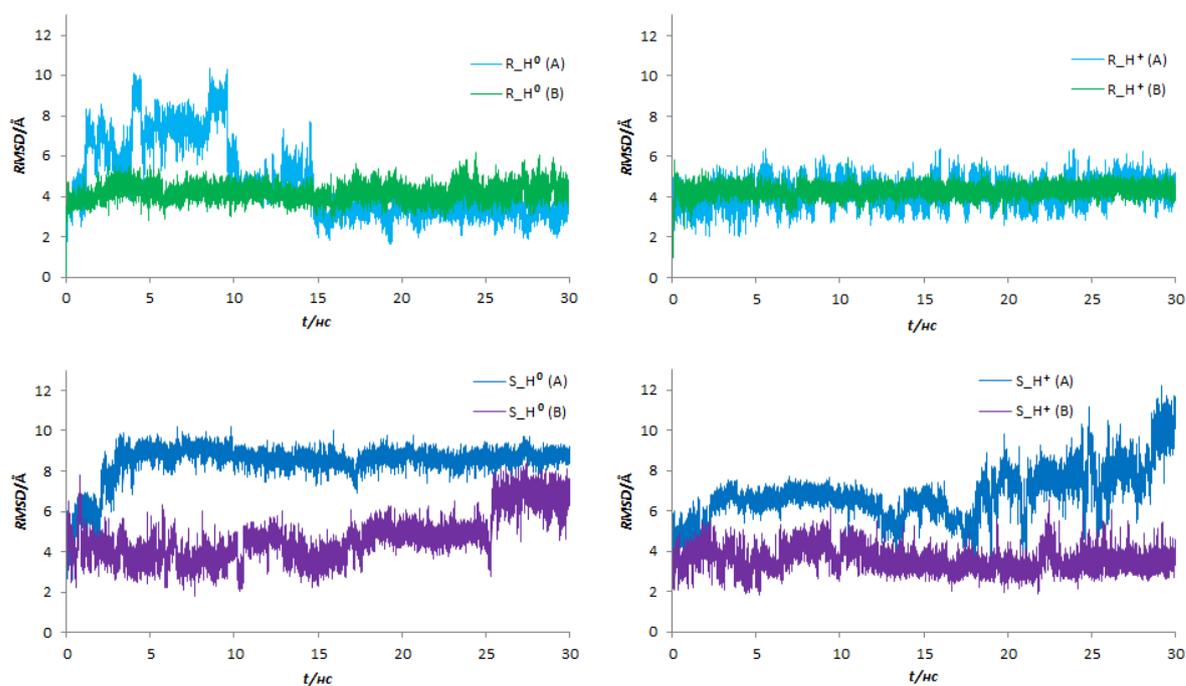
**Рисунок 37.** Диссоциация петли слияния (зеленый) и домена III соседней субъединицы в  $\text{aro\_c\_H}^0$ .

### 3.4. Поведение ингибитора

Поведение каждой молекулы ингибитора в обоих карманах связывания  $\beta$ -OG рассматривалось по отдельности вдоль каждой траектории МД.

Ориентация (*R*)-**55** в кармане субъединицы А в первые 15 нс моделирования была нестабильна (рис. 38): наблюдалось смещение бициклического ядра молекулы, вращение хлорфенильной и метокси-групп вокруг связей С-О. На оставшиеся 15 нс лиганд принял стабильную ориентацию в кармане – такую, что тетрагидропиридиновый цикл располагался параллельно петле *fg*, образуя ван-дер-ваальсовы контакты с Val199А и слабую водородную связь между атомом азота нитрильной группы и гидроксильной группой Ser201А (рис. 39А). Ключевым взаимодействием, сохранявшимся на протяжении всей траектории, была водородная связь между лигандом и Gln50А (табл. 16): боковая цепь остатка развернулась в сторону лиганда после 1 нс моделирования с образованием водородной связи между амидным атомом водорода и атомом кислорода карбонильной группы лиганда (рис. 39А). Похожая стабильная ориентация лиганда в кармане субъединицы В установилась после первых 2,5 нс моделирования (рис. 38, 39Б), хотя в этом кармане лиганд не образовывал водородных связей с Ser201В.

При протонировании остатков гистидина (траектория  $\text{R\_H}^+$ ) способ связывания лиганда был схож с наблюдавшимся в траектории  $\text{R\_H}^0$ , однако отсутствовала водородная связь между нитрильной группой лиганда и Ser201 (рис. 39В, Г). Стабильные ориентации были достигнуты гораздо быстрее по сравнению с траекторией при нейтральном рН – через 1,5 и 1 нс моделирования в карманах субъединиц А и В, соответственно. Среднеквадратичное отклонение координат лиганда от координат стартовой структуры в кармане А менялось сильнее, чем в кармане В (рис. 38). Заселенность водородной связи между ингибитором и Gln50 оказалась ниже, чем в траектории  $\text{R\_H}^0$  (табл. 16).



**Рисунок 38.** Среднеквадратичное отклонение координат лиганда от начальной структуры с течением времени. Траектория выравнена по координатам аминокислотных остатков кармана с начальной структурой белка.

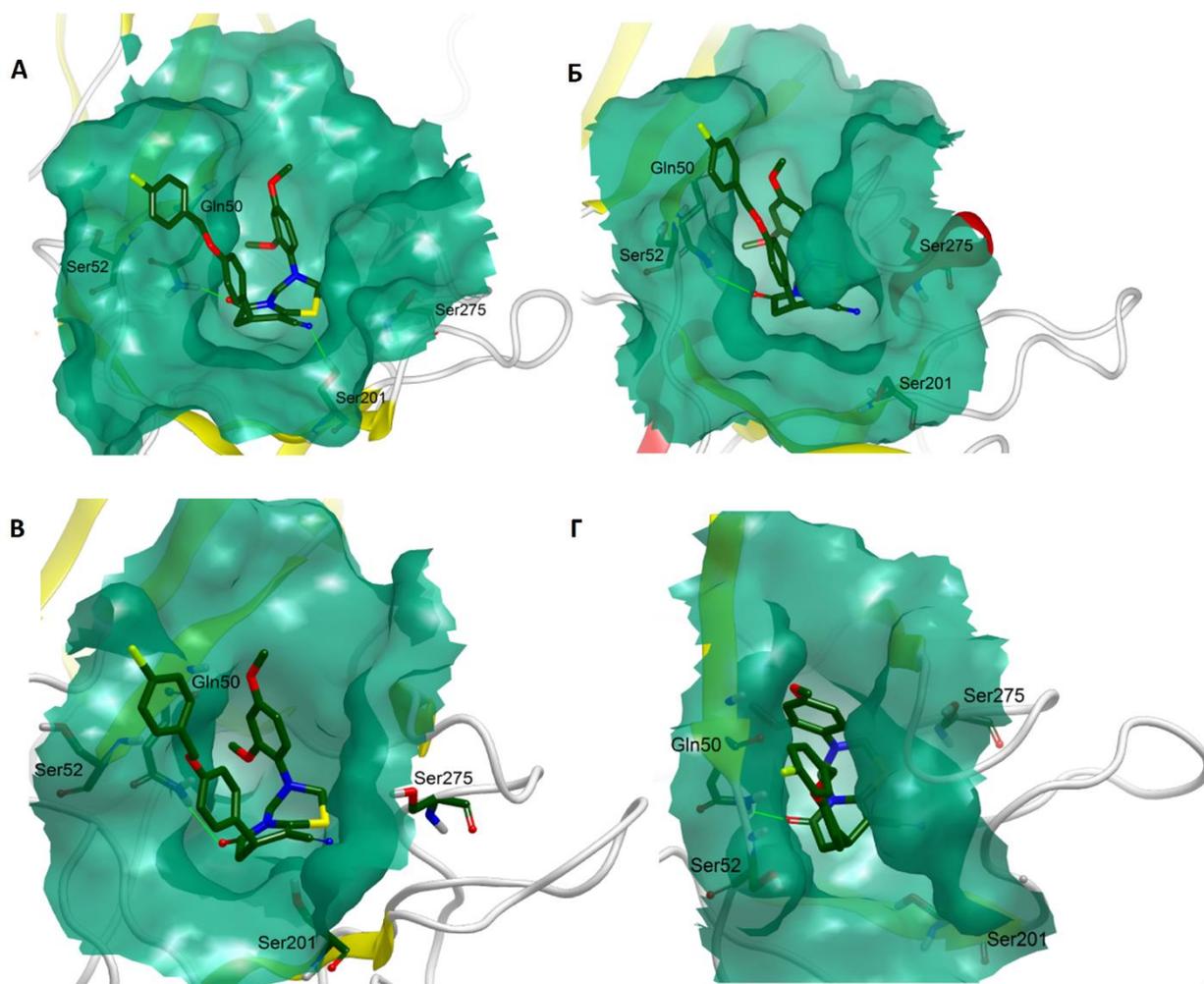
**Таблица 16.** Продолжительность существования водородной связи между атомом кислорода карбонильной группы лиганда и Gln50 (в % от длины траектории).

	R_H <sup>0</sup>	R_H <sup>+</sup>	S_H <sup>0</sup>	S_H <sup>+</sup>
Субъединица А	63	42	68	16 (с 1,8 по 15,6 нс)
Субъединица В	53	44	29 (с 0 по 11 нс)	73

(S)-Энантиомер **55** принимает стабильную ориентацию в кармане А после первых 5 нс моделирования траектории S\_H<sup>0</sup>. Нитрильная группа направлена к петле *kl* и образует слабую водородную связь с гидроксильной группой Ser275A, начиная с 8 нс траектории. Другая водородная связь формируется между карбонильным атомом кислорода лиганда и амидным атомом водорода боковой цепи Gln50A. В кармане субъединицы В это взаимодействие прекращается на 11 нс, далее лиганд не образует водородных связей и активно перемещается в кармане. Ориентация молекулы ингибитора в кармане В относительно стабильна только в течение последних 4 нс моделирования (рис. 40А, Б).

Иной характер поведения молекулы (S)-**55** наблюдался в траектории S\_H<sup>+</sup>. На отрезке между 2 и 16 нс центральный фрагмент (S)-**55** зафиксирован в кармане А водородными связями с боковыми цепями Gln50A и Ser275A. После 18 нс моделирования лиганд разворачивается таким образом, что нитрильная группа оказывается направленной вглубь

кармана, а карбонильная группа – наружу, причем не происходит образования новых водородных связей. Хлорбензокси группа направлена в полость между двумя субъединицами (рис. 40В). В кармане В положение лиганда зафиксировано водородной связью между карбонильной группой и Gln50, нитрильная группа направлена к Ser275, однако не образует с ним водородной связи (рис. 40Г).

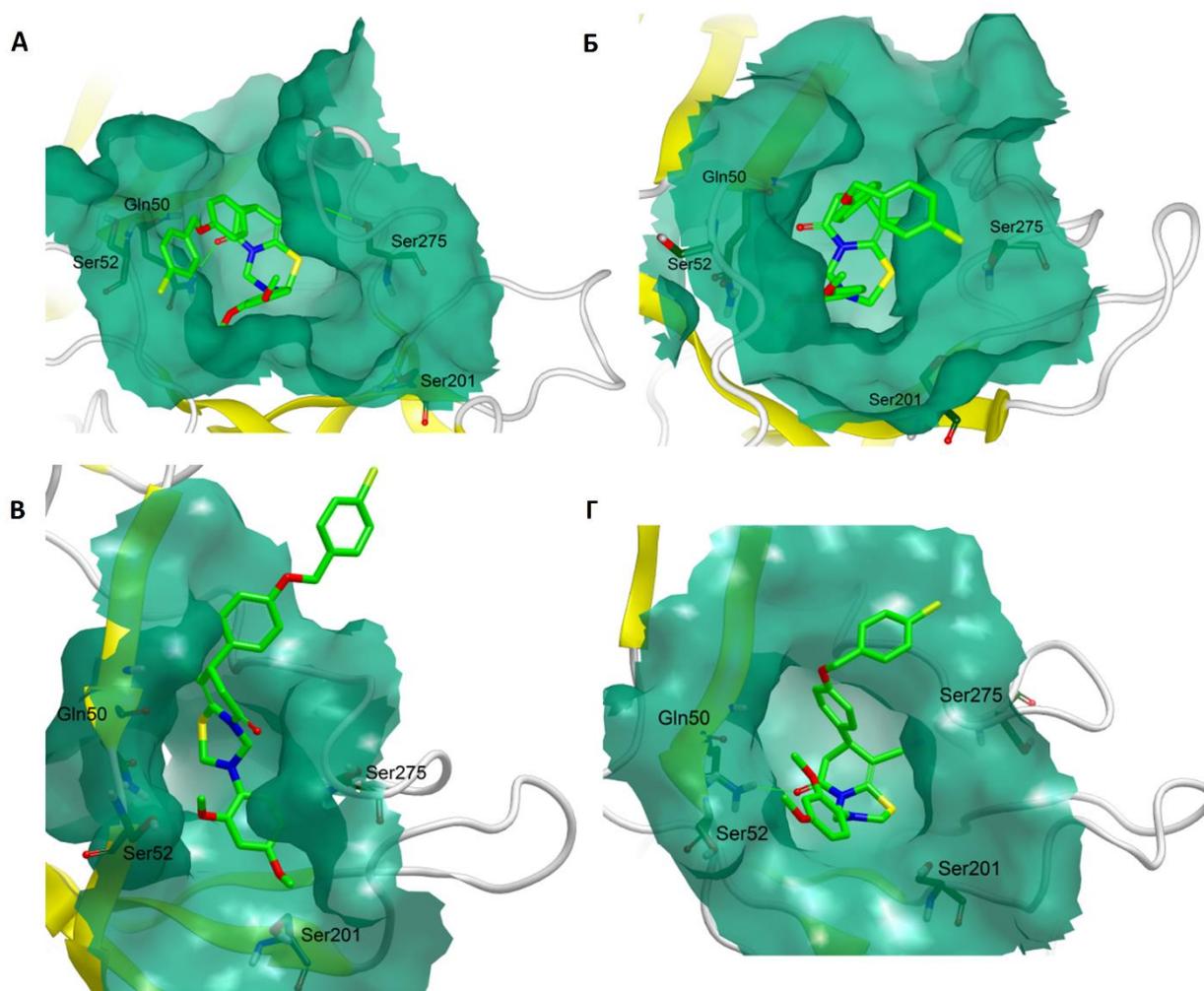


**Рисунок 39.** Стабильные ориентации (*R*)-**55** **А)** в кармане субъединицы *A* траектории  $R_{H^0}$ ; **Б)** в кармане субъединицы *B* траектории  $R_{H^0}$ ; **В)** в кармане субъединицы *A* траектории  $R_{H^+}$ ; **Г)** в кармане субъединицы *B* траектории  $R_{H^+}$ .

Конформация центрального тетрагидропиридотиадиазинового фрагмента **55** в стабильных ориентациях схожа во всех карманах (среднее среднеквадратичное отклонение координат – 0,123 Å для (*R*)-**55** и 0,258 Å для (*S*)-**55**).

Таким образом, на протяжении 30 нс моделирования МД оба энантиомера соединения **55** изменяют свою ориентацию в кармане связывания  $\beta$ -OG и формируют отличные от исходных сети водородных связей. Ориентация (*R*)-изомера в обоих карманах в обеих траекториях была стабилизирована водородной связью с Gln50, тогда как в траекториях с (*S*)-

энантимером такая фиксация происходила только в одном кармане.



**Рисунок 40.** Стабильные ориентации (*S*)-**55** **А**) в кармане А траектории  $S\_H^0$ ; **Б**) в кармане В траектории  $S\_H^0$ ; **В**) в кармане А траектории  $S\_H^+$ ; **Г**) в кармане В траектории  $S\_H^+$ .

### 3.5. Внутримолекулярные водородные связи sE

Среднее число внутримолекулярных водородных связей в димерах sE в траекториях МД при низком рН выше по сравнению с траекториями при нейтральном рН. При переходе от нейтрального к низкому рН число водородных связей между субъединицами значительно меняется для закрытой формы и комплекса с (*S*)-**55**, их число возрастает для комплекса с (*R*)-**55** и открытой формы (табл. 17).

**Таблица 17.** Среднее число водородных связей.

	apo с $H^0$	apo о $H^0$	R $H^0$	S $H^0$	apo с $H^+$	apo о $H^+$	R $H^+$	S $H^+$
Среднее число водородных связей	160 ± 11	161 ± 11	163 ± 11	162 ± 11	175 ± 12	170 ± 12	168 ± 11	170 ± 12
Среднее число межсубъединичных водородных связей	4,5 ± 2	4,7 ± 2	5,6 ± 2	5,6 ± 2	7,9 ± 3	5,8 ± 2	6,1 ± 2	9,1 ± 3

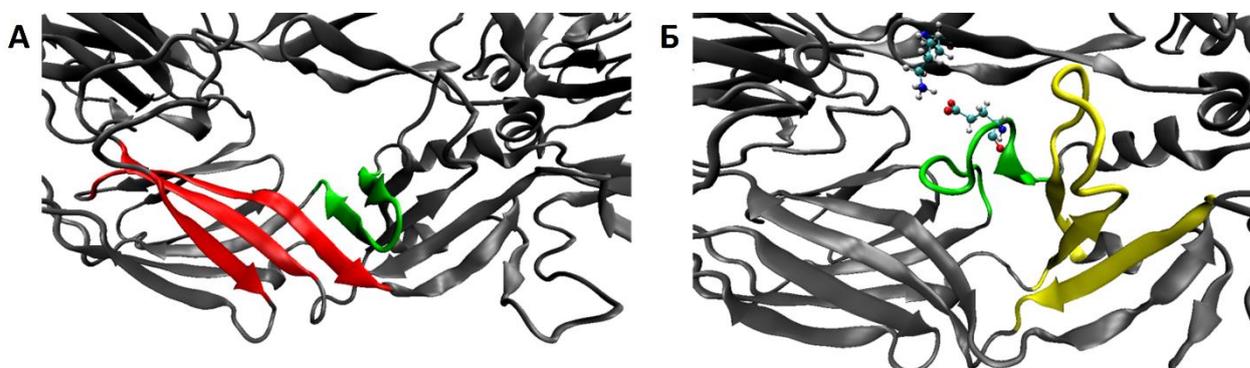
Солевые мостики между петлей *kl* и ДП соседней субъединицы наблюдались для траектории apo\_o\_ $H^0$ . Они формируются заряженными боковыми цепями Glu277A и Lys251B

и, соответственно, Glu277B и Lys251A (рис. 41), причем заселенность второго мостика оказалась ниже (табл. 18). В случае траекторий R\_H<sup>0</sup> и S\_H<sup>0</sup> наблюдается формирование только одного подобного солевого мостика. В системах apo\_o\_H<sup>+</sup> и S\_H<sup>+</sup> оба мостика хорошо заселены, однако в системе R\_H<sup>+</sup> наблюдается только один мостик. В системах с закрытой петлей kl пары Glu277 и Lys251 соседних цепей расположены на расстояниях, не позволяющих формировать солевые мостики.

