

ПОЛНОРАЗМЕРНЫЙ РЕПЛИКОН SARS-CoV-2 С ДВУМЯ РЕПОРТЕРАМИ ДЛЯ СКРИНИНГА ИНГИБИТОРОВ РНК-ЗАВИСИМОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ВИРУСА

© 2024 С.П. Королев^{1,2,3*}, А.А. Шулепова^{1,3}, А.Н. Анисенко^{1,2,3}, С.О. Галкин³,
Л.А. Александрова⁴, М.В. Ясько⁴, Е.С. Матюгина⁴, М.С. Новиков⁵,
А.Л. Хандажинская⁴, С.Н. Кочетков^{2,4}, М.Б. Готтих^{1,2}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: spkorolev@mail.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119991 Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

⁴ Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, Россия

⁵ Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармацевтической и токсикологической химии, 400131 Волгоград, Россия

Поступила в редакцию 10.09.2024

После доработки 14.10.2024

Принята к публикации 15.10.2024

В качестве безопасной клеточной системы для тестирования ингибиторов РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) SARS-CoV-2 получена генетическая конструкция, клонированная в вектор искусственной бактериальной хромосомы и представляющая собой кДНК вируса, не содержащую генов структурных белков S, E и M, с двумя блоками репортерных генов. Первый блок, представленный люциферазой *Renilla reniformis* и зелёным флуоресцентным белком (Rluc-GFP), находится под контролем CMV-промотора, расположенного перед 5'-нетранслируемым регионом (5'-UTR) SARS-CoV-2. Второй блок репортерных генов представлен люциферазой светлячка *Photinus pyralis* и красным флуоресцентным белком (Fluc-RFP) и находится после последовательности, регулирующей транскрипцию (TRS-N). Такое расположение генов и регуляторных последовательностей позволяет оценить уровень ингибирования вирусной RdRp, поскольку первый блок репортерных генов может транскрибироваться не только вирусной RdRp, но и клеточными полимеразами, в то время как второй блок может транскрибироваться только вирусной полимеразой по механизму прерывистой транскрипции, характерной для семейства *Coronaviridae*. Для облегчения поиска нуклеозидных ингибиторов RdRp без создания фосфорилированных депо-форм создана клеточная линия Vero E6_TK, экспрессирующая тимидинкиназу вируса простого герпеса, осуществляющую первую стадию фосфорилирования нуклеозидов в клетке. Проверка способности ряда соединений ингибировать каталитическую активность RdRp SARS-CoV-2 позволила впервые обнаружить антивирусную активность у 2'-амино-2'-дезоксиаденозина и аденоzin-N1-оксида, превышающую активность используемого для лечения COVID-19 молнунипиравира.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полноразмерный репликон с двумя репортерами, ингибиторы, РНК-зависимая РНК-полимераза, SARS-CoV-2, вирусы.

DOI: 10.31857/S0320972524110166 EDN: IJVTPC

Принятые сокращения: 5'-UTR – 5'-нетранслируемый регион; BAC – Bacterial Artificial Chromosome, бактериальная искусственная хромосома; CMV – цитомегаловирус; Fluc – люцифераза светлячка *Photinus pyralis*; GFP – зелёный флуоресцентный белок; RdRp – РНК-зависимая РНК-полимераза; RFP – красный флуоресцентный белок; Rluc – люцифераза *Renilla reniformis*; TK – тимидинкиназа вируса простого герпеса человека первого типа.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия COVID-19 (COronaVIrus Disease 2019), вызванная новым штаммом бетакоронавируса SARS-CoV-2, к концу 2023 г. унесла жизни порядка 7 млн человек. Для терапии COVID-19 к настоящему времени создан только один специфический препарат «Паксловид», в состав которого входят ингибитор основной протеазы вируса нирматрелвир и ритонавир [1]. 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 оказывают существенное побочное действие. В связи с этим дизайн и синтез специфических ингибиторов РНК-полимеразы SARS-CoV-2 представляется совершенно необходимым.

