

Создание полноразмерного репликона коронавируса SARS-CoV-2 для безопасного тестирования ингибиторов РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса

Научный руководитель – Королев Сергей Павлович

Стринкевич Александра Андреевна

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет
биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: a192smail@gmail.com

Заболевание COVID-19 (COronaVIrus Disease 2019), вызванное новым штаммом бета-коронавируса SARS-CoV-2, унесло жизни почти 7 млн человек по всему миру. Для терапии COVID-19 к настоящему времени создан только 1 специфический препарат «Паксловид», являющийся ингибитором основной протеазы вируса. Применяющиеся для лечения коронавирусной инфекции препараты ремдесивир, фавипиравир и некоторые другие, направленные на блокирование РНК-полимеразы SARS-CoV-2, не являются специфическими ингибиторами этого фермента и имеют существенное побочное действие. В связи с этим дизайн и синтез специфических ингибиторов РНК-зависимой РНК-полимеразы SARS-CoV-2 (РЗРП) представляется совершенно необходимым.

В рамках данной работы была протестирована серия нуклеозидных производных в качестве потенциальных ингибиторов РЗРП SARS-CoV-2. Тестирование проводилось на созданном нами полноразмерном репликоне вируса, включающем гены всех неструктурных белков SARS-CoV-2 (NSP1-16), а также ген белка N. В репликоне также присутствуют два блока репортерных генов: в результате первого раунда транскрипции синтезируется только первый блок белков-репортеров (*Renilla luciferase-GFP*), тогда как второй блок (*Firefly luciferase-RFP*) образуется только в результате протекания прерывистой транскрипции, характерной для представителей семейства *Coronaviridae*. Наличие двух блоков репортерных генов позволяет изучать разные этапы вирусной транскрипции и является основным отличием данного репликона от уже существующих. В качестве вектора для репликона было решено использовать искусственную бактериальную хромосому, поскольку такой тип вектора позволяет получать генетические конструкции достаточно большого размера, содержащие токсичные для *E. coli* последовательности.

Для подтверждения функциональной активности репликона была создана аналогичная конструкция с каталитически неактивной РЗРП, содержащей мутации D760A и D761A. В случае мутантной конструкции экспрессия первой люциферазы Rluc была существенно снижена, а второй Fluc – практически отсутствовала.

Скрининг активности соединений проводился на клеточных линиях Vero E6 и созданной нами Vero E6-ТК, в которой стабильно экспрессируется тимидин-киназа вируса простого герпеса человека первого типа (ТК). Наличие ТК в клетках обеспечивает первый акт фосфорилирования нуклеозидных ингибиторов, что позволяет обойтись без создания депо-форм для тестируемых соединений.

В результате тестирования серии нуклеозидных производных были отобраны несколько соединений, обладающих ингибирующей активностью по отношению к полимеразной активности РЗРП SARS-CoV-2. Была обнаружена антивирусная активность соединений аденозин-N1-оксид, 2'-амино-2'-дезоксаденозин и 3'-O-метиладенозин. Примечательно, что эффективность ингибирования РЗРП последними двумя соединениями была выше

при наличии ТК в клетках. Соединение ацикловир, известное как ингибитор герпесвирусов и не используемое для терапии COVID-19, практически не подавляло транскрипцию с реплика в клетках Vero E6, однако в присутствии ТК было способно ингибировать вирусную РЗРП. В качестве контроля использовался молнупиравир, применяемый для лечения COVID-19, в нашей системе проявил ингибирующую активность, однако оказался менее эффективным, чем аденозин-N1-оксид и 2'-амино-2'-дезоксаденозин.

Работа поддержана специальной программой Министерства образования и науки РФ.