**Таблица 18.** Время существования солевых мостиков между петлей kl и соседней субъединицей (в % от длины траектории).

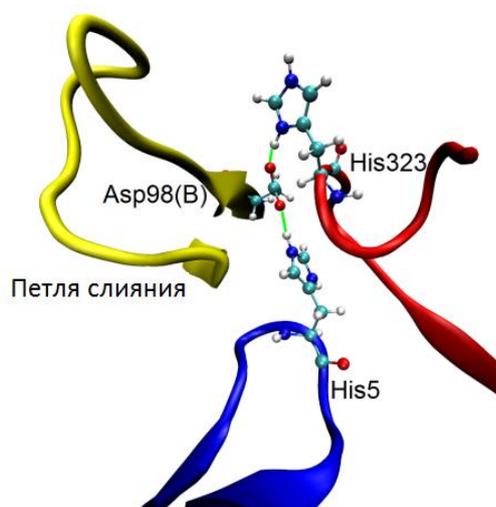
Водородная связь	apo_o_H <sup>0</sup>	apo_o_H <sup>+</sup>	R_H <sup>0</sup>	R_H <sup>+</sup>	S_H <sup>0</sup>	S_H <sup>+</sup>
Glu277A-Lys251B	71	90	77	34 (с 10 по 20 нс)	0	89
Glu277A-His248B	0	96	18	0	0	60
Glu277B-Lys251A	43 (с 0 до 20 нс)	94	0	88	85	93
Glu277B-His248A	0	63	0	0	0	92

Наравне с описанными солевыми мостиками в системах apo\_o\_H<sup>+</sup> и S\_H<sup>+</sup> также существуют взаимодействия Glu277 и His248 соседних цепей. В системе R\_H<sup>+</sup> наблюдалось формирование солевого мостика между His248B и Glu7A. В закрытой форме apo\_c\_H<sup>0</sup> His248 обеих цепей не участвуют в образовании водородных связей с другими остатками, но такие взаимодействия возникают при их протонировании в траектории apo\_c\_H<sup>+</sup>: His248A поддерживает водородные связи с основными цепями Lys206B и Val276B в течение первых 15 нс, оставшееся время он связан с Asp207B и основной цепью Ser204B. Как и в траектории R\_H<sup>+</sup>, на поверхности второй субъединицы apo\_c\_H<sup>+</sup> наблюдается солевой мостик His248B – Glu7A.



**Рисунок 41.** А) Петля kl (зеленый) в закрытом состоянии включена в состав β-листа D<sub>0</sub>E<sub>0</sub>F<sub>0</sub> (красный) домена I; Б) Петля kl в открытом состоянии включена в β-лист efg домена II, при этом Glu277 образует солевой мостик с Lys251 соседней субъединицы.

Другое межсубъединичное взаимодействие, которое наблюдается после протонирования остатков гистидина в траектории  $\text{aro\_c\_H}^+$ , – водородные связи Asp98B с His323A и His5A. Это взаимодействие связывает домены I и II субъединицы A и петлю слияния субъединицы B (рис. 42).



**Рисунок 42.** Кластер водородных связей, предположительно стабилизирующий димер в  $\text{aro\_c\_H}^+$ .

### 3.6. Обсуждение результатов моделирования МД

#### 3.6.1. Моделирование при нейтральном рН

Моделирование МД димеров sE с закрытым карманом связывания  $\beta$ -OG с незаряженными остатками гистидина ранее проводилось для ДНГВ (8 нс) [264] и ВКЭ (10 нс) [263]. В нашем исследовании моделирование димеров sE ПОВ с закрытым карманом при нейтральном рН дало схожие с моделированием МД sE ВКЭ результаты. Специфической особенностью движения димеров sE ПОВ является потеря контакта между пептидом слияния субъединицы A и DIII соседней субъединицы после 22 нс моделирования. Димеры белка E ДНГВ и ВКЭ не демонстрировали склонности к диссоциации в течение, соответственно, 8 и 10 нс моделирования МД. Моделирование 50 нс МД димера sE ВКЭ также не приводило к диссоциации димера (Осолодкин Д. И., неопубликованные данные). Хотя отсутствие диссоциации димеров может быть списано на короткие промежутки времени моделирования, стоит отметить, что sE ВЛЗН (sE ПОВ имеет больший процент сходства с sE ВЛЗН, чем с ДНГВ) в растворе существует преимущественно как мономер, в противоположность этому sE ДНГВ в растворе демонстрирует наличие и димерных, и мономерных форм [68, 69, 265]. Рентгеноструктурные данные о белке sE ВЛЗН (PDB ID 2HGO, 2I69) показывают, что относительная ориентация DI и DIII схожа с остальными структурами sE флавивирусов, однако DII развернут на 13–20° относительно них в плоскости димера, что снижает площадь межсубъединичных контактов и, вероятно, стабильность димера. В случае ПОВ, однако, DII развернут относительно DI и DIII в плоскости, перпендикулярной плоскости димера. Таким

образом, анализ МД свидетельствует о том, что для вирионов ПОВ можно ожидать менее плотную упаковку белковой оболочки по сравнению с ДНГВ и ВКЭ, что важно при поиске скрытых сайтов связывания низкомолекулярных соединений и эпитопов, распознаваемых нейтрализующими антителами.

Моделирование МД димера sE ДНГВ с открытым карманом  $\beta$ -OG и явно заданными молекулами воды при нейтральном pH (на основе структуры 1OKE) длительностью 60 и 10 нс не выявило значительных изменений структуры [122, 123]. Однако при моделировании динамики ПОВ с открытым карманом проявляется более заметное изгибание структуры, чем в случае закрытого кармана. Связывание ингибитора в кармане еще сильнее увеличивает амплитуду изгибания. Несмотря на более сильное изгибание, димеры sE в системах apo\_o\_H<sup>0</sup>, R\_H<sup>0</sup>, S\_H<sup>0</sup> не диссоциируют, в отличие от случая apo\_c\_H<sup>0</sup>. Это, вероятно, является результатом стабилизации димера открытой петлей *kl*: она частично заполняет пустое пространство между субъединицами, формируя ван-дер-ваальсовы контакты с соседней субъединицей, а также связывает соседние субъединицы димера солевым мостиком Glu277 (петля *kl*) – Lys251 (шпилька *ij* соседней субъединицы). Несмотря на то, что заселенность этих солевых мостиков не эквивалентна: она различается в два раза в случае apo\_o\_H<sup>0</sup>, и только один солевой мостик существует в системах комплексов с ингибиторами, – контакты субъединиц упрочняются благодаря ван-дер-ваальсовым и гидрофобным взаимодействиям между петлей *kl* и соседней субъединицей. Фиксация петли *kl* в открытом состоянии солевым мостиком, по-видимому, позволяет ингибитору быстрее достигнуть стабильной ориентации в кармане.

### 3.6.2. Моделирование при низком pH

В соответствии с теорией гистидинового переключателя, переход белков E из димеров в готовые для слияния тримеры при закислении контролируется протонированием остатков гистидина, что влечет за собой изменение структуры белка (см раздел 3.5. обзора литературы). Мы провели простейшую оценку гипотезы с помощью моделирования МД димеров sE ПОВ с протонированными остатками гистидина. Такая упрощенная система позволяет проводить быстрый конформационный сэмплинг и сравнивать результаты с итогами других работ. Потеря контакта между субъединицами в районе DI наблюдалась в моделировании 10 нс МД димера sE ДНГВ с открытым карманом с протонированными остатками гистидина в явном растворителе [122]. В аналогичном исследовании [123] скручивание и разворачивание структуры наблюдалось в течение 60 нс моделирования. В нейтральном pH в обоих работах наблюдались лишь слабые изменения структуры.

В нашем же исследовании димеры sE ПОВ с протонированными остатками гистидина изгибаются так же, как и димеры при нейтральном pH. Разница амплитуд между формами с

ингибитором и без него при низком рН становится менее выраженной. Наиболее значительные изменения по сравнению с нейтральным рН наблюдаются при моделировании закрытой формы и комплекса с (S)-55.

Межсубъединичные взаимодействия sE ДНГВ авторы [264] оценивали с помощью измерения количества водородных связей между ними вдоль траекторий МД при моделировании с явно заданными молекулами воды: снижение их количества наблюдалось после протонирования остатков His и Glu. В нашей работе при протонировании остатков His среднее количество водородных связей увеличивается, тогда как количество межсубъединичных связей увеличивается только в системах  $\text{aro\_c\_H}^+$  и  $\text{S\_H}^+$ , которые характеризуются также и наиболее существенными изменениями в амплитуде изгиба (хотя и с разными знаками), по сравнению со структурами при нейтральном рН. По-видимому, увеличение количества водородных связей между субъединицами является артефактом моделирования МД с неявно заданными молекулами воды.

Оба солевых мостика между Glu277 и Lys251, связывающие два мономера стабильны в системе  $\text{aro\_o\_H}^+$ , в противоположность системе в нейтральном рН, оба хорошо заселены на протяжении всей траектории. То же наблюдается и для комплексов с ингибиторами  $\text{R\_H}^+$  и  $\text{S\_H}^+$ . Подобный солевой мостик отсутствует в димере sE ДНГВ (ему соответствуют остатки Lys247 и Ser273).

Среди всех изученных нами систем открытая петля *kl* не может выступать дополнительным стабилизирующим димер фактором только в системах  $\text{aro\_c\_H}^0$  и  $\text{aro\_c\_H}^+$ , Тем не менее, в системе  $\text{aro\_c\_H}^+$  не наблюдается диссоциации димера. Таким образом, стабильность структуры при низком рН может быть результатом образования дополнительных связей протонированными остатками гистидина. И в самом деле, в структуре  $\text{aro\_c\_H}^+$  наблюдалось образование связей, не характерных для  $\text{aro\_c\_H}^0$ , His323A (DIII) и His5A (DI) вовлечены в такое взаимодействие и образуют солевой мостик с Asp98B, относящимся к петле слияния, что приводит к удержанию пептида слияния DI и DII второй субъединицы. Замена His323Ala, как было показано для белка E ВКЭ, влечет снижение эффективности высвобождения пептида слияния при закислении и уменьшает стабильность тримера [141]. В соответствии с нашей моделью, His248 также вносит вклад в стабильность димера: этот остаток формирует солевой мостик с Glu7 (DI) другой субъединицы в системе  $\text{aro\_c\_H}^+$ . Для ВКЭ было показано, что двойная замена His323Asn+His287Ala приводит к образованию неспособных к слиянию и образованию стабильных тримеров белков E (см. раздел 3.6 обзора литературы). Следовательно, His323 и His248 должны играть роль дестабилизирующих агентов при закислении, но в нашей работе наблюдалось их противоположное поведение. Стоит заметить, что модель неявного растворителя может не

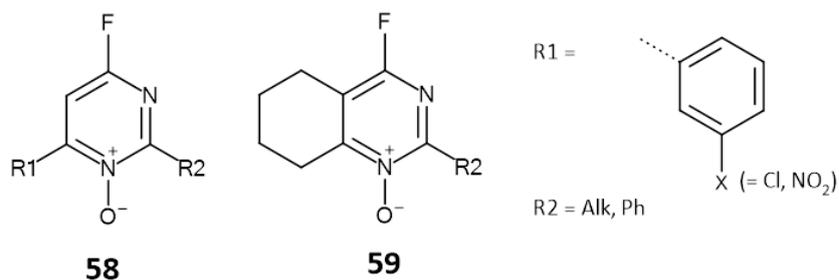
давать надежных результатов в том, что касается анализа солевых мостиков, так как сольватация заряженных остатков делает образование солевых мостиков энтропийно невыгодным. Увеличение количества солевых мостиков при протонировании остатков гистидина может быть рассмотрено как увеличение числа подходящих для сольватации сайтов, что подтверждается снижением количества водородных связей при протонировании остатков гистидина sE ДНГВ [264].

### **3.7. Заключение**

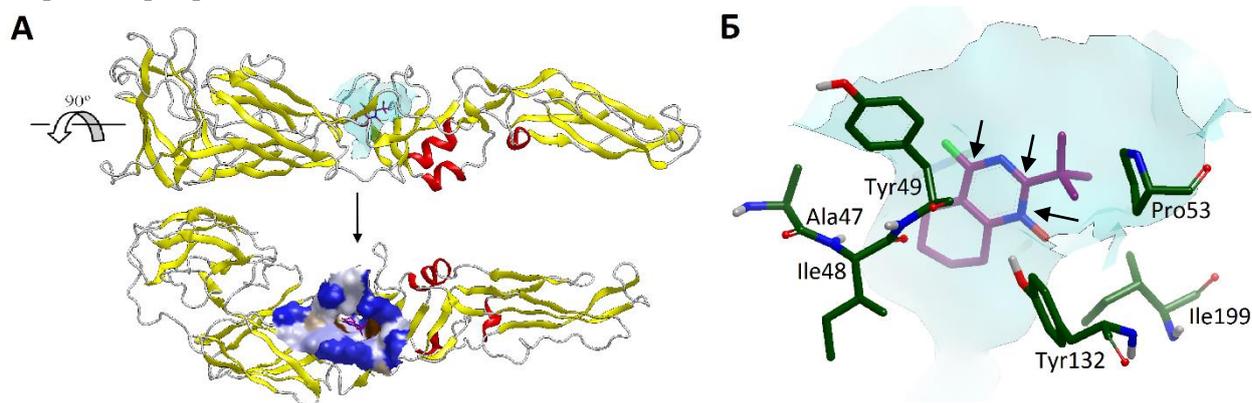
Результаты анализа моделирования МД комплексов димеров sE с молекулами ингибиторов свидетельствуют о том, что связывание с лигандом приводит к увеличению конформационной подвижности димеров белка sE, что в предыдущих работах по моделированию МД коррелировало с уменьшением инфекционности вирионов [263]. Высокая энергия активации для преодоления электростатического отталкивания между полярными группами фосфолипидов при слиянии вирусной и клеточной мембран преодолевается с помощью энергии конформационных перестроек белков E из метастабильных димеров в энергетически выгодные тримеры. Связывание молекулы ингибитора, по-видимому, может вызывать увеличение конформационной подвижности, этим снижая энергию конформационного перехода димер - тример, таким образом предотвращая слияние.

## ГЛАВА 4. ПРОИЗВОДНЫЕ 4-АМИНОТЕТРАГИДРОХИНАЗОЛИНА КАК ИНГИБИТОРЫ ВКЭ

Как известно из практики фрагментного дизайна лекарств, небольшие молекулы редко обладают высокой активностью. Испытание таких молекул обычно проводится с целью найти хорошие центральные фрагменты, активность которых возрастает при дальнейшей модификации боковых групп и увеличении молекулярной массы. С целью оценить перспективность 1,6-замещенного 4-фторпиримидинового цикла в качестве центрального фрагмента ингибиторов репродукции ВКЭ, была исследована виртуальная библиотека 4-фторпиримидин-N-оксидов, содержащая алкильные и фенильные производные **58** – **59** небольшого размера:



Результаты докинга соединений библиотеки в карман связывания  $\beta$ -OG модели открытой формы белка E ВКЭ свидетельствуют о выгодном способе связывания аналогов **59** в кармане (рис. 43): заместитель в положении 1 взаимодействует с гидрофобным регионом кармана (Pro53 и Ile199), в то время как тетраметиленовое кольцо направлено вглубь кармана. Атом фтора направлен в сторону обширного региона вблизи кармана, что может позволить широко варьировать заместители в данном положении.



**Рисунок 43. А)** Положение кармана связывания  $\beta$ -OG на поверхности мономера белка E ВКЭ (вид сбоку и сверху (перпендикулярно вирусной мембране)) в комплексе с молекулой трет-бутильного производного **59**. **Б)** Положение молекулы в кармане. Стрелками указаны положения, в которых варьировались заместители. Атомы углерода окрашены в фиолетовый, азота – в синий, кислорода – в красный, фтора – в салатный цвет.

На основе полученных данных путем варьирования заместителей в положениях 1, 2 и 4 структуры **59** была разработана серия более объемных аналогов **60** – **86** (табл. 19). В

положении 1 были возможны два варианта – N-оксид или неокисленный атом азота, в положении 2 – метил, этил или *трет*-бутил, в положении 4 заместители широко варьировались, что дало возможность изучить влияние электронных и стерических эффектов на активность производных **59**: была синтезирована серия морфолин-содержащих соединений (акцепторы водородных связей) **65 – 67**, пиперазиновые производные **68 – 70** (доноры водородной связи при протонировании вторичного амина при физиологическом pH) и производные первичных ароматических аминов **61 – 64**, **71 – 73**, а также объемные адамантильные производные **74 – 86** (табл. 19).

Для полученных соединений<sup>2</sup> была оценена цитотоксичность и активность против репродукции ВКЭ штамма Абсеттаров методом ингибирования образования фокусов в культуре клеток СПЭВ [255]. Для идентифицированных ингибиторов репродукции был изучен профиль активности в отношении различных штаммов ВКЭ, относящихся к различным подтипам.

#### **4.1. Определение цитотоксичности и активности 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксидов против ВКЭ штамма Абсеттаров**

Большинство изученных соединений были способны растворяться в ДМСО с конечной концентрацией 25 мМ. Исключение составили соединения **75**, **77**, **78** и **82**, которые выпадали в осадок в различной степени при данной концентрации, однако были полностью растворимы при максимальных концентрациях, требовавшихся для биологических испытаний (500 мкМ).

Изначально была определена острая (24 часа) и хроническая (7 суток) 50% цитотоксическая концентрация (CC<sub>50</sub>) для клеток СПЭВ (табл. 19). В целом обе величины оказались ниже для соединений, не содержащих адамантановых заместителей. Тем не менее, для всех соединений значения острой цитотоксичности были выше 10 мкМ, поэтому для всех них была определена противовирусная активность в отношении ВКЭ штамма Абсеттаров.

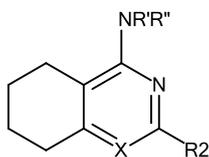
Активность соединений изначально оценивалась в опыте по 50%-ному ингибированию образования фокусов при фиксированной концентрации исследуемого соединения 50 мкМ против 20 БОЕ ВКЭ в культуре клеток СПЭВ. Пороговое значение концентрации 50 мкМ было выбрано в связи с меньшей молекулярной массой соединений, по сравнению с молекулами из базы ХимЭкс, а также из-за необходимости точного определения активности большого количества соединений для анализа связи между структурой и активностью. Для 9 соединений, которые ингибировали образование по крайней мере 50% фокусов при

---

<sup>2</sup> Синтез проводился сотрудниками лаборатории органического синтеза кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова с.н.с., к.х.н. Седенковой К. Н. и доц., д.х.н. Авериной Е. Б.

концентрации 50 мкМ, были определены точные значения EC<sub>50</sub> (табл. 19). Данные соединения продемонстрировали дозозависимый характер ингибирования репродукции ВКЭ (рис. 44).