SARS-CoV-2 относится к семейству (+)РНК-вирусов *Coronaviridae*, для которых характерно сложное устройство генома и необычный способ синтеза субгеномных РНК, названный прерывистой транскрипцией [2, 3]. Процесс репликации генома и прерывистой транскрипции осуществляется многокомпонентным комплексом вирусных неструктурных белков (NSP7–NSP16), называемым РНК-зависимой РНК-полимеразой (RdRp). Оба процесса начинаются, когда RdRp связывает 3'-конец геномной РНК и начинает синтез комплементарной ей некодирующей цепи (-)РНК. В процессе репликации полимеразный комплекс синтезирует полноразмерную цепь (-)РНК, при повторном прочтении которой синтезируются копии геномной (+)РНК. Прерывистая транскрипция происходит, когда полимеразный комплекс RdRp и растущей цепи РНК диссоциирует от матрицы в специальных межгененных участках (transcription regulation sequence, TRS), после чего повторно связывается с комплементарной последовательностью в 5'-нетранслируемой области геномной РНК и продолжает синтез. При повторном прочтении таких укороченных РНК синтезируются субгеномные РНК, отличающиеся от полноразмерных геномных РНК потерей части кодирующей последовательности.

Столь сложный процесс вирусной репликации и прерывистой транскрипции требует создания адекватных клеточных моделей этих процессов для их изучения и поиска новых ингибиторов [4, 5].

Существующие сегодня модели можно условно разделить на два класса. К первым относятся полноразмерные вирусные системы, использование которых возможно только в специализированных исследовательских учреждениях, т.к. они предполагают работу с инфекционными вирусны-

ми частицами. К примерам таких систем можно отнести природные изоляты вируса или векторы на основе искусственной бактериальной хромосомы, содержащие полноразмерную кДНК вируса [6]. При трансфекции клеток этим вектором РНК-полимераза II синтезирует РНК SARS-CoV-2, после чего становится возможной сборка вирусных частиц и инфекция соседних клеток. Такие экспрессионно-компетентные вирусные системы могут дополнительно содержать гены репортерных белков, что значительно облегчает их использование для скрининга ингибиторов [7–9].

Ко второй группе моделей относятся псевдовирусные системы и репликоны – безопасные клеточные системы, позволяющие проводить тестирование соединений без использования вирусных частиц [10–12]. В основе псевдовирусных систем лежат векторы на основе кДНК патогена, аналогичные описанным выше, из которых, однако, удалён один или несколько вирусных генов, что делает невозможной сборку новых вирионов в отсутствии дополнительного вектора, содержащего необходимые гены. При ко-трансфекции клеток вектором с модифицированной кДНК и вектором, кодирующим структурные вирусные белки, происходит образование псевдовирусных частиц, которые способны заражать клетки и поддерживать репликацию вирусной РНК, однако неспособны к генерации новых вирионов. Если же из вирусной кДНК удалить все структурные гены и использовать только этот вектор для трансфекции, в клетках не будет происходить сборки псевдовирусных частиц, но в них будут идти процессы репликации и прерывистой транскрипции миниатюризированного генома патогена. Такие системы называются репликонами. На данный момент создано несколько полноразмерных репликонов SARS-CoV-2 [12–15].

К сожалению, разработанные к настоящему моменту репликоны SARS-CoV-2 содержат в своём составе лишь один блок репортерных генов, что существенно ограничивает их применение для поиска ингибиторов SARS-CoV-2. Наличие одного блока репортеров не позволяет однозначно подтвердить RdRp в качестве мишени действия исследуемых ингибиторов, поскольку репортерные гены в указанных конструкциях находятся, как правило, под контролем сильного промотора цитомегаловируса (CMV). Уровень продукции репортера в таких репликонах зависит от эффективности работы как клеточной РНК-полимеразы II (этап синтеза (+)РНК вируса/псевдовируса/репликона с ДНК-вектора), так и от эффективности работы RdRp-комплекса (этап амплификации (+)РНК), поэтому невозможно однозначно определить, на какой из ферментов подействовало исследуемое соединение.