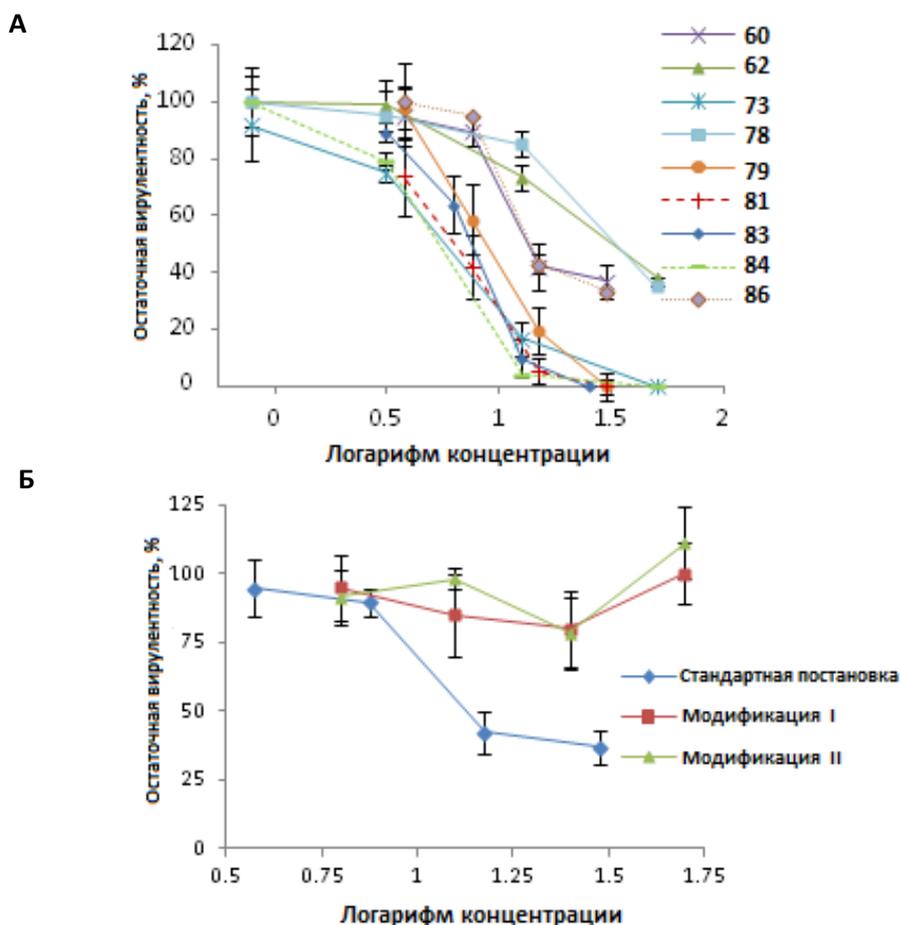
**Таблица 19.** Структура и биологическая активность 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксидов.



№	X	R2	NR'R''		CC <sub>50</sub> , мкМ		EC <sub>50</sub> , мкМ
					острая	хроническая	
60	N→O	Me	H	<i>n</i> -Bu	172	97	12±1
61	N→O	Me	H	CH <sub>2</sub> Ph	432	93	>50
62	N→O	<i>t</i> -Bu	H	CH <sub>2</sub> Ph	283	98	46±3
63	N→O	Me	H	CH <sub>2</sub> (4-OMe-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> )	220	87	>50
64	N→O	Me	H	CH <sub>2</sub> (3-OH-4-OMe-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> )	>500	214	>50
65	N→O	Me			>500	>125	>50
66	N	Me			>500	>500	>50
67	N→O	<i>t</i> -Bu			>500	282	>50
68	N→O	Me			>500	>500	>50
69	N	Me			>500	305	>50
70	N→O	<i>t</i> -Bu			>500	213	>50
71	N→O	Me	H	Ph	>500	>250	>50
72	N→O	<i>t</i> -Bu	H	Ph	>500	>500	>50
73	N→O	Me	H	2-OH-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	>500	340	5,60±0,09
74	N→O	Me	H	CH <sub>2</sub> -(1-Ad)	142	47	>50
75	N→O	<i>t</i> -Bu	H	CH <sub>2</sub> -(1-Ad)	>500	419	>50
76	N→O	Me	H	CH(1-Ad)CH <sub>3</sub>	101	40	>50
77	N→O	Me	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -(1-Ad)	54	12	>50
78	N→O	Et	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -(1-Ad)	109	64	33,1±0,2
79	N→O	<i>t</i> -Bu	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -(1-Ad)	43	12	7,4±0,5
80	N→O	Me	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -(2-Ad)	46	16	>50
81	N→O	<i>t</i> -Bu	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -(2-Ad)	54	35	6,6±0,4
82	N→O	Me	H	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> O-(1-Ad)	183	85	>50
83	N→O	Me	H	CH(1-Ad)Ph	48	14	11±3
84	N→O	<i>t</i> -Bu	H	CH(1-Ad)Ph	24	11	5,5±0,2
85	N→O	Me			391	90	>50
86	N→O	<i>t</i> -Bu			271	211	14,1±0,6

Соединение **60** обладает умеренной активностью с EC<sub>50</sub> 12 мкМ. Серия морфолин-содержащих соединений **65** – **67**, пиперазиновые производные **68** – **70** и производные первичных ароматических аминов не проявили активности за исключением соединения **73** (EC<sub>50</sub> = 5,6 мкМ) и малоактивного соединения **62**.

Наиболее активные соединения **79**, **81**, **84** и **86** содержат объемные адамантовые заместители R'' и *трет*-бутильную группу в позиции R2. Удаление адамантового заместителя ведет к значительному снижению активности (**84** и **62**) или к ее потере (**86** и **70**). Замена *трет*-бутильного заместителя меньшей группой также негативно отражается на активности (**77**, **78**, **80**, **83**, **85**). Уменьшение длины линкера между адамантаном и центральным фрагментом (**79** и **75**) приводит к потере активности.



**Рисунок 44. А)** Дозозависимое ингибирование образования 50% фокусов в стандартном тесте под действием **60** – **86**. **Б)** Типичное дозозависимое ингибирование репродукции ВКЭ соединением **60** в стандартном тесте (суспензия вируса инкубировалась с раствором соединения и через 1 ч добавлялась к клеткам) и отсутствие ответа доза – эффект в модифицированных постановках теста (раствор **60** добавлялся к клеткам за один час до или после инфицирования - модификация I и II, соответственно). Остаточная вирулентность рассчитана как отношение среднего числа фокусов в лунках с соединением к их числу в лунках с соответствующим количеством ДМСО, умноженное на 100%. Средние значения рассчитаны по 3 независимым экспериментам, выполненным в 2 повтора. Планки погрешностей представлены значениями стандартного отклонения от среднего.

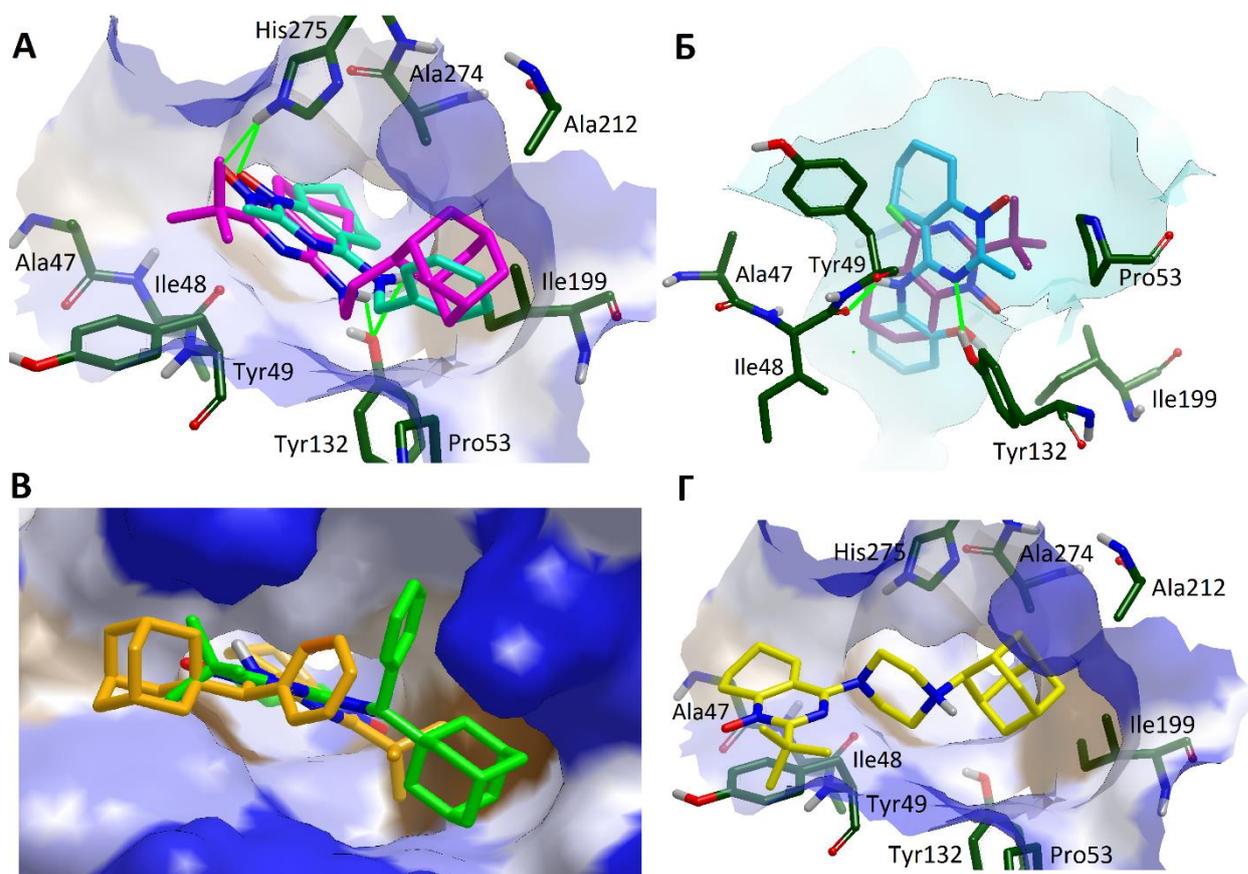
#### 4.2. Идентификация стадии инфекционного цикла ВКЭ, ассоциированной с ингибированием репродукции

Механизм антифлавивирусной активности идентифицированных ингибиторов репродукции ВКЭ был изучен путем оценки влияния порядка добавления соединения и

инфицирования клеток ВКЭ на значение  $EC_{50}$  (рис. 44) и измерения активности против полиовируса. Как и в случае с соединением **55**, отсутствие активности и дозозависимого эффекта при добавлении веществ к клеткам до или после инфицирования ВКЭ, а также отсутствие влияния на репродукцию полиовируса указывает на то, что ингибиторная активность соединений против ВКЭ является результатом их взаимодействия с поверхностью вириона на стадии его проникновения в клетку.

#### 4.4. Изучение способа связывания методом докинга

При докинге в карманы модели sE ВКЭ для соединений серии генерируется большое количество разнообразных способов связывания. Наиболее часто наблюдались две ориентации молекул, различающиеся направлением N-оксидной группы (рис. 45). Специфическая ориентация была характерна для соединений **73** и **86**.



**Рисунок 45.** Докинг тетрагидрохиназолин-N-оксидов в карман белка E ВКЭ. Ориентация соединений **A)** **62** (сине-зеленый) и **79** (лиловый), вид сверху; **Б)** трет-бутил-производного **59** (фиолетовый) и **73** (голубой), вид сбоку, поверхность кармана окрашена голубым; **В)** (*R*)-**84** (оранжевый) и (*S*)-**84** (салатовый); **Г)** **86**, вид сверху. Поверхность кармана окрашена в соответствии с гидрофобностью регионов по схеме Кайта – Дулитла [266], если не указано иное: от синего для наиболее гидрофильных регионов через белый к коричневому для наиболее гидрофобных. Водородные связи окрашены салатovým.

Ориентации соединений **60** и **62** схожи и характеризуются водородными связями с His275 и Tyr132 (рис. 45А). Тетраметиленовое кольцо направлено вглубь кармана, как и у соединения **59**. Ориентации неактивных соединений **61**, **63**, **64**, **71** и **72** схожи с ориентацией **62**, но ввиду присутствия гидрофильных заместителей в положениях 3 и 4 фенильного кольца соединения **63** и **64** получили более низкую оценку в сравнении с **62**, так как эти группы формируют невыгодные контакты с гидрофобным регионом кармана. Соединения **71** и **72**, содержащие фенильные заместители вместо бензильных, не могут принять конформации с благоприятной плоской геометрией аминогрупп, что может объяснить отсутствие активности. Соединение **60** содержит метильную группу вместо *трет*-бутильной и поэтому образует менее эффективные взаимодействия в кармане по сравнению с **62**.

Адамантильные группы **79** (рис. 45А) и **81**, схожим образом располагающиеся в сайте связывания, чрезвычайно хорошо вписываются в гидрофобную полость кармана, образованную Ile199, Ala212 и Ala274, в то время как *трет*-бутильная группа контактирует с Ala47. Также образуются водородные связи с His275 и Tyr132. Замена *трет*-бутильного остатка меньшим по объему (**77**, **78**, **80**), а также уменьшение длины алифатической цепи линкера с адамантилом (**74** и **75**) нарушают эти взаимодействия.

Оптимальная ориентация одного из наиболее активных соединений **73** значительно отличается от ориентаций всех остальных активных соединений (рис. 45Б): его тетраметиленовое кольцо располагается глубоко в кармане, водородные связи могут образовываться между атомом азота в положении 3 и гидроксильной группой Tyr132, а также между карбонильным атомом кислорода Ile148 и аминогруппой **73**.

По-видимому, водородные связи имеют значительное влияние на аффинность полученных соединений, в то время как для хирального соединения **84** ключевую роль играют гидрофобные взаимодействия. Два энантиомера **84** (рис. 45В), согласно результатам докинга, связываются в гидрофобных областях кармана противоположными способами.

Способ связывания **86** кардинальным образом отличается от всех остальных соединений благодаря  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействиям между Tyr49 и кольцом пиримидин-N-оксида (рис. 45Г), хотя описанное для других соединений гидрофобное взаимодействие между адамантильным заместителем и остатками Ile199, Ala212 и Ala274, а также между циклогексильным кольцом и Ala47 имеют место и в случае **86**.

Основываясь на результатах докинга, можно предложить несколько возможных направлений для дальнейшего исследования связей между структурой и активностью соединений из данного класса: модификация тетраметиленового фрагмента путем введения различных заместителей и варьирование размеров кольца для исследования возможности связывания в более глубоких областях кармана, а также для увеличения растворимости. Также

необходимо провести анализ заместителей R для наиболее активных соединений **73**, **79**, **81**, **86**, с целью оптимизации токсичности и активности, Уникальные способы связывания соединений **73** и **86** открывают другой путь структурной оптимизации – путем анализа влияния заместителей в фенильном кольце.

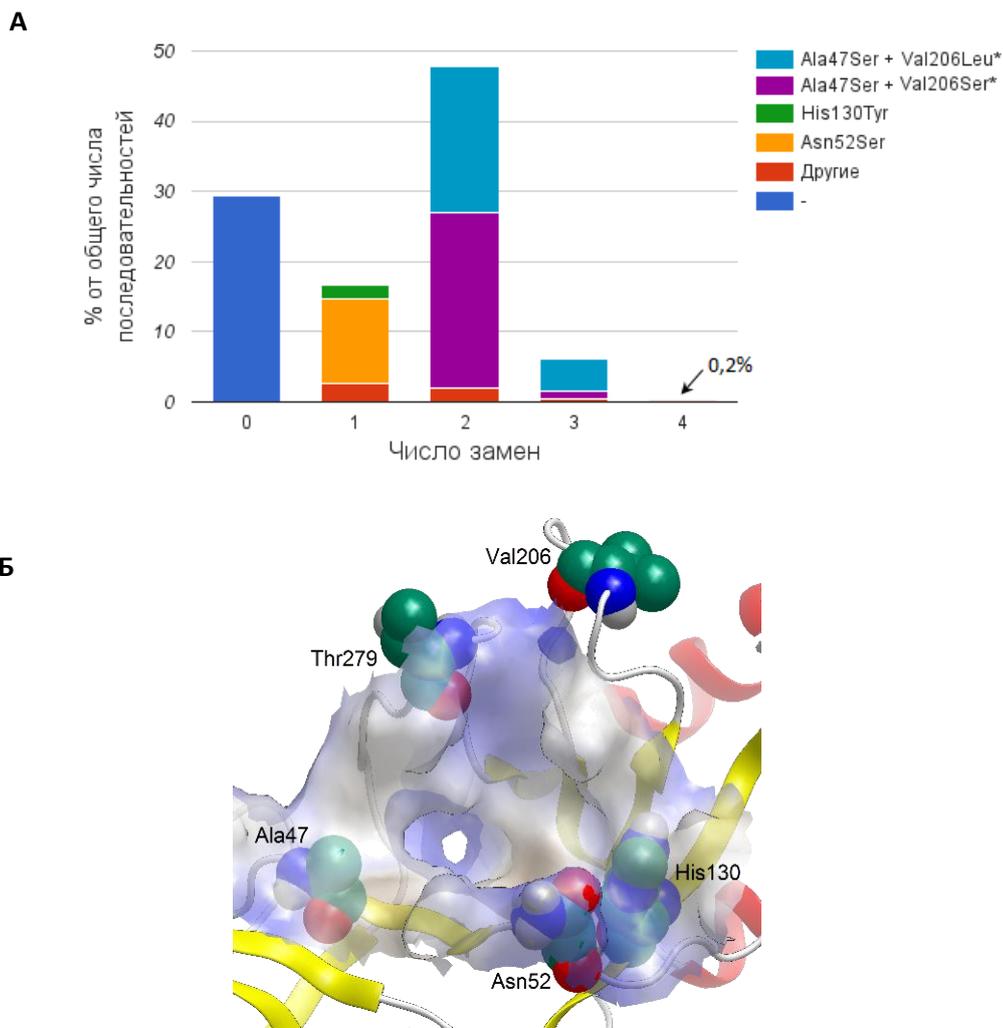
## ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ 4-АМИНОТЕТРАГИДРОХИНАЗОЛИН-N-ОКСИДОВ ПРОТИВ РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ ВКЭ

Препарат для лечения клещевого энцефалита должен ингибировать репродукцию как можно большего числа различных штаммов ВКЭ, так как на одной и той же территории могут циркулировать различные варианты вируса. Чтобы оценить, является ли карман белка sE подходящей мишенью для ингибиторов репродукции ВКЭ широкого спектра действия против различных штаммов, мы оценили вариабельность аминокислотного состава белка в регионе кармана. Для соединений из серии 4-аминотетрагидрохиназолинов, в предыдущих экспериментах проявивших активность против штамма Абсеттаров, была изучена ингибиторная активность в отношении различных штаммов ВКЭ, принадлежащих всем известным подтипам и несущим аминокислотные замены в регионе кармана.

### 5.1. Анализ мутаций в кармане ВКЭ

Ранее сообщалось о влиянии аминокислотного состава кармана на рН перехода димер - тример и инфекционность вирусных частиц (см. раздел 4.3.1 обзора литературы), однако анализ консервативности аминокислотных последовательностей этого региона среди флавивирусов не проводился. Для того, чтобы оценить вариабельность аминокислотного состава карманов связывания  $\beta$ -OG ВКЭ, из базы GenBank были извлечены последовательности белков оболочки E ВКЭ различных штаммов, содержащие, как минимум, остатки с 46 по 285, так как в данный регион попадают все остатки, формирующие карман (рис. 27). Общее число последовательностей составило 568 (дата доступа – 26.10.2015).

По сравнению со штаммом Абсеттаров, 166 последовательностей не содержали замен в области кармана (рис. 45). Последовательностей с мутациями в глубине кармана не удалось обнаружить. У 401 последовательности наиболее часто встречались двойные замены Ala47Ser + Val206Ser/Leu, лежащие на периферии кармана. В редких случаях они могли дополняться еще одной мутацией – самая частая комбинация Ala47Ser + Val206Leu + Thr279Ala встречалась в 2% последовательностей. Наиболее распространенной одиночной заменой, встречавшейся в 12% последовательностей, являлась Asn52Ser. Нами не было обнаружено последовательностей, которые бы содержали в области кармана более 4 замен. Все описанные вариабельные аминокислоты лежат на периферии кармана. Таким образом, почти треть последовательностей ВКЭ имеет полностью идентичный состав карманов белка sE, оставшиеся представители несут не более 4 замен в ограниченном числе позиций на периферии кармана. Это свидетельствует в пользу использования кармана белка sE ВКЭ как мишени противовирусных соединений с широким спектром действия.



**Рисунок 45. А) Распределение количества аминокислотных замен и Б) их расположение в кармане.**

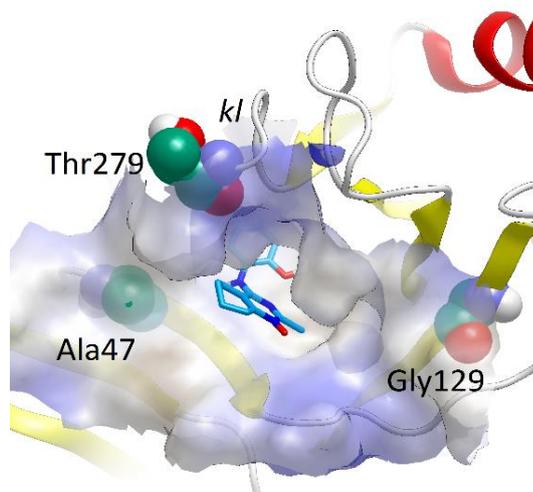
\* - Комбинация встречается и в составе тройных замен.

## 5.2. Используемые штаммы

В коллекции штаммов ВКЭ лаборатории биологии арбовирусов ФГБНУ ИПВЭ им. М. П. Чумакова нами также не были обнаружены штаммы, несущие замены в глубине кармана, поэтому для определения спектра действия 9 ингибиторов репродукции ВКЭ – производных пиримидин N-оксидов, из лабораторной коллекции были отобраны 7 штаммов, относящихся к 3 подтипам ВКЭ и содержащих замены по сравнению со штаммом Абсеттаров (табл. 20), которые лежат на периферии кармана  $\beta$ -OG (рис. 46).

**Таблица 20.** Аминокислотные замены в белке Е отобранных для тестирования соединений штаммов по сравнению со штаммом Абсеттаров. Желтым выделены позиции, лежащие на периферии кармана β-OG.

Подтип	Штамм	Идентичность белку Е Абсеттаров, %	№ остатка																																			
			41	47	81	88	115	119	120	129	175	178	206	216	218	228	234	267	277	279	306	313	315	317	331	349	407	426	431	433	437	448	457	458	460	462	463	
Европейский	Абсеттаров		M	A	T	G	A	A	A	G	T	E	V	H	D	K	N	A	E	T	M	T	K	A	T	S	K	A	S	I	V	I	K	L	L	V	A	
	256	100																																				
Сибирский	Васильченко	96,3		S		S	T	V				D	L	R				Q	S	D	A		A		T		F	R	T	T	V	L						
	ТВ08-T2546	96,1	L	S		A	S	T				D	L		E		H	S	D					T			R	T	T	V	L		R			A		
	Лесопарк11	96,7		S		S	T					D	L			R	H	S	D					A		T			R	T	A	V	L					
	ЭК-328	96,5		S		S	T				N	D	L			R	H	S	D					R		T			R	T	T	V	L					
Дальне-восточный	205КГГ	96,3		S		S	T	S				D	S			R	S	D					T			T	A		R	T	T	V	L					
	ДВ 936к	95,7		S		S	T	S	E			D	S					S	D							I	A		R	T	A	V	L	L		I	V	V



**Рисунок 46.** Расположение аминокислотных остатков ВКЭ Абсеттаров, которые заменены в отобранных штаммах коллекции. Для ориентира приведена структура соединения 73.

Штамм 256 относится к европейскому подтипу и не содержит аминокислотных замен в белке Е по сравнению со штаммом Абсеттаров. Штамм Васильченко сибирского подтипа по сравнению со штаммом Абсеттаров несет две замены в кармане β-OG – Ala47Ser + Thr279Ala, которые встречаются относительно часто среди последовательностей sE из базы GenBank. Относящиеся к сибирскому подтипу штаммы ТВ08-T2546, ЭК-328 и Лесопарк11, а также относящийся к дальневосточному подтипу штамм 205КГГ различаются по степени идентичности последовательности Е штамма Абсеттаров, но имеют одинаковую замену в кармане β-OG – Ala47Ser. Белок Е штамма ДВ936к дальневосточного подтипа имеет наименьшее сходство со штаммом Абсеттаров и несет 2 замены в кармане - Ala47Ser + Gly129Glu.

### 5.3. Спектр активности 4-аминотетрагидрохиназолинов

Для определения активности соединений против отобранных штаммов были измерены значения  $EC_{50}$  в опыте по ингибированию образования бляшек в культуре клеток СПЭВ (табл. 21).

**Таблица 21.** Активность производных тетрагидрохиназолин-N-оксида против различных штаммов ВКЭ. Ячейки окрашены в зависимости от значений  $EC_{50}$  – от красного для неактивных (н. а.) до темно-зеленого для наиболее активных.

Штамм	Титр (БОЕ/лунку)	Соединение / $EC_{50}$ , мкМ							
		60	73	78	79	81	83	84	86
Абсеттаров	34	31 ± 5	8 ± 3	35 ± 2	6 ± 2	6 ± 3	8 ± 3	4 ± 1	23 ± 6
256	21	н. а.	21 ± 2	н. а.	н. а.	н. а.	н. а.	26 ± 2	н. а.
Васильченко	28	н. а.	3,4 ± 0,2	н. а.	13 ± 2	16 ± 2	16 ± 2	4,3 ± 0,3	н. а.
ТВ08-Т2546	20	18 ± 4	4,0 ± 0,4	25 ± 3	7 ± 2	11,4 ± 0,9	15 ± 2	3,3 ± 0,4	29 ± 1
Лесопарк11	20	н. а.	6,5 ± 0,1	н. а.	6,0 ± 1,5	4,4 ± 0,2	23 ± 4	9 ± 1	35 ± 5
ЭК-328	30	н. а.	12 ± 1	н. а.	9,7 ± 0,7	7,5 ± 0,6	15,0 ± 0,2	10,1 ± 0,9	39 ± 2
205КГГ	20	н. а.	7,0 ± 0,2	н. а.	6,9 ± 0,8	8,3 ± 0,4	10,9 ± 0,5	4,1 ± 0,3	37 ± 1
ДВ 936к	27	18 ± 3	7,4 ± 0,3	н. а.	6,5 ± 0,6	5 ± 2	14,7 ± 0,1	4,3 ± 0,1	12 ± 2

Соединение **62**, проявившее слабую активность против 20 ФОЕ ВКЭ штамма Абсеттаров, оказалось неактивным против сопоставимого числа БОЕ других штаммов. Соединение **60**, молекула которого отличается от остальных самым маленьким размером, проявило активность лишь против штаммов ТВ08-Т2546 и ДВ936к. Следующие по значению  $EC_{50}$  против ВКЭ Абсеттаров, соединение **78**, активно лишь против штамма ТВ08-Т2546. Соединение **86** проявило среднюю активность против большинства штаммов, за исключением Васильченко и 256.

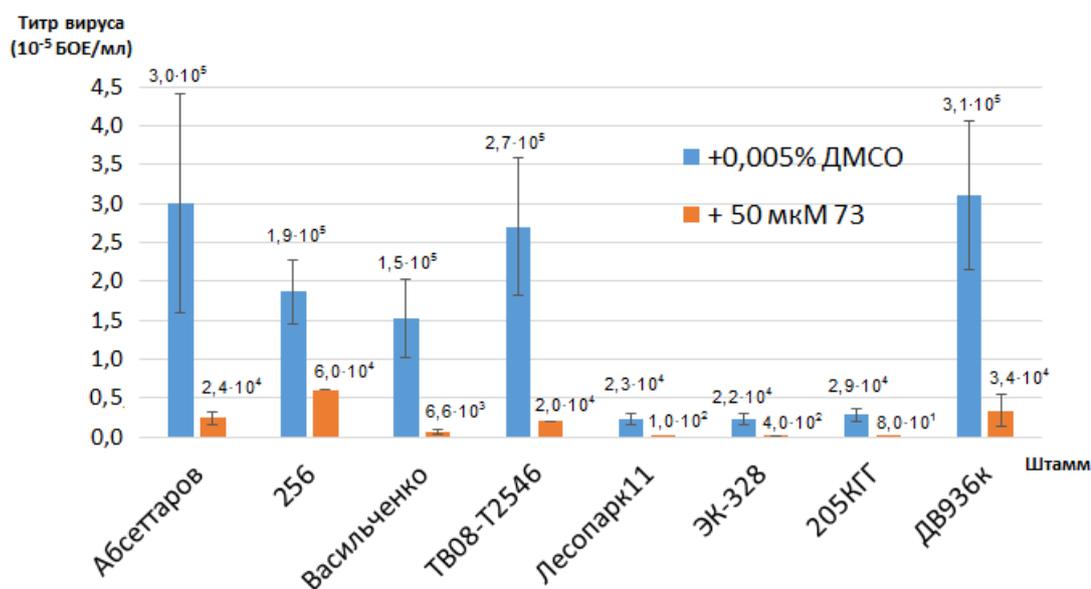
Против всех исследованных штаммов наиболее активными оказались соединения **73** и **84**. Эти соединения были единственными, способными подавить репродукцию штамма 256, однако с более высокими значениями  $EC_{50}$  по сравнению с остальными штаммами.

Таким образом, были идентифицированы соединения, обладающие широким спектром активности, что выражается в способности ингибировать репродукцию различных штаммов, относящихся к разным подтипам ВКЭ. Соединения, наиболее активные против референсного штамма Абсеттаров, являются наиболее активными и против остальных штаммов. Вероятно, генотип ВКЭ и аминокислотные замены на периферии кармана белка sE оказывают малое влияние на активность соединений.

#### 5.4. Снижение титров вирусов под действием соединения 73 в концентрации 50 мкМ

Для соединения **73**, обладающего лучшими значениями  $EC_{50}$  против различных штаммов ВКЭ и наименее цитотоксичного, было измерено снижение титров вирусов этих штаммов под действием **73** в концентрации 50 мкМ (рис.47).

Наиболее значительное снижение титра наблюдается для штамма Абсеттаров и ДВ936к (подавление образования  $2,76 \cdot 10^5$  БОЕ/мл). Чуть менее активно соединение **73** против штамма ТВ08-Т2546, Васильченко и 256 (табл. 22). Невысокие исходные титры штаммов ЭК-328, Лесопарк11 и 205КГГ (рис. 47) под действием соединения снижаются лишь на  $2 - 3 \cdot 10^4$  БОЕ/мл. Однако в относительном выражении соединение **73** ингибирует почти 100% образования БОЕ вируса штамма 205КГГ и Лесопарк11 и чуть менее эффективно против штамма ЭК-328 (98%). Для штаммов Васильченко и Абсеттаров происходит подавление образования 93 – 92% бляшек, для ДВ936к – 89%, для штамма 256 – лишь 68%.



**Рисунок 47.** Титры ВКЭ различных штаммов в присутствии соединения **73** в концентрации 50 мкМ или соответствующего объема ДМСО.

Как отмечалось ранее, против штамма 256 оказались активны лишь 2 соединения – **73** и **84**. Исходя из идентичности белковых последовательностей, можно было бы предположить и сходное действие ингибиторов на белки Е этих штаммов. Однако зараженные клетки могут производить не только полноценные инфекционные вирионы, но и вирусоподобные частицы, не содержащие РНК и вследствие этого не участвующие в репродукции вируса. Более того, вирионы могут значительно различаться по степени созревания, что может оказывать влияние на их инфекционность (см. раздел 2.4.1 и 2.4.3 обзора литературы). Все эти частицы покрыты белками оболочки, с карманами которых могут взаимодействовать малые молекулы. Способность таких частиц к репликации различается – для вирусных образцов, которые характеризуются высоким содержанием неинфекционных частиц и дефектных вирионов,

часть молекул ингибитора может работать «вхолостую», связываясь с белками Е не задействованными в репродукции вируса частиц.

**Таблица 22.** Ингибирование роста бляшек в присутствии соединения **73** в концентрации 50 мкМ.

Штамм	Абсолютное снижение титра вируса, БОЕ/мл	Подавление образования БОЕ в % от контроля
Абсеттаров	$2,76 \cdot 10^5$	92,0
256	$1,27 \cdot 10^5$	67,9
Васильченко	$1,47 \cdot 10^5$	95,7
ТВ08-Т2546	$2,50 \cdot 10^5$	92,6
Лесопарк11	$2,26 \cdot 10^4$	99,6
ЭК-328	$2,16 \cdot 10^4$	98,2
205КГГ	$2,88 \cdot 10^4$	99,7
ДВ936к	$2,76 \cdot 10^5$	89,0

Таким образом, нами была выдвинута гипотеза о том, что соотношение между количеством белка Е, который входит в состав инфекционных вирионов, способных давать потомство, и количеством белка, формирующего не способные к репродукции частицы, является фактором, оказывающим значительное влияние на определение активности ингибиторов репродукции.

### **5.5. Характеристика образцов вирусов, использованных в работе штаммов**

Для проверки описанной гипотезы с помощью метода иммуноферментного анализа было измерено содержание белка Е в образцах проб использованных в работе суспензий вирусов различных штаммов, а также с помощью метода ПЦР с детекцией в реальном времени было измерено соответствующее количество копий вирусной РНК<sup>3</sup>. Эти данные были сопоставлены с титрами вирусов, измеренными по образованию БОЕ в культуре клеток СПЭВ (табл. 22 и рис. 48).

Учитывая, что каждая бляшка образуется в результате размножения одной вирусной частицы, отношение количества бляшек к количеству копий РНК соответствует отношению числа инфекционных вирионов к общему числу РНК-содержащих частиц (предполагается, что РНК не может существовать без белковой оболочки ввиду ее быстрой деградации РНКазами). Среди всех штаммов наибольшим это значение является у штамма Васильченко – оцененное

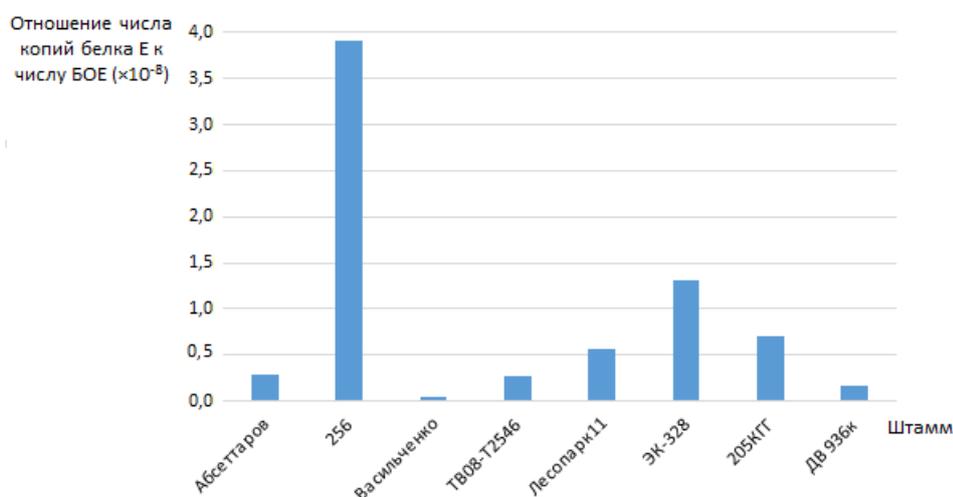
<sup>3</sup> Данная часть работы была выполнена совместно с аспирантом лаборатории биологии арбовирусов ФГБНУ ИПВЭ им. М. П. Чумакова Тучинской К. К. и студентом биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова Волоком В. П.

количество инфекционных частиц – 1,8%, наименьший процент инфекционных частиц отмечается у штамма ЭК-328 – 0,004%. У штамма 256 наблюдается сопоставимое со штаммом Абсеттаров содержание инфекционных вирионов. Однако количество копий белка Е, приходящееся на одно и то же количество инфекционных частиц для штамма 256 сильно превышает соответствующие значения для остальных штаммов, что свидетельствует о высоком содержании пустых вирусоподобных частиц.

**Таблица 23.** Характеристики образцов вирусных суспензий.

Штамм	$\log_{10}$ БОЕ/мл	$\log_{10}$ копий РНК/мл	Относительное число инфекционных частиц (в % от общего числа РНК-содержащих частиц)	Белок Е (мкг/мл)	Отношение числа копий белка Е* к числу БОЕ
Абсеттаров	$4,51 \pm 0,25$	$7,99 \pm 0,21$	0,033	$0,08 \pm 0,01$	$2,84 \times 10^7$
256	$4,47 \pm 0,27$	$8,05 \pm 0,38$	0,026	$1,0 \pm 0,2$	$3,91 \times 10^8$
Васильченко	$4,91 \pm 0,28$	$6,66 \pm 0,43$	1,787	$0,038 \pm 0,009$	$5,34 \times 10^6$
ТВ08-Т2546	$4,38 \pm 0,39$	$7,22 \pm 0,44$	0,144	$0,058 \pm 0,005$	$2,76 \times 10^7$
Лесопарк	$4,07 \pm 0,44$	$7,47 \pm 0,58$	0,039	$0,06 \pm 0,01$	$5,60 \times 10^7$
ЭК-328	$3,69 \pm 0,71$	$8,06 \pm 0,50$	0,004	$0,056 \pm 0,04$	$1,31 \times 10^8$
205КГГ	$3,96 \pm 0,54$	$7,25 \pm 0,50$	0,051	$0,057 \pm 0,07$	$7,07 \times 10^7$
ДВ936к	$5,42 \pm 0,18$	$8,09 \pm 0,36$	0,213	$0,4 \pm 0,2$	$1,71 \times 10^7$

\* Количество копий белка Е было рассчитано исходя из средней молекулярной массы белка Е ВКЭ 53 кДа.



**Рисунок 48.** Отношение числа копий белка sE (копий/мл) к числу БОЕ (БОЕ/мл).

Высокое содержание белка Е, не участвующего в формировании инфекционных вирионов, объясняет данные по активности соединений против штамма 256: для

ингибирования образования равного количества бляшек в случае штамма 256 требуется большее количество вещества, чем для штамма Абсеттаров, так как в образцах штамма 256 содержится большее число неинфекционных частиц, способных связывать молекулы ингибитора, но не участвующих в репликации вируса.