В настоящей работе описано конструирование полноразмерного репликона с двумя блоками репортерных генов. Первый блок находится под контролем CMV-промотора, расположенного перед 5'-нетранслируемым регионом (5'-UTR) SARS-CoV-2. Второй блок репортерных генов находится после последовательности, регулирующей транскрипцию (TRS-N). Такое расположение генов и регуляторных последовательностей позволяет оценить уровень ингибирования вирусной RdRp, поскольку второй блок репортерных генов может транскрибироваться только вирусной полимеразой по механизму прерывистой транскрипции, характерной для семейства *Coronaviridae*. Наличие двух блоков репортеров позволяет, помимо скрининга ингибиторов RdRp, также всесторонне изучать действие различных клеточных факторов на стадии прерывистой транскрипции и репликации вируса.

С использованием разработанной системы был проведён анализ серии соединений в качестве потенциальных ингибиторов полимеразной активности RdRp SARS-CoV-2 и впервые показано, что модифицированные производные аденоцина, 2'-амино-2'-дезоксиаденоцин, аденоцин-N1-оксид и 3'-O-метиладеноцин, способны подавлять активность RdRp SARS-CoV-2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Олигонуклеотиды (последовательность 5'-3') были синтезированы амидофосфитным методом компанией «Евроген» (Москва, Россия):

- CMV_seq (ATTCAAATATGTATCCG);
- nsp1_rev (TTCTCGTTGAAACCAGGG);
- nsp2_fw (GGGTTGAAAAGAAAAAGCTTGATG);
- nsp2_rev (GAAGTTCACCAATGATCAC);
- nsp3_rev (AAACATCAAATTGTTGATGTACTG);
- nsp3_rev (GTGTGGCCAACCTCTTC);
- nsp6_fw (CCGCTACTTTAGACTGACTCTT);
- nsp7_rev (AGACTACTGATGTGCACCTTAC);
- nsp13_seq3 (CCAACCTAAACTGTTGATTCA);
- nsp13_rev (CAAGACTTGTAAATTGCAACTTGT);
- nsp16_seq1 (GTGATAGTGCAACATTACCTAAAG);
- Nprot_rev (CGCTGATTTGGGGTCC);
- mScarlett_fw (GGCATGGACGAGCTG);
- m13_fw (GTAAAACGACGGCCAGT);
- pJet1.2_fw (CGACTCACTATAAGGGAGAGCGGC);
- pJet1.2_rev (AAGAACATCGATTTCATGGCAG);
- F1_fwd (GGCTACGGTCTCAATCTCGTTACATAACTTACGTAAATG);
- F1_rev (GGCTACGGTCTCGGATAGACAGATCGAATTCTACCCATAAAGCC);
- F2_fwd (GGCTACGGTCTCGTATCCAGTTGCGTCACCAAAATG);
- F2_rev (GGCTACGGTCTCGAATGTCTCCTACAACTT-

- CGGTAGTTTC);
- F3_fwd (GGCTACGGTCTCGCATTATACTTAAACCA-GCAAATAATAG);
- F3_rev (GGCTACGGTCTCGCTGACATTAGACTGT-ACAGTGGCTACTTTGATAC);
- F4_fwd (GGCTACGGTCTCGTCAGATGTAAAGTGCA-CATC);
- F4_rev (GGCTACGGTCTCCTCTATCAGACATTATG-CAAAG);
- F5_fwd (GGCTACGGTCTCCGAGATCTTATGACAA-GTTGCAATTAC);
- F5_rev (GGCTACGGTCTCCTAGTTGTTGTTAGTTGTTAACAAAGAACATCAC);
- F6_fwd (GGCTACGGTCTCCACTAAAATGTCTGATA-ATGGAC);
- F6_rev (GGCTACGGTCTCGTAATTAAGATAACATTGATGAGTTGGACAAAC);
- nsp12_D760A_D761A_fw (ATACTCTCTGCCGCTGC-TGTTGTG);
- nsp12_D760A_D761A_rev (CATCATTGAGAAATGTTACG).

Плазмида. pJET1.2/blunt («Thermo Fisher Scientific», США) – промежуточный вектор, в который были клонированы 6 фрагментов генома SARS-CoV-2, используемые при сборке полноразмерного репликона вируса. pBAC-lacZ (#13422, «Addgene», США) – искусственная бактериальная хромосома, вектор, используемый для получения и наработки в клетках *E. coli* полноразмерного репликона SARS-CoV-2.