На содержание неинфекционных вирусных частиц и дефектных вирионов могут оказывать влияние как свойства самого штамма (точность вирусной полимеразы и свойства вирусных белков, отвечающих за эффективность сборки вирионов), так и способ получения проб вирусного препарата (множественность заражения клеток, выраженность цитопатического действия на момент сбора вирусосодержащей культуральной жидкости, условия и сроки хранения препаратов).

По-видимому, именно этот параметр – соотношение между количеством молекул белка Е и количеством инфекционных вирионов – является критическим фактором, влияющим на определение активности ингибиторов репродукции.

### **5.6. Заключение**

По результатам проведенных исследований можно сделать вывод, что критическим фактором, влияющим на определение активности действующих на белки оболочки ингибиторов репродукции вирусов, является соотношение между содержанием неинфекционных частиц и инфекционных вирионов в вирусном образце. Это обстоятельство необходимо учитывать при выборе и характеристике штаммов для тестирования противовирусных соединений, а также при сравнении активностей ингибиторов путем оценки содержания не входящего в состав инфекционных частиц белка Е. По-видимому, отношение к различным подтипам и замены на периферии кармана белков Е различных штаммов оказывают малое влияние на активность низкомолекулярных соединений. В нашем случае штамм Абсеттаров был выбран в качестве референсного безотносительно к процессу разработки лекарств, но ввиду высокого содержания инфекционных вирионов по отношению к неинфекционным частицам, такой выбор оказался удачным и это позволило не отсеивать данные о соединениях со средней или низкой активностью, что важно для анализа взаимосвязей между структурой и активностью. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наличие у соединения высокой активности против штамма Абсеттаров, вероятно, можно использовать в качестве предиктора активности против широкого спектра штаммов ВКЭ, при этом сохраняя максимальное химическое разнообразие структур. Тестирование потенциальных ингибиторов репродукции против штаммов с высоким содержанием неинфекционных частиц, к примеру, 256, является важным этапом в исследовании ингибиторной активности соединений, действующих на белки оболочки вирусов.

Идентифицированные в ходе работы соединения **73** и **84** оказались способными ингибировать репродукцию всех исследованных штаммов, включая штамм 256 с высоким содержанием неинфекционных частиц, что свидетельствует о перспективности дальнейшей разработки этих соединений.

## ВЫВОДЫ

- 1) Методом моделирования по гомологии построены модели пространственной структуры белков оболочки sE вирусов клещевого энцефалита и Повассан. Охарактеризованы потенциальные карманы связывания низкомолекулярных соединений в моделях белков sE. С помощью полученных моделей впервые проведен основанный на структуре биомиметического дизайна ингибиторов слияния флавивирусов, переносимых клещами.
- 2) Проведен виртуальный скрининг методом докинга в карманы моделей белков sE библиотеки из 5886 низкомолекулярных гетероциклических соединений. Для 89 отобранных соединений экспериментально определена цитотоксичность и активность против вируса клещевого энцефалита и Повассан в культуре клеток. Для 7 соединений, принадлежащих к классам 1,4-дигидропиридинов и 1,3,5-тиадиазин-2-онов, установлено наличие ингибиторной активности в отношении вируса клещевого энцефалита с лучшим значением  $EC_{50} = 70$  нМ, для 2 соединений установлена активность против обоих вирусов.
- 3) По результатам докинга 2,6-замещенных 4-фторпиримидин-N-оксидов предложена серия из 27 производных 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксида с объемными заместителями. Экспериментально показана активность 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксидов против 8 различных штаммов вируса клещевого энцефалита, относящихся ко всем известным подтипам. На примере этих соединений впервые продемонстрирована возможность ингибирования репродукции вируса клещевого энцефалита разных штаммов и подтипов. Изучены взаимосвязи между структурой и противовирусной активностью 4-аминотетрагидрохиназолин-N-оксидов.
- 4) На основе сравнительного моделирования молекулярной динамики различных форм белков оболочки sE показано, что связывание с найденным ингибитором приводит к увеличению подвижности белка sE, что может быть ассоциировано со снижением инфекционности вирионов.
- 5) Анализ влияния порядка добавления соединений и инфицирования клеток на значение  $EC_{50}$  свидетельствует о том, что противовирусная активность идентифицированных ингибиторов является результатом специфического взаимодействия соединений с поверхностью вириона на стадии его проникновения в клетку.
- 6) Показано влияние содержания белка E, не задействованного в формировании инфекционных вирионов, на определение ингибиторной активности низкомолекулярных соединений, что необходимо учитывать при подготовке и характеристике вирусных препаратов для тестирования соединений, а также при сравнении их активности.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Suss J. Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-an overview // *Ticks Tick Borne Dis.* – 2011. – Vol. 2, № 1. – P. 2-15.
2. Heinz F. X., Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines // *Vaccine.* – 2012. – Vol. 30, № 29. – P. 4301-4306.
3. WHO. Vaccines against tick-borne encephalitis: WHO position paper // *Weekly epidemiological record.* – 2011. – Vol. 86, № 24. – P. 241–256.
4. Роспотребнадзор. Об эпидемиологической ситуации по инфекциям, передающимся клещами, на территории Российской Федерации в 2014 году и прогнозе на 2015 год. – 2015: [http://rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/835/ob-epidsituatsii-po-infektsiyam\\_-peredayushch.-kleshchami\\_-na-terr.-rf-v-2014-g.pdf](http://rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/835/ob-epidsituatsii-po-infektsiyam_-peredayushch.-kleshchami_-na-terr.-rf-v-2014-g.pdf).
5. Mansfield K. L., Johnson N., Phipps L. P., Stephenson J. R., Fooks A. R., Solomon T. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis // *J Gen Virol.* – 2009. – Vol. 90, № Pt 8. – P. 1781-1794.
6. Chernokhaeva L. L., Rogova Y. V., Vorovitch M. F., Romanova L., Kozlovskaya L. I., Maikova G. B., Kholodilov I. S., Karganova G. G. Protective immunity spectrum induced by immunization with a vaccine from the TBEV strain Sofjin // *Vaccine.* – 2016. – Vol. 34, № 20. – P. 2354-2361.
7. *Fields virology.* / Knipe D. M., Howley P. M. – Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2013.
8. Zhou Z., Khaliq M., Suk J. E., Patkar C., Li L., Kuhn R. J., Post C. B. Antiviral compounds discovered by virtual screening of small-molecule libraries against dengue virus E protein // *ACS Chem Biol.* – 2008. – Vol. 3, № 12. – P. 765-775.
9. Modis Y., Ogata S., Clements D., Harrison S. C. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2003. – Vol. 100, № 12. – P. 6986-6991.
10. *Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses : ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* / International Committee on Taxonomy of Viruses., King A. M. Q. – London ; Waltham, MA: Academic Press, 2012.
11. Silber L. A., Soloviev V. D. Far Eastern tick-borne spring-summer (spring) encephalitis // *Am Rev Sov Med.* – 1946. – Vol. Spec Suppl. – P. 1-80.
12. Ecker M., Allison S. L., Meixner T., Heinz F. X. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia // *J Gen Virol.* – 1999. – Vol. 80, № Pt 1. – P. 179-185.
13. Kaiser R. The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98: a prospective study of 656 patients // *Brain.* – 1999. – Vol. 122, № Pt 11. – P. 2067-2078.
14. Lindquist L., Vapalahti O. Tick-borne encephalitis // *Lancet.* – 2008. – Vol. 371, № 9627. – P. 1861-1871.
15. Demina T. V., Dzhioev Y. P., Verkhozina M. M., Kozlova I. V., Tkachev S. E., Plyusnin A. K., Doroshchenko E. K., Lisak O. V., Zlobin V. I. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes // *J Med Virol.* – 2010. – Vol. 82, № 6. – P. 965-976.
16. Demina T. V., Dzhioev Y. P., Kozlova I. V., Verkhozina M. M., Tkachev S. E., Doroshchenko E. K., Lisak O. V., Paramonov A. I., Zlobin V. I. Genotypes 4 and 5 of the tick-borne encephalitis virus: features of the genome structure and possible scenario for its formation // *Vopr Virusol.* – 2012. – Vol. 57, № 4. – P. 13-19.
17. Kerbo N., Donchenko I., Kutsar K., Vasilenko V. Tickborne encephalitis outbreak in Estonia linked to raw goat milk, May-June 2005 // *Euro Surveill.* – 2005. – Vol. 10, № 6. – P. E050623 2.
18. Caini S., Szomor K., Ferenczi E., Szekelyne Gaspar A., Csohan A., Krisztalovics K., Molnar Z., Horvath J. Tick-borne encephalitis transmitted by unpasteurised cow milk in western Hungary, September to October 2011 // *Euro Surveill.* – 2012. – Vol. 17, № 12.
19. Погодина В. В. Алиментарное заражение клещевым энцефалитом (эпидемиология, экспериментальное обоснование): автореф. дисс. – В.В. Погодина – М., 1958.
20. Charrel R. N., Attoui H., Butenko A. M., Clegg J. C., Deubel V., Frolova T. V., Gould E. A., Gritsun T. S., Heinz F. X., Labuda M., Lashkevich V. A., Loktev V., Lundkvist A., Lvov D. V., Mandl C. W., Niedrig M., Papa

- A., Petrov V. S., Plyusnin A., Randolph S., Suss J., Zlobin V. I., de Lamballerie X. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe // *Clin Microbiol Infect.* – 2004. – Vol. 10, № 12. – P. 1040-1055.
21. Gritsun T. S., Lashkevich V. A., Gould E. A. Tick-borne encephalitis // *Antiviral Res.* – 2003. – Vol. 57, № 1-2. – P. 129-146.
22. Dobler G. Zoonotic tick-borne flaviviruses // *Vet Microbiol.* – 2010. – Vol. 140, № 3-4. – P. 221-228.
23. Sips G. J., Wilschut J., Smit J. M. Neuroinvasive flavivirus infections // *Rev Med Virol.* – 2012. – Vol. 22, № 2. – P. 69-87.
24. European Centre for Disease Prevention and Control. Epidemiological situation of tick-borne encephalitis in the European Union and European Free Trade Association countries. // *Epidemiological situation of tick-borne encephalitis in the European Union and European Free Trade Association countries.* / Stockholm, 2012.
25. Amicizia D., Domnich A., Panatto D., Lai P. L., Cristina M. L., Avio U., Gasparini R. Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in Europe and its prevention by available vaccines // *Hum Vaccin Immunother.* – 2013. – Vol. 9, № 5. – P. 1163-1171.
26. Носков А. К., Ильин В. П., Андаев Е. И., Пакскина Н. Д., Веригина Е. В., Балахонов С. В. Заболеваемость клещевым вирусным энцефалитом в Российской Федерации и по федеральным округам в 2009–2013 гг., эпидемиологическая ситуация в 2014 г. и прогноз на 2015 г. // *Проблемы особо опасных инфекций.* – 2015. № 1.
27. Роспотребнадзор. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации за январь–декабрь 2015 года (по данным формы №1 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях»), 2016.
8. Mc L. D., Donohue W. L. Powassan virus: isolation of virus from a fatal case of encephalitis // *Can Med Assoc J.* – 1959. – Vol. 80, № 9. – P. 708-711.
29. Lindsey N. P., Lehman J. A., Staples J. E., Fischer M. West Nile Virus and Other Nationally Notifiable Arboviral Diseases - United States, 2014 // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* – 2015. – Vol. 64, № 34. – P. 929-934.
30. Hinten S. R., Beckett G. A., Gensheimer K. F., Pritchard E., Courtney T. M., Sears S. D., Woytowicz J. M., Preston D. G., Smith R. P., Jr., Rand P. W., Lacombe E. H., Holman M. S., Lubelczyk C. B., Kelso P. T., Beelen A. P., Stobierski M. G., Sotir M. J., Wong S., Ebel G., Kosoy O., Piesman J., Campbell G. L., Marfin A. A. Increased recognition of Powassan encephalitis in the United States, 1999-2005 // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2008. – Vol. 8, № 6. – P. 733-740.
31. Leonova G. N., Kondratov I. G., Ternovoi V. A., Romanova E. V., Protopopova E. V., Chausov E. V., Pavlenko E. V., Ryabchikova E. I., Belikov S. I., Loktev V. B. Characterization of Powassan viruses from Far Eastern Russia // *Arch Virol.* – 2009. – Vol. 154, № 5. – P. 811-820.
32. Kuno G., Artsob H., Karabatsos N., Tsuchiya K. R., Chang G. J. Genomic sequencing of deer tick virus and phylogeny of powassan-related viruses of North America // *Am J Trop Med Hyg.* – 2001. – Vol. 65, № 5. – P. 671-676.
33. Ebel G. D., Campbell E. N., Goethert H. K., Spielman A., Telford S. R., 3rd. Enzootic transmission of deer tick virus in New England and Wisconsin sites // *Am J Trop Med Hyg.* – 2000. – Vol. 63, № 1-2. – P. 36-42.
34. Dupuis A. P., 2nd, Peters R. J., Prusinski M. A., Falco R. C., Ostfeld R. S., Kramer L. D. Isolation of deer tick virus (Powassan virus, lineage II) from *Ixodes scapularis* and detection of antibody in vertebrate hosts sampled in the Hudson Valley, New York State // *Parasit Vectors.* – 2013. – Vol. 6. – P. 185.
35. Piantadosi A., Rubin D. B., McQuillen D. P., Hsu L., Lederer P. A., Ashbaugh C. D., Duffalo C., Duncan R., Thon J., Bhattacharyya S., Basgoz N., Feske S. K., Lyons J. L. Emerging Cases of Powassan Virus Encephalitis in New England: Clinical Presentation, Imaging, and Review of the Literature // *Clin Infect Dis.* – 2016. – Vol. 62, № 6. – P. 707-713.
36. El Khoury M. Y., Camargo J. F., Wormser G. P. Changing epidemiology of Powassan encephalitis in North America suggests the emergence of the deer tick virus subtype // *Expert Rev Anti Infect Ther.* – 2013. – Vol. 11, № 10. – P. 983-985.
37. Ebel G. D., Kramer L. D. Short report: duration of tick attachment required for transmission of powassan virus by deer ticks // *Am J Trop Med Hyg.* – 2004. – Vol. 71, № 3. – P. 268-271.
38. Centers for Disease Control and Prevention. USA human Powassan virus cases reported to CDC // *USA human Powassan virus cases reported to CDC, 2015.*

39. Nofchissey R. A., Deardorff E. R., Blevins T. M., Anishchenko M., Bosco-Lauth A., Berl E., Lubelczyk C., Mutebi J. P., Brault A. C., Ebel G. D., Magnarelli L. A. Seroprevalence of Powassan virus in New England deer, 1979-2010 // *Am J Trop Med Hyg.* – 2013. – Vol. 88, № 6. – P. 1159-1162.
40. Rice C. M., Lenches E. M., Eddy S. R., Shin S. J., Sheets R. L., Strauss J. H. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution // *Science.* – 1985. – Vol. 229, № 4715. – P. 726-733.
41. Pletnev A. G., Yamshchikov V. F., Blinov V. M. Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the polyprotein of tick-borne encephalitis virus // *Virology.* – 1990. – Vol. 174, № 1. – P. 250-263.
42. Li L., Lok S. M., Yu I. M., Zhang Y., Kuhn R. J., Chen J., Rossmann M. G. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation // *Science.* – 2008. – Vol. 319, № 5871. – P. 1830-1834.
43. Rey F. A. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2003. – Vol. 100, № 12. – P. 6899-6901.
44. Watterson D., Modhiran N., Young P. R. The many faces of the flavivirus NS1 protein offer a multitude of options for inhibitor design // *Antiviral Res.* – 2016. – Vol. 130. – P. 7-18.
45. Nitsche C., Holloway S., Schirmeister T., Klein C. D. Biochemistry and medicinal chemistry of the dengue virus protease // *Chem Rev.* – 2014. – Vol. 114, № 22. – P. 11348-11381.
46. Li H., Clum S., You S., Ebner K. E., Padmanabhan R. The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids // *J Virol.* – 1999. – Vol. 73, № 4. – P. 3108-3116.
47. Botting C., Kuhn R. J. Novel approaches to flavivirus drug discovery // *Expert Opin Drug Discov.* – 2012. – Vol. 7, № 5. – P. 417-428.
48. Zmurko J., Neyts J., Dallmeier K. Flaviviral NS4b, chameleon and jack-in-the-box roles in viral replication and pathogenesis, and a molecular target for antiviral intervention // *Rev Med Virol.* – 2015. – Vol. 25, № 4. – P. 205-223.
49. Dong H., Zhang B., Shi P. Y. Flavivirus methyltransferase: a novel antiviral target // *Antiviral Res.* – 2008. – Vol. 80, № 1. – P. 1-10.
50. Noble C. G., Chen Y. L., Dong H., Gu F., Lim S. P., Schul W., Wang Q. Y., Shi P. Y. Strategies for development of Dengue virus inhibitors // *Antiviral Res.* – 2010. – Vol. 85, № 3. – P. 450-462.
51. Stevens A. J., Gahan M. E., Mahalingam S., Keller P. A. The medicinal chemistry of dengue fever // *J Med Chem.* – 2009. – Vol. 52, № 24. – P. 7911-7926.
52. Gollins S. W., Porterfield J. S. pH-dependent fusion between the flavivirus West Nile and liposomal model membranes // *J Gen Virol.* – 1986. – Vol. 67, № Pt 1. – P. 157-166.
53. Pierson T. C., Kielian M. Flaviviruses: braking the entering // *Curr Opin Virol.* – 2013. – Vol. 3, № 1. – P. 3-12.
54. Chen Y., Maguire T., Marks R. M. Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells // *J Virol* – 1996. – Vol. 70, № 12. – P. 8765-8772.
55. Davis C. W., Nguyen H. Y., Hanna S. L., Sanchez M. D., Doms R. W., Pierson T. C. West Nile virus discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection // *J Virol* – 2006. – Vol. 80, № 3. – P. 1290-1301.
56. Kroschewski H., Allison S. L., Heinz F. X., Mandl C. W. Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus // *Virology.* – 2003. – Vol. 308, № 1. – P. 92-100.
57. Chen Y., Maguire T., Hileman R. E., Fromm J. R., Esko J. D., Linhardt R. J., Marks R. M. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate // *Nat.* – 1997. – Vol. Med 3, № 8. – P. 866-871.
58. Tassaneeritthep B., Burgess T. H., Granelli-Piperno A., Trumpfheller C., Finke J., Sun W., Eller M. A., Pattanapanyasat K., Sarasombath S., Birx D. L., Steinman R. M., Schlesinger S., Marovich M. A. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells // *J Exp Med.* – 2003. – Vol. 197, № 7. – P. 823-829.
59. Navarro-Sanchez E., Altmeyer R., Amara A., Schwartz O., Fieschi F., Virelizier J. L., Arenzana-Seisdedos F., Despres P. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses // *Embo Rep.* – 2003. – Vol. 4, № 7. – P. 723-728.

60. Davis C. W., Mattei L. M., Nguyen H. Y., Ansarah-Sobrinho C., Doms R. W., Pierson T. C. The location of asparagine-linked glycans on West Nile virions controls their interactions with CD209 (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin) // *J Biol Chem.* – 2006. – Vol. 281, № 48. – P. 37183-37194.
61. Dowd K. A., Pierson T. C. Antibody-mediated neutralization of flaviviruses: a reductionist view // *Virology.* – 2011. – Vol. 411, № 2. – P. 306-315.
62. Acosta E. G., Castilla V., Damonte E. B. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells // *Cell Microbiol.* – 2009. – Vol. 11, № 10. – P. 1533-1549.
63. van der Schaar H. M., Rust M. J., Chen C., van der Ende-Metselaar H., Wilschut J., Zhuang X., Smit J. M. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells // *PLoS Pathog.* – 2008. – Vol. 4, № 12. – P. e1000244.
64. Stiasny K., Heinz F. X. Flavivirus membrane fusion // *J Gen Virol.* – 2006. – Vol. 87, № Pt 10. – P. 2755-2766.
65. Zhang Y., Zhang W., Ogata S., Clements D., Strauss J. H., Baker T. S., Kuhn R. J., Rossmann M. G. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein // *Structure.* – 2004. – Vol. 12, № 9. – P. 1607-18.
66. Modis Y., Ogata S., Clements D., Harrison S. C. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein // *J Virol.* – 2005. – Vol. 79, № 2. – P. 1223-1231.
67. Zhang X., Ge P., Yu X., Brannan J. M., Bi G., Zhang Q., Schein S., Zhou Z. H. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution // *Nat Struct Mol Biol.* – 2013. – Vol. 20, № 1. – P. 105-110.
68. Kanai R., Kar K., Anthony K., Gould L. H., Ledizet M., Fikrig E., Marasco W. A., Koski R. A., Modis Y. Crystal structure of west nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes // *J Virol.* – 2006. – Vol. 80, № 22. – P. 11000-11008.
69. Nybakken G. E., Nelson C. A., Chen B. R., Diamond M. S., Fremont D. H. Crystal structure of the West Nile virus envelope glycoprotein // *J Virol.* – 2006. – Vol. 80, № 23. – P. 11467-11474.
70. Rey F. A., Heinz F. X., Mandl C., Kunz C., Harrison S. C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution // *Nature.* – 1995. – Vol. 375, № 6529. – P. 291-298.
71. Luca V. C., AbiMansour J., Nelson C. A., Fremont D. H. Crystal structure of the Japanese encephalitis virus envelope protein // *J Virol.* – 2012. – Vol. 86, № 4. – P. 2337-2346.
72. Dai L., Song J., Lu X., Deng Y. Q., Musyoki A. M., Cheng H., Zhang Y., Yuan Y., Song H., Haywood J., Xiao H., Yan J., Shi Y., Qin C. F., Qi J., Gao G. F. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody // *Cell Host Microbe.* – 2016. – Vol. 19, № 5. – P. 696-704.
73. Sirohi D., Chen Z., Sun L., Klose T., Pierson T. C., Rossmann M. G., Kuhn R. J. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus // *Science.* – 2016. – Vol. 352, № 6284. – P. 467-470.
74. Nayak V., Dessau M., Kucera K., Anthony K., Ledizet M., Modis Y. Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion // *J Virol.* – 2009. – Vol. 83, № 9. – P. 4338-4344.
75. Modis Y., Ogata S., Clements D., Harrison S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion // *Nature.* – 2004. – Vol. 427, № 6972. – P. 313-319.
76. Bressanelli S., Stiasny K., Allison S. L., A. S. E., Duquerroy S., Lescar J., Heinz F. X., Rey F. A. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation // *Embo J.* – 2004. – Vol. 23, № 4. – P. 728-738.
77. Mukhopadhyay S., Kim B. S., Chipman P. R., Rossmann M. G., Kuhn R. J. Structure of West Nile virus // *Science.* – 2003. – Vol. 302, № 5643. – P. 248.
78. Perera R. M. K., Kuhn R. J. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design // *Antiviral.* – 2008. – Vol. Res 80, № 1. – P. 11-22.
79. Mukhopadhyay S., Kuhn R. J., Rossmann M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle // *Nat Rev Microbiol.* – 2005. – Vol. 3, № 1. – P. 13-22.
80. Zhang Y., Zhang W., Ogata S., Clements D., Strauss J. H., Baker T. S., Kuhn R. J., Rossmann M. G. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein // *Structure.* – 2004. – Vol. 12, № 9. – P. 1607-1618.
81. Zhang W., Chipman P. R., Corver J., Johnson P. R., Zhang Y., Mukhopadhyay S., Baker T. S., Strauss J. H., Rossmann M. G., Kuhn R. J. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus // *Nat Struct Biol.* – 2003. – Vol. 10, № 11. – P. 907-912.

82. Zhang Y., Corver J., Chipman P. R., Zhang W., Pletnev S. V., Sedlak D., Baker T. S., Strauss J. H., Kuhn R. J., Rossmann M. G. Structures of immature flavivirus particles // *Embo J.* – 2003. – Vol. 22, № 11. – P. 2604-2613.
83. Zhang Y., Kaufmann B., Chipman P. R., Kuhn R. J., Rossmann M. G. Structure of immature West Nile virus // *J Virol.* – 2007. – Vol. 81, № 11. – P. 6141-6145.
84. Kostyuchenko V. A., Zhang Q., Tan J. L., Ng T. S., Lok S. M. Immature and mature dengue serotype 1 virus structures provide insight into the maturation process // *J Virol.* – 2013. – Vol. 87, № 13. – P. 7700-7707.
85. Yu I. M., Zhang W., Holdaway H. A., Li L., Kostyuchenko V. A., Chipman P. R., Kuhn R. J., Rossmann M. G., Chen J. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation // *Science.* – 2008. – Vol. 319, № 5871. – P. 1834-1837.
86. Perera R., Kuhn R. J. Structural proteomics of dengue virus // *Curr Opin Microbiol.* – 2008. – Vol. 11, № 4. – P. 369-377.
87. Stadler K., Allison S. L., Schalich J., Heinz F. X. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin // *J Virol.* – 1997. – Vol. 71, № 11. – P. 8475-8481.
88. Elshuber S., Allison S. L., Heinz F. X., Mandl C. W. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus // *J Gen Virol.* – 2003. – Vol. 84, № 1. – P. 183-191.
89. Pierson T. C., Diamond M. S. Degrees of maturity: the complex structure and biology of flaviviruses // *Curr Opin Virol.* – 2012. – Vol. 2, № 2. – P. 168-175.
90. Plevka P., Battisti A. J., Junjhon J., Winkler D. C., Holdaway H. A., Keelapang P., Sittisombut N., Kuhn R. J., Steven A. C., Rossmann M. G. Maturation of flaviviruses starts from one or more icosahedrally independent nucleation centres // *Embo Rep.* – 2011. – Vol. 12, № 6. – P. 602-606.
91. Junjhon J., Edwards T. J., Utaipat U., Bowman V. D., Holdaway H. A., Zhang W., Keelapang P., Puttikhunt C., Perera R., Chipman P. R., Kasinrerak W., Malasit P., Kuhn R. J., Sittisombut N. Influence of pr-M cleavage on the heterogeneity of extracellular dengue virus particles // *J Virol.* – 2010. – Vol. 84, № 16. – P. 8353-8358.
92. Oliphant T., Nybakken G. E., Engle M., Xu Q., Nelson C. A., Sukupolvi-Petty S., Marri A., Lachmi B. E., Olshevsky U., Fremont D. H., Pierson T. C., Diamond M. S. Antibody recognition and neutralization determinants on domains I and II of West Nile Virus envelope protein // *J Virol.* – 2006. – Vol. 80, № 24. – P. 12149-12159.
93. Pierson T. C., Xu Q., Nelson S., Oliphant T., Nybakken G. E., Fremont D. H., Diamond M. S. The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection // *Cell Host Microbe.* – 2007. – Vol. 1, № 2. – P. 135-145.
94. Dowd K. A., Mukherjee S., Kuhn R. J., Pierson T. C. Combined effects of the structural heterogeneity and dynamics of flaviviruses on antibody recognition // *J Virol.* – 2014. – Vol. 88, № 20. – P. 11726-11737.
95. Nelson S., Jost C. A., Xu Q., Ess J., Martin J. E., Oliphant T., Whitehead S. S., Durbin A. P., Graham B. S., Diamond M. S., Pierson T. C. Maturation of West Nile virus modulates sensitivity to antibody-mediated neutralization // *PLoS Pathog.* – 2008. – Vol. 4, № 5. – P. e1000060.
96. Kuhn R. J., Dowd K. A., Beth Post C., Pierson T. C. Shake, rattle, and roll: Impact of the dynamics of flavivirus particles on their interactions with the host // *Virology.* – 2015. – Vol. 479-480. – P. 508-17.
97. Ferlenghi I., Clarke M., Ruttan T., Allison S. L., Schalich J., Heinz F. X., Harrison S. C., Rey F. A., Fuller S. D. Molecular organization of a recombinant subviral particle from tick-borne encephalitis virus // *Mol Cell.* – 2001. – Vol. 7, № 3. – P. 593-602.
98. Allison S. L., Tao Y. J., O'Riordan G., Mandl C. W., Harrison S. C., Heinz F. X. Two distinct size classes of immature and mature subviral particles from tick-borne encephalitis virus // *J Virol.* – 2003. – Vol. 77, № 21. – P. 11357-11366.
99. Allison S. L., Stadler K., Mandl C. W., Kunz C., Heinz F. X. Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form // *J Virol.* – 1995. – Vol. 69, № 9. – P. 5816-5820.
100. Kuhn R. J., Zhang W., Rossmann M. G., Pletnev S. V., Corver J., Lenches E. M., Jones C. T., Mukhopadhyay S., Chipman P. R., Straus E. G., Baker T. S., Strauss J. H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion // *Cell.* – 2002. – Vol. 108, № 5. – P. 717-725.

101. Kostyuchenko V. A., Chew P. L., Ng T. S., Lok S. M. Near-atomic resolution cryo-electron microscopic structure of dengue serotype 4 virus // *J Virol.* – 2014. – Vol. 88, № 1. – P. 477-482.
102. Lok S. M., Kostyuchenko V. A., Nybakken G. E., Holdaway H. A., Battisti A. J., Sukupolvi-Petty S., Sedlak D., Fremont D. H., Chipman P. R., Roehrig J. T., Diamond M. S., Kuhn R. J., Rossmann M. G. Binding of a neutralizing antibody to dengue virus alters the arrangement of surface glycoproteins // *Nat Struct Mol Biol.* – 2008. – Vol. 15, № 3. – P. 312-317.
103. Dowd K. A., Jost C. A., Durbin A. P., Whitehead S. S., Pierson T. C. A dynamic landscape for antibody binding modulates antibody-mediated neutralization of West Nile virus // *PLoS Pathog.* – 2011. – Vol. 7, № 6. – P. e1002111.
104. Austin S. K., Dowd K. A., Shrestha B., Nelson C. A., Edeling M. A., Johnson S., Pierson T. C., Diamond M. S., Fremont D. H. Structural basis of differential neutralization of DENV-1 genotypes by an antibody that recognizes a cryptic epitope // *PLoS Pathog.* – 2012. – Vol. 8, № 10. – P. e1002930.
105. Fibriansah G., Ng T. S., Kostyuchenko V. A., Lee J., Lee S., Wang J., Lok S. M. Structural changes in dengue virus when exposed to a temperature of 37 degrees C // *J Virol.* – 2013. – Vol. 87, № 13. – P. 7585-7592.
106. Zhang X., Sheng J., Plevka P., Kuhn R. J., Diamond M. S., Rossmann M. G. Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2013. – Vol. 110, № 17. – P. 6795-6799.
107. Vigant F., Santos N. C., Lee B. Broad-spectrum antivirals against viral fusion // *Nat Rev Microbiol.* – 2015. – Vol. 13, № 7. – P. 426-437.
108. Li Y., Modis Y. A novel membrane fusion protein family in Flaviviridae? // *Trends Microbiol.* – 2014. – Vol. 22, № 4. – P. 176-182.
109. El Omari K., Iourin O., Harlos K., Grimes J. M., Stuart D. I. Structure of a pestivirus envelope glycoprotein E2 clarifies its role in cell entry // *Cell Rep.* – 2013. – Vol. 3, № 1. – P. 30-35.
110. Li Y., Wang J., Kanai R., Modis Y. Crystal structure of glycoprotein E2 from bovine viral diarrhea virus // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013. – Vol. 110, № 17. – P. 6805-6810.
111. Kong L., Giang E., Nieuwma T., Kadam R. U., Cogburn K. E., Hua Y., Dai X., Stanfield R. L., Burton D. R., Ward A. B., Wilson I. A., Law M. Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure // *Science.* – 2013. – Vol. 342, № 6162. – P. 1090-1094.
112. Cardone G., Brecher M., Fontana J., Winkler D. C., Butan C., White J. M., Steven A. C. Visualization of the two-step fusion process of the retrovirus avian sarcoma/leukosis virus by cryo-electron tomography // *J Virol.* – 2012. – Vol. 86, № 22. – P. 12129-12137.
113. Kim Y. H., Donald J. E., Grigoryan G., Leser G. P., Fadeev A. Y., Lamb R. A., DeGrado W. F. Capture and imaging of a prehairpin fusion intermediate of the paramyxovirus PIV5 // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – Vol. 108, № 52. – P. 20992-20997.
114. White J. M., Delos S. E., Brecher M., Schornberg K. Structures and mechanisms of viral membrane fusion proteins: multiple variations on a common theme // *Crit Rev Biochem Mol Biol.* – 2008. – Vol. 43, № 3. – P. 189-219.
115. Stachowiak J. C., Brodsky F. M., Miller E. A. A cost-benefit analysis of the physical mechanisms of membrane curvature // *Nat Cell Biol.* – 2013. – Vol. 15, № 9. – P. 1019-1027.
116. Chernomordik L. V., Zimmerberg J., Kozlov M. M. Membranes of the world unite! // *J Cell Biol.* – 2006. – Vol. 175, № 2. – P. 201-207.
117. Kozlov M. M., McMahon H. T., Chernomordik L. V. Protein-driven membrane stresses in fusion and fission // *Trends Biochem Sci.* – 2010. – Vol. 35, № 12. – P. 699-706.
118. Kaufmann B., Chipman P. R., Holdaway H. A., Johnson S., Fremont D. H., Kuhn R. J., Diamond M. S., Rossmann M. G. Capturing a flavivirus pre-fusion intermediate // *PLoS Pathog.* – 2009. – Vol. 5, № 11. – P. e1000672.
119. Zhang X., Sheng J., Austin S. K., Hoornweg T. E., Smit J. M., Kuhn R. J., Diamond M. S., Rossmann M. G. Structure of acidic pH dengue virus showing the fusogenic glycoprotein trimers // *J Virol.* – 2015. – Vol. 89, № 1. – P. 743-750.
120. Stiasny K., Fritz R., Pangerl K., Heinz F. X. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion // *Amino Acids.* – 2011. – Vol. 41, № 5. – P. 1159-1163.

121. Stiasny K., Kossl C., Heinz F. X. Differences in the postfusion conformations of full-length and truncated class II fusion protein E of tick-borne encephalitis virus // *J Virol.* – 2005. – Vol. 79, № 10. – P. 6511-6515.
122. Kampmann T., Mueller D. S., Mark A. E., Young P. R., Kobe B. The Role of histidine residues in low-pH-mediated viral membrane fusion // *Structure.* – 2006. – Vol. 14, № 10. – P. 1481-1487.
123. Mueller D. S., Kampmann T., Yennamalli R., Young P. R., Kobe B., Mark A. E. Histidine protonation and the activation of viral fusion proteins // *Biochem Soc Trans.* – 2008. – Vol. 36, № Pt 1. – P. 43-45.
124. Prakash M. K., Barducci A., Parrinello M. Probing the mechanism of pH-induced large-scale conformational changes in dengue virus envelope protein using atomistic simulations // *Biophys J.* – 2010. – Vol. 99, № 2. – P. 588-594.
125. Chao L. H., Klein D. E., Schmidt A. G., Pena J. M., Harrison S. C. Sequential conformational rearrangements in flavivirus membrane fusion // *Elife.* – 2014. – Vol. 3. – P. e04389.
126. Summers P. L., Cohen W. H., Ruiz M. M., Hase T., Eckels K. H. Flaviviruses can mediate fusion from without in *Aedes albopictus* mosquito cell cultures // *Virus Res.* – 1989. – Vol. 12, № 4. – P. 383-392.
127. Randolph V. B., Stollar V. Low pH-induced cell fusion in flavivirus-infected *Aedes albopictus* cell cultures // *J Gen Virol.* – 1990. – Vol. 71, № Pt 8. – P. 1845-1850.
128. McMinn P. C., Weir R. C., Dalgarno L. A mouse-attenuated envelope protein variant of Murray Valley encephalitis virus with altered fusion activity // *J Gen Virol.* – 1996. – Vol. 77, № Pt 9. – P. 2085-2088.
129. Guirakhoo F., Heinz F. X., Mandl C. W., Holzmann H., Kunz C. Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions // *J Gen Virol.* – 1991. – Vol. 72, № Pt 6. – P. 1323-1329.
130. Corver J., Ortiz A., Allison S. L., Schalich J., Heinz F. X., Wilschut J. Membrane fusion activity of tick-borne encephalitis virus and recombinant subviral particles in a liposomal model system // *Virology.* – 2000. – Vol. 269, № 1. – P. 37-46.
131. Stiasny K., Koessl C., Heinz F. X. Involvement of lipids in different steps of the flavivirus fusion mechanism // *J Virol.* – 2003. – Vol. 77, № 14. – P. 7856-7862.
132. Umashankar M., C. S.-S. M., Liao M., Reilly B., Guo A., Taylor G., Kielian M. Differential cholesterol binding by class II fusion proteins determines membrane fusion properties // *J Virol.* – 2008. – Vol. 82, № 18. – P. 9245-9253.
133. Stiasny K., Heinz F. X. Effect of membrane curvature-modifying lipids on membrane fusion by tick-borne encephalitis virus // *J Virol.* – 2004. – Vol. 78, № 16. – P. 8536-8542.
134. Puerta-Guardo H., Mosso C., Medina F., Liprandi F., Ludert J. E., Angel R. M. d. Antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in U937 cells requires cholesterol-rich membrane microdomains // *J Gen Virol.* – 2010. – Vol. 91, № Pt 2. – P. 394-403.
135. Smit J. M., Moesker B., Rodenhuis-Zybert I., Wilschut J. Flavivirus cell entry and membrane fusion // *Viruses.* – 2011. – Vol. 3, № 2. – P. 160-171.
136. Butrapet S., Childers T., Moss K. J., Erb S. M., Luy B. E., Calvert A. E., Blair C. D., Roehrig J. T., Huang C. Y. Amino acid changes within the E protein hinge region that affect dengue virus type 2 infectivity and fusion // *Virology.* – 2011. – Vol. 413, № 1. – P. 118-127.
137. Lee E., Weir R. C., Dalgarno L. Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the three-dimensional structure of the protein // *Virology.* – 1997. – Vol. 232, № 2. – P. 281-290.
138. Zhao H., Lappalainen P. A simple guide to biochemical approaches for analyzing protein-lipid interactions // *Mol Biol Cell.* – 2012. – Vol. 23, № 15. – P. 2823-2830.
139. Otterstrom J., van Oijen A. M. Visualization of membrane fusion, one particle at a time // *Biochemistry.* – 2013. – Vol. 52, № 10. – P. 1654-1668.
140. Poh M. K., Yip A., Zhang S., Priestle J. P., Ma N. L., Smit J. M., Wilschut J., Shi P. Y., Wenk M. R., Schul W. A small molecule fusion inhibitor of dengue virus // *Antiviral Res.* – 2009. – Vol. 84, № 3. – P. 260-266.
141. Fritz R., Stiasny K., Heinz F. X. Identification of specific histidines as pH sensors in flavivirus membrane fusion // *J Cell Biol.* – 2008. – Vol. 183, № 2. – P. 353-361.
142. Kampmann T., Yennamalli R., Campbell P., Stoermer M. J., Fairlie D. P., Kobe B., Young P. R. In silico screening of small molecule libraries using the dengue virus envelope E protein has identified compounds with antiviral activity against multiple flaviviruses // *Antiviral Res.* – 2009. – Vol. 84, № 3. – P. 234-241.