Полимеразная цепная реакция. Аналитическую амплификацию проводили при концентрации праймеров 0,4 мКМ с использованием готовой смеси для ПЦР 5x ScreenMix («Евроген»). Препаративную амплификацию всех фрагментов ДНК проводили при концентрации праймеров 0,5 мКМ в буфере 1× Phusion HF или 1× Phusion GC с помощью ДНК-полимеразы Phusion Hot Start II High-Fidelity («Thermo Fisher Scientific», США) или в буфере 1× Q5 High-Fidelity Master Mix («New England Biolabs», США). Концентрация dNTP составляла 0,25 мМ. В зависимости от свойств матрицы концентрацию диметилсульфоксида (DMSO) варьировали от 0% до 10%. Полученные фрагменты ДНК были клонированы в промежуточный вектор pJET1.2 с использованием набора CloneJET PCR Cloning Kit, согласно протоколу производителя («Thermo Fisher Scientific»).

Клонирование Golden Gate. 6 фрагментов генома SARS-CoV-2, находящихся в промежуточных векторах (pJET1.2), клонировали в искусственную бактериальную хромосому. Реакцию клонирования методом Golden Gate проводили с помощью набора NEBridge Golden Gate Assembly Kit. В реакционную смесь добавляли 6 фрагментов генома и вектор BAC (Bacterial Artificial Chromosome, бактериальная искусственная хромосома), смесь эн-

донуклеазы BsaI-HFv2 и T4 ДНК-лигазы, после чего смесь помещали в термоциклер. В термоциклере устанавливалась следующая программа: {37 °C, 5 мин → 16 °C, 5 мин} × 30 → 55 °C, 5 мин. После термоциклирования смесь использовали для трансформации компетентных штаммов *E. coli* TransforMax EPI300 («LGC Biosearch Technologies», Великобритания).

Наработка конструкций репликона производилась в специальном штамме *E. coli* TransforMax EPI300, в котором возможно индуцированное увеличение копийности вектора. После трансформации клетки рассевали на твёрдую среду (2,5%-ная LB, 1,5%-ный агар) с хлорамфениколом (12,5 мкг/мл) и оставляли на 36–48 ч при 30 °C. Далее, материал колоний переносили в жидкую среду (2,5%-ная LB, 12,5 мкг/мл хлорамфеникола) и растяли 12 ч при 30 °C, затем разбавляли до оптической плотности 0,3–0,4 и индуцировали репликацию целевой конструкции 2 мМ L-арabinозой в течение 6 ч при 30 °C. Конструкции выделяли в соответствии с протоколами наборов для выделения ДНК.

Мутагенез активного центра NSP12 производился на конструкции pJet1.2_F4 с использованием полимеразы Q5 High-Fidelity DNA Polymerase («NEB», США). Для дизайна мутагенезных праймеров nsp12_D760A_D761A_fw и nsp12_D760A_D761A_rev было использовано онлайн-ПО NEBaseChanger (<https://nebasechanger.neb.com>).

Секвенирование фрагментов для проверки последовательностей проводилось компанией ЦКП «Геном», подготовка образцов производилась в соответствии с протоколами компании. Анализ хроматограмм секвенирования проводился в ПО SnapGene Viewer.

Культивирование эукариотических клеток. Клетки Vero E6 культивировали в среде DMEM («Gibco», США), содержащей 10%-ную эмбриональную бычью сыворотку (FBS), пенициллин (100 ед./мл) и стрептомицин (100 мкг/мл) («Invitrogen», США) при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO₂.

Получение клеточной линии, стабильно экспрессирующей тимидинкиназу вируса простого герпеса человека первого типа. Клетки линии Vero E6 были трансдуцированы лентивирусными векторами, кодирующими в своём геноме тимидинкиназу вируса простого герпеса человека первого типа (HSV-TK), а также гены селективных маркеров – зелёного флуоресцентного белка (GFP) и устойчивости к пуромицину. Для отбора положительных клонов прибегали к помощи сортировки GFP+ клеток на проточном цитофлуориметре BD FACSAria III. Полученную клеточную линию Vero E6_TK поддерживали на среде, содержащей пуромицин в концентрации 6 мкг/мл, и использовали для дальнейших экспериментов.