143. Harrison J. S., Higgins C. D., O'Meara M. J., Koellhoffer J. F., Kuhlman B. A., Lai J. R. Role of electrostatic repulsion in controlling pH-dependent conformational changes of viral fusion proteins // *Structure*. – 2013. – Vol. 21, № 7. – P. 1085-1096.
144. Qin Z. L., Zheng Y., Kielian M. Role of conserved histidine residues in the low-pH dependence of the Semliki Forest virus fusion protein // *J Virol*. – 2009. – Vol. 83, № 9. – P. 4670-4677.
145. Boo I., teWierik K., Douam F., Lavillette D., Pountourios P., Drummer H. E. Distinct roles in folding, CD81 receptor binding and viral entry for conserved histidine residues of hepatitis C virus glycoprotein E1 and E2 // *Biochem J*. – 2012. – Vol. 443, № 1. – P. 85-94.
146. Carneiro F. A., Stauffer F., Lima C. S., Juliano M. A., Juliano L., Da Poian A. T. Membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus depends on histidine protonation // *J Biol Chem*. – 2003. – Vol. 278, № 16. – P. 13789-13794.
147. Carneiro F. A., Vandenbussche G., Juliano M. A., Juliano L., Ruyschaert J. M., Da Poian A. T. Charged residues are involved in membrane fusion mediated by a hydrophilic peptide located in vesicular stomatitis virus G protein // *Mol Membr Biol*. – 2006. – Vol. 23, № 5. – P. 396-406.
148. Chanel-Vos C., Kielian M. A conserved histidine in the ij loop of the Semliki Forest virus E1 protein plays an important role in membrane fusion // *J Virol*. – 2004. – Vol. 78, № 24. – P. 13543-52.
149. Chang A., Hackett B. A., Winter C. C., Buchholz U. J., Dutch R. E. Potential electrostatic interactions in multiple regions affect human metapneumovirus F-mediated membrane fusion // *J Virol*. – 2012. – Vol. 86, № 18. – P. 9843-9853.
150. Huang Q., Opitz R., Knapp E. W., Herrmann A. Protonation and stability of the globular domain of influenza virus hemagglutinin // *Biophys J*. – 2002. – Vol. 82, № 2. – P. 1050-1058.
151. Liu C. Y., Kielian M. E1 mutants identify a critical region in the trimer interface of the Semliki forest virus fusion protein // *J Virol*. – 2009. – Vol. 83, № 21. – P. 11298-11306.
152. Schowalter R. M., Chang A., Robach J. G., Buchholz U. J., Dutch R. E. Low-pH triggering of human metapneumovirus fusion: essential residues and importance in entry // *J Virol*. – 2009. – Vol. 83, № 3. – P. 1511-1522.
153. Stauffer F., De Miranda J., Schechter M. C., Carneiro F. A., Salgado L. T., Machado G. F., Da Poian A. T. Inactivation of vesicular stomatitis virus through inhibition of membrane fusion by chemical modification of the viral glycoprotein // *Antiviral Res*. – 2007. – Vol. 73, № 1. – P. 31-39.
154. Harms M. J., Castaneda C. A., Schlessman J. L., Sue G. R., Isom D. G., Cannon B. R., Garcia-Moreno E. B. The pK(a) values of acidic and basic residues buried at the same internal location in a protein are governed by different factors // *J Mol Biol*. – 2009. – Vol. 389, № 1. – P. 34-47.
155. Liu C. Y., Kielian M. E1 mutants identify a critical region in the trimer interface of the Semliki forest virus fusion protein // *J Virol*. – 2009. – Vol. 83, № 21. – P. 11298-11306.
156. Harrison J. S., Higgins C. D., Chandran K., Lai J. R. Designed protein mimics of the Ebola virus glycoprotein GP2 alpha-helical bundle: stability and pH effects // *Protein Sci*. – 2011. – Vol. 20, № 9. – P. 1587-1596.
157. Liu H., Liu Y., Wang S., Zhang Y., Zu X., Zhou Z., Zhang B., Xiao G. Structure-based mutational analysis of several sites in the E protein: implications for understanding the entry mechanism of Japanese encephalitis virus // *J Virol*. – 2015. – Vol. 89, № 10. – P. 5668-5686.
158. Zheng A., Umashankar M., Kielian M. In vitro and in vivo studies identify important features of dengue virus pr-E protein interactions // *PLoS Pathog*. – 2010. – Vol. 6, № 10. – P. e1001157.
159. Kroschewski H., Sagripanti J. L., Davidson A. D. Identification of amino acids in the dengue virus type 2 envelope glycoprotein critical to virus infectivity // *J Gen Virol*. – 2009. – Vol. 90, № Pt 10. – P. 2457-2461.
160. Nelson S., Poddar S., Lin T. Y., Pierson T. C. Protonation of individual histidine residues is not required for the pH-dependent entry of west nile virus: evaluation of the "histidine switch" hypothesis // *J Virol*. – 2009. – Vol. 83, № 23. – P. 12631-12635.
161. Broker M., Kollaritsch H. After a tick bite in a tick-borne encephalitis virus endemic area: current positions about post-exposure treatment // *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26, № 7. – P. 863-868.
162. Пеньевская Н. А. Этиотропная профилактика инфекций, передающихся иксодовыми клещами: теоретические и методологические основы оценки эффективности: диссертация д.м.н, 2010.
163. Пакскина Н. Д. Организация надзора за клещевым вирусным энцефалитом в Российской Федерации и мерах его профилактики // *Дезинфекционное дело*. – 2007. – № 1. – С. 20-23.

164. Ruzek D., Dobler G., Niller H. H. May early intervention with high dose intravenous immunoglobulin pose a potentially successful treatment for severe cases of tick-borne encephalitis? // *BMC Infect Dis.* – 2013. – Vol. 13. – P. 306.
165. Baykov I. K., Matveev A. L., Stronin O. V., Ryzhikov A. B., Matveev L. E., Kasakin M. F., Richter V. A., Tikunova N. V. A protective chimeric antibody to tick-borne encephalitis virus // *Vaccine.* – 2014. – Vol. 32, № 29. – P. 3589-3594.
166. Дуева К. В., Коробов Н. В., Медведев О. С. Новые области применения препаратов интерферона бета // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2015. – Т. 78, № 5. – С. 37 - 44.
167. Crance J. M., Scaramozzino N., Jouan A., Garin D. Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses // *Antiviral.* – 2003. – Vol. Res 58, № 1. – P. 73-79.
168. Flint M., McMullan L. K., Dodd K. A., Bird B. H., Khristova M. L., Nichol S. T., Spiropoulou C. F. Inhibitors of the tick-borne, hemorrhagic fever-associated flaviviruses // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2014. – Vol. 58, № 6. – P. 3206-3216.
169. Крылова Н. В. Клеточные и молекулярные механизмы противовирусной защиты ири клещевом энцефалите - диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук –Москва, 2014.
170. Samuel M. A., Diamond M. S. Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival // *J Virol.* – 2005. – Vol. 79, № 21. – P. 13350-13361.
171. Brooks T. J., Phillipotts R. J. Interferon-alpha protects mice against lethal infection with St Louis encephalitis virus delivered by the aerosol and subcutaneous routes // *Antiviral Res.* – 1999. – Vol. 41, № 1. – P. 57-64.
172. Leyssen P., Drosten C., Paning M., Charlier N., Paeshuyse J., De Clercq E., Neyts J. Interferons, interferon inducers, and interferon-ribavirin in treatment of flavivirus-induced encephalitis in mice // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2003. – Vol. 47, № 2. – P. 777-782.
173. Solomon T., Dung N. M., Wills B., Kneen R., Gainsborough M., Diet T. V., Thuy T. T., Loan H. T., Khanh V. C., Vaughn D. W., White N. J., Farrar J. J. Interferon alfa-2a in Japanese encephalitis: a randomised double-blind placebo-controlled trial // *Lancet.* – 2003. – Vol. 361, № 9360. – P. 821-826.
174. Mastrangelo E., Pezzullo M., De Burghgraeve T., Kaptein S., Pastorino B., Dallmeier K., de Lamballerie X., Neyts J., Hanson A. M., Frick D. N., Bolognesi M., Milani M. Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug // *J Antimicrob Chemother.* – 2012. – Vol. 67, № 8. – P. 1884-1894.
175. Tomlinson S. M., Watowich S. J. Use of parallel validation high-throughput screens to reduce false positives and identify novel dengue NS2B-NS3 protease inhibitors // *Antiviral Res.* – 2012. – Vol. 93, № 2. – P. 245-252.
176. Lim S. P., Wang Q. Y., Noble C. G., Chen Y. L., Dong H., Zou B., Yokokawa F., Nilar S., Smith P., Beer D., Lescar J., Shi P. Y. Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects // *Antiviral Res.* – 2013. – Vol. 100, № 2. – P. 500-519.
177. Eyer L., Valdes J. J., Gil V. A., Nencka R., Hrebabecky H., Sala M., Salat J., Cerny J., Palus M., De Clercq E., Ruzek D. Nucleoside inhibitors of tick-borne encephalitis virus // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2015. – Vol. 59, № 9. – P. 5483-5493.
178. Carroll S. S., Ludmerer S., Handt L., Koeplinger K., Zhang N. R., Graham B. S., Davies M. E., MacCoss M., Hazuda D., Olsen D. B. Robust antiviral efficacy upon administration of a nucleoside analog to hepatitis C virus-infected chimpanzees // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2009. – Vol. 53, № 3. – P. 926-934.
179. Olsen D. B., Eldrup A. B., Bartholomew L., Bhat B., Bosserman M. R., Ceccacci A., Colwell L. F., Fay J. F., Flores O. A., Getty K. L., Groble J. A., LaFemina R. L., Markel E. J., Migliaccio G., Prhavic M., Stahlhut M. W., Tomassini J. E., MacCoss M., Hazuda D. J., Carroll S. S. A 7-deaza-adenosine analog is a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus replication with excellent pharmacokinetic properties // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2004. – Vol. 48, № 10. – P. 3944-3953.
180. Yin Z., Chen Y. L., Schul W., Wang Q. Y., Gu F., Duraiswamy J., Kondreddi R. R., Niyomrattanakit P., Lakshminarayana S. B., Goh A., Xu H. Y., Liu W., Liu B., Lim J. Y., Ng C. Y., Qing M., Lim C. C., Yip A., Wang G., Chan W. L., Tan H. P., Lin K., Zhang B., Zou G., Bernard K. A., Garrett C., Beltz K., Dong M., Weaver M.,

- He H., Pichota A., Dartois V., Keller T. H., Shi P. Y. An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. – Vol. 106, № 48. – P. 20435-20439.
181. Lo M. K., Shi P. Y., Chen Y. L., Flint M., Spiropoulou C. F. In vitro antiviral activity of adenosine analog NITD008 against tick-borne flaviviruses // *Antiviral Res.* – 2016.10.1016/j.antiviral.2016.03.013.
182. De Clercq E. Antiviral agents: characteristic activity spectrum depending on the molecular target with which they interact // *Adv Virus Res.* – 1993. – Vol. 42. – P. 1-55.
183. Leyssen P., De Clercq E., Neyts J. Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae // *Clin Microbiol Rev.* – 2000. – Vol. 13, № 1. – P. 67-82.
184. St Vincent M. R., Colpitts C. C., Ustinov A. V., Muqadas M., Joyce M. A., Barsby N. L., Epand R. F., Epand R. M., Khraymyshv S. A., Valueva O. A., Korshun V. A., Tyrrell D. L., Schang L. M. Rigid amphipathic fusion inhibitors, small molecule antiviral compounds against enveloped viruses // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2010. – Vol. 107, № 40. – P. 17339-17344.
185. Colpitts C. C., Ustinov A. V., Epand R. F., Epand R. M., Korshun V. A., Schang L. M. 5-(Perylen-3-yl)ethynyl-arabino-uridine (aUY11), an arabino-based rigid amphipathic fusion inhibitor, targets virion envelope lipids to inhibit fusion of influenza virus, hepatitis C virus, and other enveloped viruses // *J Virol.* – 2013. – Vol. 87, № 7. – P. 3640-3654.
186. Vigant F., Hollmann A., Lee J., Santos N. C., Jung M. E., Lee B. The rigid amphipathic fusion inhibitor dUY11 acts through photosensitization of viruses // *J Virol.* – 2014. – Vol. 88, № 3. – P. 1849-53.
187. Orlov A. A., Chistov A. A., Kozlovskaya L. I., Ustinov A. V., Korshun V. A., Karganova G. G., I. O. D. Rigid amphipathic nucleosides suppress reproduction of the tick-borne encephalitis virus // *Med Chem Commun.* – 2016. – Vol. 7. – P. 495-499.
188. Ray D., Shah A., Tilgner M., Guo Y., Zhao Y., Dong H., Deas T. S., Zhou Y., Li H., Shi P. Y. West Nile virus 5'-cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylations by nonstructural protein 5 // *J Virol.* – 2006. – Vol. 80, № 17. – P. 8362-8370.
189. Hanley K. A., Lee J. J., Blaney J. E., Jr., Murphy B. R., Whitehead S. S. Paired charge-to-alanine mutagenesis of dengue virus type 4 NS5 generates mutants with temperature-sensitive, host range, and mouse attenuation phenotypes // *J Virol.* – 2002. – Vol. 76, № 2. – P. 525-531.
190. Bullard K. M., Gullberg R. C., Soltani E., Steel J. J., Geiss B. J., Keenan S. M. Murine Efficacy and Pharmacokinetic Evaluation of the Flaviviral NS5 Capping Enzyme 2-Thioxothiazolidin-4-One Inhibitor BG-323 // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, № 6. – P. e0130083.
191. Stahla-Beek H. J., April D. G., Saeedi B. J., Hannah A. M., Keenan S. M., Geiss B. J. Identification of a novel antiviral inhibitor of the flavivirus guanylyltransferase enzyme // *J Virol.* – 2012. – Vol. 86, № 16. – P. 8730-8739.
192. Пеньевская Н. А. Этиотропные препараты для экстренной профилактики клещевого энцефалита: перспективные разработки и проблемы эпидемиологической оценки эффективности // *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика* – 2010. – Т. 1, № 50. – С. 39 – 45.
193. Скрипченко Н. В., Егорова Е. С. Применение цитофлавина в комплексной терапии нейроинфекций у детей // *Журнал неврологии и психиатрии.* – 2011. № 9. – P. 28 - 31.
194. Удинцева И. Н., Бартфельт Н. Н., Жукова Н. Г., Попонина А. М. Мексидол в комплексной терапии пациентов в остром периоде клещевого энцефалита // *Журнал неврологии и психиатрии.* – 2012. – № 8. – С. 34 - 38.
195. Логинова С. Я., Борисевич С. В., Русинов В. Л., Уломский Е. Н., Чарушин В. Н., Чупахин О. Н. Изучение противовирусной активности триазавирина в отношении возбудителя клещевого энцефалита в культуре клеток // *Антибиотики и химиотерапия.* – 2014. – Т. 59, № 1-2. – С. 3-5.
196. Логинова С. Я., Борисевич С. В., Русинов В. Л., Уломский Е. Н., Чарушин В. Н., Чупахин О. Н., Сорокин П. В. Изучение лечебной эффективности триазавирина в отношении экспериментальной формы клещевого энцефалита у белых мышей // *Антибиотики и химиотерапия.* – 2015. – Т. 60, № 7 - 8. – С. 11 - 13.
197. Wheeler D. A., Lalezari J. P., Kilby J. M., Wheat J., Delehanty J., DeMasi R., Patel I., Salgo M. Safety, tolerability, and plasma pharmacokinetics of high-strength formulations of enfuvirtide (T-20) in treatment-experienced HIV-1-infected patients // *J Clin Virol.* – 2004. – Vol. 30, № 2. – P. 183-190.
198. Hardy H., Skolnik P. R. Enfuvirtide, a new fusion inhibitor for therapy of human immunodeficiency virus infection // *Pharmacotherapy.* – 2004. – Vol. 24, № 2. – P. 198-211.

199. Volz T., Allweiss L., Ben M. M., Warlich M., Lohse A. W., Pollok J. M., Alexandrov A., Urban S., Petersen J., Lutgehetmann M., Dandri M. The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus // *J Hepatol.* – 2013. – Vol. 58, № 5. – P. 861-867.
200. Monath T. P., Arroyo J., Levenbook I., Zhang Z. X., Catalan J., Draper K., Guirakhoo F. Single mutation in the flavivirus envelope protein hinge region increases neurovirulence for mice and monkeys but decreases viscerotropism for monkeys: relevance to development and safety testing of live, attenuated vaccines // *J.* – 2002. – Vol. *Viol* 76, № 4. – P. 1932-1943.
201. Hurrelbrink R. J., McMinn P. C. Attenuation of Murray Valley encephalitis virus by site-directed mutagenesis of the hinge and putative receptor-binding regions of the envelope protein // *J.* – 2001. – Vol. *Viol* 75, № 16. – P. 7692-7702.
202. Cecilia D., Gould E. A. Nucleotide changes responsible for loss of neuroinvasiveness in Japanese encephalitis virus neutralization-resistant mutants // *Virology.* – 1991. – Vol. 181, № 1. – P. 70-77.
203. Abe T., Sando A., Teraoka F., Otsubo T., Morita K., Tokiwa H., Ikeda K., Suzuki T., Hidari K. I. Computational design of a sulfoglucuronide derivative fitting into a hydrophobic pocket of dengue virus E protein // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2014. – Vol. 449, № 1. – P. 32-37.
204. Yang J. M., Chen Y. F., Tu Y. Y., Yen K. R., Yang Y. L. Combinatorial computational approaches to identify tetracycline derivatives as flavivirus inhibitors // *PLoS One.* – 2007. – Vol. 2, № 5. – P. e428.
205. Yang J. M., Chen C. C. GEMDOCK: a generic evolutionary method for molecular docking // *Proteins.* – 2004. – Vol. 55, № 2. – P. 288-304.
206. Kaptein S. J., De Burghgraeve T., Froeyen M., Pastorino B., Alen M. M., Mondotte J. A., Herdewijn P., Jacobs M., de Lamballerie X., Schols D., Gamarnik A. V., Sztaricskai F., Neyts J. A derivate of the antibiotic doxorubicin is a selective inhibitor of dengue and yellow fever virus replication in vitro // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2010. – Vol. 54, № 12. – P. 5269-5280.
207. De Burghgraeve T., Kaptein S. J., Ayala-Nunez N. V., Mondotte J. A., Pastorino B., Printsevskaya S. S., de Lamballerie X., Jacobs M., Preobrazhenskaya M., Gamarnik A. V., Smit J. M., Neyts J. An analogue of the antibiotic teicoplanin prevents flavivirus entry in vitro // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7, № 5. – P. e37244.
208. Li Z., Khaliq M., Zhou Z., Post C. B., Kuhn R. J., Cushman M. Design, synthesis, and biological evaluation of antiviral agents targeting flavivirus envelope proteins // *J Med Chem.* – 2008. – Vol. 51, № 15. – P. 4660-4671.
209. Mayhoub A. S., Khaliq M., Kuhn R. J., Cushman M. Design, synthesis, and biological evaluation of thiazoles targeting flavivirus envelope proteins // *J Med Chem.* – 2011. – Vol. 54, № 6. – P. 1704-1714.
210. Jadav S. S., Kaptein S., Timiri A., De Burghgraeve T., Badavath V. N., Ganesan R., Sinha B. N., Neyts J., Leyssen P., Jayaprakash V. Design, synthesis, optimization and antiviral activity of a class of hybrid dengue virus E protein inhibitors // *Bioorg Med Chem Lett.* – 2015. – Vol. 25, № 8. – P. 1747-1752.
211. Wang Q. Y., Patel S. J., Vangrevelinghe E., Xu H. Y., Rao R., Jaber D., Schul W., Gu F., Heudi O., Ma N. L., Poh M. K., Phong W. Y., Keller T. H., Jacoby E., Vasudevan S. G. A small-molecule dengue virus entry inhibitor // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2009. – Vol. 53, № 5. – P. 1823-1831.
212. Schul W., Liu W., Xu H. Y., Flamand M., Vasudevan S. G. A dengue fever viremia model in mice shows reduction in viral replication and suppression of the inflammatory response after treatment with antiviral drugs // *J Infect Dis.* – 2007. – Vol. 195, № 5. – P. 665-674.
213. Panya A., Bangphoomi K., Choowongkamon K., Yenchitsomanus P. T. Peptide inhibitors against dengue virus infection // *Chem Biol Drug Des.* – 2014. – Vol. 84, № 2. – P. 148-157.
214. Schmidt A. G., Yang P. L., Harrison S. C. Peptide inhibitors of flavivirus entry derived from the E protein stem // *J Virol.* – 2010. – Vol. 84, № 24. – P. 12549-12554.
215. Schmidt A. G., Yang P. L., Harrison S. C. Peptide inhibitors of dengue-virus entry target a late-stage fusion intermediate // *PLoS Pathog.* – 2010. – Vol. 6, № 4. – P. e1000851.
216. Yenamalli R., Subbarao N., Kampmann T., McGeary R. P., Young P. R., Kobe B. Identification of novel target sites and an inhibitor of the dengue virus E protein // *J Comput Aided Mol Des.* – 2009. – Vol. 23, № 6. – P. 333-341.
217. RCSB PDB. [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org).
218. Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N., Bourne P. E. The Protein Data Bank // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – Vol. 28, № 1. – P. 235-42.

219. Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0 // *Bioinformatics*. – 2007. – Vol. 23, № 21. – P. 2947-2948.
220. Altschul S. F. Amino acid substitution matrices from an information theoretic perspective // *J Mol Biol*. – 1991. – Vol. 219, № 3. – P. 555-565.
221. Potterton E., McNicholas S., Krissinel E., Cowtan K., Noble M. The CCP4 molecular-graphics project // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. – 2002. – Vol. 58, № Pt 11. – P. 1955-1957.
222. Tripos Inc. 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
223. Sali A., Blundell T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints // *J Mol Biol*. – 1993. – Vol. 234, № 3. – P. 779-815.
224. Sippl M. J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins // *Proteins*. – 1993. – Vol. 17, № 4. – P. 355-362.
225. Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S., Thornton J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. // *J Appl Cryst*. – 1993. – Vol. 26. – P. 283 - 291.
226. Shen M. Y., Sali A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures // *Protein Sci*. – 2006. – Vol. 15, № 11. – P. 2507-2524.
227. Clark M., Cramer III R. D., Van Opdenbosch N. Validation of the General Purpose Tripos 5.2 Force Field // *J Comput Chem*. – 1989. – Vol. 10. – P. 982-1012.
228. Cieplak P., Caldwell J., Kollman P. Molecular mechanical models for organic and biological systems going beyond the atom centered two body additive approximation: aqueous solution free energies of methanol and N-methyl acetamide, nucleic acid base, and amide hydrogen bonding and chloroform/water partition coefficients of the nucleic acid bases // *J Comput Chem*. – 2001. – Vol. 22. – P. 1048-1057.
229. Standartizer. ChemAxon Ltd. [www.chemaxon.com](http://www.chemaxon.com), 2011.
230. Babel. OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM, USA, [www.eyesopen.com](http://www.eyesopen.com), 2010.
231. QUACPAC. version 1.5.0, OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM, USA, [www.eyesopen.com](http://www.eyesopen.com), 2010.
232. FRED. version 2.2.5, OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM, USA, [www.eyesopen.com](http://www.eyesopen.com), 2010.
233. McGann M. FRED pose prediction and virtual screening accuracy // *J Chem Inf Model*. – 2011. – Vol. 51, № 3. – P. 578-596.
234. Osolodkin D. I., Kozlovskaya L. I., Dueva E. V., Dotsenko V. V., Rogova Y. V., Frolov K. A., Krivokolysko S. G., Romanova E. G., Morozov A. S., Karganova G. G., Palyulin V. A., Pentkovski V. M., Zefirov N. S. Inhibitors of tick-borne flavivirus reproduction from structure-based virtual screening // *ACS Med Chem Lett*. – 2013. – Vol. 4, № 9. – P. 869-874.
235. Dueva E. V., Osolodkin D. I., Kozlovskaya L. I., Palyulin V. A., Pentkovski V. M., Zefirov N. S. Interaction of Flaviviruses with Reproduction Inhibitors Binding in  $\beta$ -OG Pocket: Insights from Molecular Dynamics Simulations // *Mol. Inf*. – 2014.10.1002/minf.201300185 № 33. – P. 695–708.
236. OMEGA. version 2.4.6, OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM, USA, [www.eyesopen.com](http://www.eyesopen.com), 2010.
237. Hawkins P. C., Skillman A. G., Warren G. L., Ellingson B. A., Stahl M. T. Conformer generation with OMEGA: algorithm and validation using high quality structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database // *J Chem Inf Model*. – 2010. – Vol. 50, № 4. – P. 572-584.
238. Halgren T. A. Merck molecular force field. II. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions // *J Comput. Chem*. – 1996. – Vol. 17. – P. 520-552.
239. McGann M. R., Almond H. R., Nicholls A., Grant J. A., Brown F. K. Gaussian docking functions // *Biopolymers*. – 2003. – Vol. 68, № 1. – P. 76-90.
240. Eldridge M. D., Murray C. W., Auton T. R., Paolini G. V., Mee R. P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes // *J Comput Aided Mol Des*. – 1997. – Vol. 11, № 5. – P. 425-445.
241. Verkhivker G. M., Bouzida D., Gehlhaar D. K., Rejto P. A., Arthurs S., Colson A. B., Freer S. T., Larson V., Luty B. A., Marrone T., Rose P. W. Deciphering common failures in molecular docking of ligand-protein complexes // *J Comput Aided Mol Des*. – 2000. – Vol. 14, № 8. – P. 731-751.
242. Stahl M., Rarey M. Detailed analysis of scoring functions for virtual screening // *J Med Chem*. – 2001. – Vol. 44, № 7. – P. 1035-1042.

243. VIDA. version 4.2.1, OpenEye Scientific Software, Inc., Santa Fe, NM, USA, [www.eyesopen.com](http://www.eyesopen.com), 2010.
244. D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham, III C. L. S., J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, R. C. Walker, W. Zhang, K. M. Merz, B. Roberts, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossváry, K. F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, J. Liu, X. Wu, S. R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.-J. Hsieh, G. Cui, D. R. Roe, D. H. Mathews, M. G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, Luchko T., S. Gusarov, A. Kovalenko, P. A. Kollman. AMBER 11. 2010, University of California, San Francisco.
245. Hornak V., Abel R., Okur A., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters // *Proteins*. – 2006. – Vol. 65, № 3. – P. 712-725.
246. Wang J., Wolf R. M., Caldwell J. W., Kollman P. A., Case D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field // *J Comp Chem*. – 2004. – Vol. 25. – P. 1157 – 1173.
247. Li H., Robertson A. D., Jensen J. H. Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values // *Proteins*. – 2005. – Vol. 61, № 4. – P. 704-721.
248. Georgescu R. E., Alexov E. G., Gunner M. R. Combining conformational flexibility and continuum electrostatics for calculating pK(a)s in proteins // *Biophys J*. – 2002. – Vol. 83, № 4. – P. 1731-1748.
249. Alexov E. G., Gunner M. R. Incorporating protein conformational flexibility into the calculation of pH-dependent protein properties // *Biophys J*. – 1997. – Vol. 72, № 5. – P. 2075-2093.
250. Ryckaert J.-P., Ciccotti G., Berendsen H. J. C. Numerical integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes // *J Comp Phys*. – 1977. – Vol. 23, № 327 - 341.
251. Tsui V., Case D. A. Theory and Applications of the Generalized Born Solvation Model in Macromolecular Simulations // *Biopolymers (Nucleic Acid Sci.)*. – 2001. – Vol. 56, № 4. – P. 275 – 291.
252. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics // *J Mol Graph*. – 1996. – Vol. 14, № 1. – P. 33 - 38.
253. Romanova L., Gmyl A. P., Dzhivanyan T. I., Bakhmutov D. V., Lukashev A. N., Gmyl L. V., Rumyantsev A. A., Burenkova L. A., Lashkevich V. A., Karganova G. G. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation // *Virology*. – 2007. – Vol. 362, № 1. – P. 75-84.
254. Reed L. J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints // *Am J Epidemiol* – 1938. – Vol. 27, № 3. – P. 493-497.
255. Sedenkova K. N., Dueva E. V., Averina E. B., Grishin Y. K., Osolodkin D. I., Kozlovskaya L. I., Palyulin V. A., Savelyev E. N., Orlinson B. S., Novakov I. A., Butov G. M., Kuznetsova T. S., Karganova G. G., Zefirov N. S. Synthesis and assessment of 4-aminotetrahydroquinazoline derivatives as tick-borne encephalitis virus reproduction inhibitors // *Org Biomol Chem*. – 2015. – Vol. 13, № 11. – P. 3406-3415.
256. Polio laboratory manual, 4th edition. / WHO – Geneva, 2004.
257. Gmyl A. P., Korshenko S. A., Belousov E. V., Khitrina E. V., Agol V. I. Nonreplicative homologous RNA recombination: promiscuous joining of RNA pieces? // *RNA*. – 2003. – Vol. 9, № 10. – P. 1221-1231.
258. Романова Л. Ю., Гмыль Л. В., Локтев В. Б., Протопопова Е. В., Дживанян Т. И., Лашкевич В. А., Карганова Г. Г. Изменение антигенной структуры поверхностного гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита при его адаптации к клещам и млекопитающим // *Вопросы вирусологии*. – 2006. – Т. 51, № 6. – С. 31 - 34.
259. ChemAxon Ltd. [www.chemaxon.com](http://www.chemaxon.com), 2011.
260. Viswanadhan V. N., Ghose A. K., Revankar G. R., Robins R. K. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics // *J Chem Inf Comput Sci*. – 1989. – Vol. 29, № 3. – P. 163–172.
261. Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2001. – Vol. 46, № 1-3. – P. 3-26.
262. Osolodkin D. I., Kozlovskaya L. I., Palyulin V. A., Pentkovski V. M., Karganova G. G., Zefirov N. S. A molecular model and Monte Carlo simulation of flavivirus envelope building block // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2012. – Vol. 425, № 2. – P. 207-211.

263. Kozlovskaya L. I., Osolodkin D. I., Shevtsova A. S., Romanova L., Rogova Y. V., Dzhivanian T. I., Lyapustin V. N., Pivanova G. P., Gmyl A. P., Palyulin V. A., Karganova G. G. GAG-binding variants of tick-borne encephalitis virus // *Virology*. – 2010. – Vol. 398, № 2. – P. 262-272.
264. Dubey K. D., Chaubey A. K., Ojha R. P. Role of pH on dimeric interactions for DENV envelope protein: an insight from molecular dynamics study // *Biochim Biophys Acta*. – 2011. – Vol. 1814, № 12. – P. 1796-1801.
265. Rey F. A. Dengue virus: two hosts, two structures // *Nature*. – 2013. – Vol. 497, № 7450. – P. 443-444.
266. Kyte J., Doolittle R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein // *J Mol Biol*. – 1982. – Vol. 157, № 1. – P. 105-132.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

### Приложение 1. Краткий словарь вирусологических терминов

**БОЕ** – бляшкообразующая единица. Бляшки – области клеток, убитых вирусом и не окрашиваемых витальными красителями. Одна бляшка соответствует потомству одной вирусной частицы.

**Вирусная нагрузка** – количество вирусных частиц в единице объема крови.

**Висцеротропизм** – способность вируса к инфицированию внутренних органов (печень, почки, сердце и тд.).

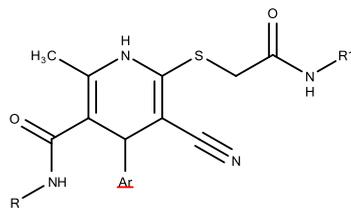
**Нейровирулентность** – способность вируса реплицироваться и вызывать повреждения в ЦНС.

**Нейроинвазивность** – способность вируса проникать в ЦНС. Данное свойство вируса тесно связано с его способностью реплицироваться и распространяться в периферических тканях и достигать высокого уровня накопления вируса в крови.

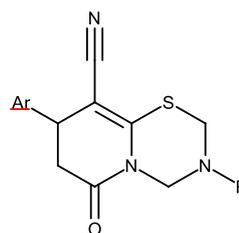
**Титр вируса** – количество вирусных частиц в единице объема вирусной суспензии. При определении методом бляшек или фокусов отражает концентрацию инфекционных частиц.

**ФОЕ** – фокусообразующая единица. Фокусы – области клеток, заражённых вирусом, окрашенные антителами к вирусу. Один фокус соответствует потомству одной вирусной частицы.

**Приложение 2. Соединения базы ХимЭкс, не проявившие активность в концентрации 10 мкМ**



1



2

Класс	Ar	R	R1
1	2-фурил	Ph	4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	Ph	4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	2-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	2-Et-6-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	4-EtC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	4-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2-бензотиазолилNH
1	2-фурил	2,4-Cl <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	2-бензотиазолилNH
1	2-фурил	2-Cl-5-CF <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	4-iPrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	2-Cl-5-CF <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	4-EtOOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	2-Cl-5-CF <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	3-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	2-Cl-5-CF <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	2-бензотиазолил-NH
1	2-фурил	3-CF <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	4-H <sub>2</sub> NSO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	4-H <sub>2</sub> NSO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2-тиазолил-NH
1	2-фурил	4-H <sub>2</sub> NSO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2-бензотиазолил-NH
1	2-фурил	4-EtOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2-бензотиазолил-NH
1	2-фурил	3-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	2,4,6-Me <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	2-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-EtC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-AcC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	2,6-Me <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	4-iPrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	2,6-Me <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	3,4-Me <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> NH
1	2-фурил	2,6-Me <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	3-Cl-4-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub> NH
1	2-фурил	2-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	2-бензотиазолил	3-Cl-4-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub> NH
1	2-фурил	2,6-Me <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	2-бензотиазолилNH
1	2-фурил	2-бензотиазолил	2-бензотиазолилNH
1	2-фурил	2-бензотиазолил	4-iPrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	2-бензотиазолил	4-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	3-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	4-H <sub>2</sub> NSO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-EtC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-EtC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	4-EtC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-EtC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-фурил	2-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2-нафтил-NH
1	2-фурил	Ph	3,4-Me <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>
1	2-фурил	4-EtOOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH

1	2-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Ph	4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Ph	4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Ph	4-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Ph	4-nBuC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Ph	3-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Ph	4-AcC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	Ph	4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-EtC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	Ph	4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	Ph	Ph	4-iPrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	Ph	Ph	4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	Ph	4-EtOOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2-бензотиазолилNH
1	Ph	2-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2-бензотиазолилNH
1	Ph	4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2-нафтил-NH
1	Ph	2-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-nBuC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	4-НО-3-МеОС <sub>6</sub> Н <sub>3</sub>	Ph	4-EtC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-EtOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	Ph	4-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	5-Ме-2-фурил	2-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	5-Ме-2-фурил	2-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-EtOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-тиенил	2-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-IC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-тиенил	2-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-циклогексилC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
1	2-тиенил	2-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-тиенил	2-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-iPrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-тиенил	2-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-EtOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-тиенил	2-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-тиенил	Ph	Ph
1	2-тиенил	2-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-MeC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH
1	2-тиенил	2-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-НООС <sub>6</sub> Н <sub>4</sub> НН
1	2-{{[3-циано-4-(2,3-дихлорфенил)-5-оксо-1,4,5,6,7,8-гексагидрохиолин-2-ил]сульфанил}-N-(3,4-диметилфенил)ацетамид		
1	бензил 6-{{[4-(4-трет-бутилфенил)-4-оксобутил]сульфанил}-4-(2-хлорфенил)-5-циано-2-метил-1,4-дигидропиридин-3-карбоксилат		
1	2-{{[5-ацетил-4-(4-хлорфенил)-3-циано-6-метил-1,4-дигидропиридин-2-yl]сульфанил}-N-(1,3-бензотиазол-2-ил)ацетамид		
1	метил 5-циано-4-(4-метилфенил)-2-оксо-6-{{{[4-феноксифенил]карбамоил]метил}сульфанил}-1,2,3,4-тетрагидропиридин-3-карбоксилат		
1	2-{{[4-(2-хлорфенил)-3-циано-6-гидрокси-5-(тиофен-2-карбонил)-6-(трифторметил)-1,4,5,6-тетрагидропиридин-2-ил]сульфанил}-N-(4-этоксифенил)ацетамид		
1	2-{{[4-[4-(бензилокси)фенил]-3-циано-5-оксо-1,4,5,6,7,8-гексагидрохиолин-2-ил]сульфанил}-N-(4-этилфенил)ацетамид		
2	3-Br-4-OH-5-MeOC <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	4-nBuC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	-
2	4-(4-ClBnO)C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2,4,6-Me <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>2</sub>	-
2	4-(4-ClBnO)C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-nBuC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	-
2	3-BnOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-nBuC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	-
2	3-BnOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	4-EtC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	-

2	3-BnOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	-
2	3-BnOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3,4-Me <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	-
2	3-BnOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	2,4-MeO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	-
2	3-BnOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3-Cl-4-MeC <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	-