Проверка способности аналогов нуклеозидов фосфорилироваться в клетках Vero E6_TK. За сутки до тестирования клетки Vero E6 или Vero E6_TK рассевали в 48-луночный планшет. Клетки трансдуцировали VSV-G-псевдотипированным репликативно-некомпетентным лентивирусом на основе генома ВИЧ-1 в присутствии зидовудина (3'-азидо-3'-дезокситимидин) или ацикловира (2-амино-9-((2-гидроксизетокси)метил)-1,9-дигидро-6Н-пурин-6-он) в концентрациях 0–50 мкМ при 1%-ной концентрации DMSO. Через 24 ч после трансдукции в клетках измеряли уровень экспрессии люциферазы светлячка (*Photinus pyralis*) с помощью набора Luciferase Assay System («Promega», США). Люминесцентный сигнал детектировали с помощью прибора BioTek Synergy H1 Multimode Reader («Agilent», США).

Тестирование низкомолекулярных соединений с использованием клеточной системы для изучения репликации SARS-CoV-2. Для тестирования использовали: аденоzin-N1-оксид [16], 3'-О-метиладеноzin [17], 2'-амино-2'-дезоксиаденоzin [18], LN-140 [19], Z876 [20], молнунипиравир, ацикловир и ставудин (2',3'-дидегидро-2',3'-дидекситимидин) – коммерческие препараты.

За сутки до тестирования клетки линии Vero E6 или Vero E6_TK рассевали в лунки 48-луночного планшета. На следующий день проводили трансфекцию клеток конструкцией полноразмерного репликона SARS-CoV-2 с использованием реагента Lipofectamine 3000 («Thermo Fisher Scientific»), согласно протоколу производителя. Через 6 ч после трансфекции исходную среду заменяли на среду, содержащую тестируемое соединение в концентрациях 0–50 мкМ при концентрации DMSO 1%. Эффективность ингибиции оценивали по изменению сигнала люминесценции от люцифераз рениллы и светлячка. Измерение люминесцентного сигнала проводили через 48 ч после трансфекции.

Определение активности люцифераз рениллы и светлячка. Активность люциферазы рениллы (*Renilla reniformis*) и люциферазы светлячка (*Photinus pyralis*) измеряли с помощью набора Dual-Luciferase Reporter Assay System («Promega»). Люминесцентный сигнал детектировали с помощью прибора BioTek Synergy H1 Multimode Reader («Agilent»).

МТТ-тест. За сутки до тестирования клетки линии Vero E6 или Vero E6_TK рассевали в лунки 96-луночного планшета. На следующий день культуральную среду заменяли на среду, содержащую тестируемое соединение в концентрациях 0–50 мкМ при концентрации DMSO 1%. Через 48 ч к клеткам добавляли 10 мкЛ МТТ-реагента в концентрации 5 мг/мл. Далее, планшет помещали на 2 ч в CO₂-инкубатор. Через два часа от клеток

отбирали среду и добавляли 100 мкл 100%-ного DMSO. Затем, после полного растворения выпавших кристаллов, измеряли поглощение полученного раствора с помощью прибора BioTek Synergy H1 Multimode Reader («Agilent») при длине волн 590 нм.

Графическое представление результатов. Результаты обсчитывали в ПО Excel. Для визуализации результатов съёмки люцифераз и MTT-теста использовалось ПО GraphPad Prism 9.5.1.

Статистический анализ данных. Все эксперименты проводили минимум в трёх биологических повторах. Для сравнения двух групп использовали парный Т-тест, предполагая нормальное распределение данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Создание полноразмерного репликона SARS-CoV-2 с двумя блоками репортерных генов. Для создания полноразмерного репликона, кодирующего два блока репортерных генов, предложена следующая схема (рис. 1). Последовательность модифицированного генома SARS-CoV-2, не содержащего генов структурных белков S, E и M, начинающаяся с 5'-UTR, находится под контролем промотора CMV. Остальные гены коронавируса и последовательности репортеров flankированы классическими регуляторными областями SARS-CoV-2: 5'-UTR и 3'-UTR. За 5'-UTR следует последовательность полипротеина ORF1ab, включающая первый блок репортерных генов, размещённый между неструктурными белками (NSP) NSP1 и NSP2. Данный блок включает в себя ген устойчивости к бластицидину и ген, кодирующий два слитых белка, Rluc (люцифераза *Renilla reniformis*) и GFP, которые отделены от последовательностей неструктурных белков SARS-CoV-2 пептидами P2A, T2A и E2A, вызывающими пропуск образования

пептидной связи в процессе трансляции [21]. Последние необходимы для правильного синтеза как NSP1 и NSP2, так и белков первого репортерного блока. Сразу после последовательности полипротеина ORF1ab следует последовательность TRS-N и ген белка N. Несмотря на то что в геноме вируса после ORF1ab находится последовательность TRS-S и ген белка S, в литературе показано, что размещение на этом месте гена белка N не нарушает процесс эффективного образования субгеномных РНК [22]. За геном белка N размещается последовательность второго репортерного блока, представленная геном слитых белков Fluc (люцифераза светлячка *Photinus pyralis*) и RFP (красный флуоресцентный белок). Второй блок также отделён от гена белка N последовательностью пептида P2A. После гена белков Fluc-RFP находится последовательности 3'-UTR, рибозим вируса гепатита D (Rz) и сигнал полиаденилирования SV40 poly(A). Наличие рибозима, который катализирует разрыв цепи РНК между последним нуклеотидом генома коронавируса и первым нуклеотидом рибозима, позволяет получить РНК, содержащую 3'-концевую последовательность, полностью идентичную вирусной, что важно для успешной репликации и транскрипции вирусной РНК [23]. Наличие двух блоков репортерных генов позволяет не только оценивать уровень ингибиции RdRp и эффективность протекания прерывистой транскрипции, но и осуществлять поиск клеточных факторов, участвующих в процессе репликации и транскрипции SARS-CoV-2 (рис. 2).

Для получения описанного выше репликона был использован метод клонирования Golden Gate. Предварительно была проведена ПЦР с коронавирусной кДНК, а также с генов необходимых репортерных белков, и были получены 6 фрагментов для сборки полноразмерного репликона (рис. 1). Эти фрагменты, каждый по отдельности, были клонированы в промежуточный вектор pJET1.2.

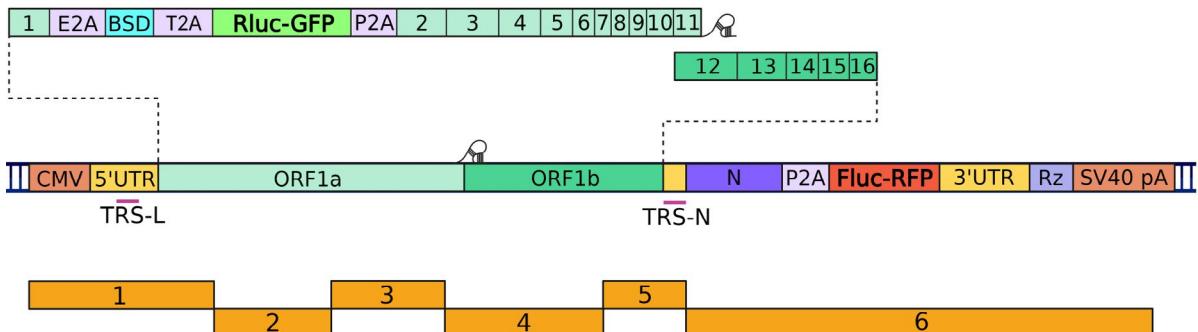


Рис. 1. Модель полноразмерного репликона SARS-CoV-2 с двумя блоками репортерных генов. Первый блок репортерных генов Rluc-GFP расположен внутри ORF1a под контролем промотора CMV, второй блок Fluc-RFP расположен между геном белка N и 3'-UTR и может транскрибироваться только вирусной RdRp с помощью механизма прерывистой транскрипции. Ниже приведена схема 6 фрагментов кДНК вируса, из которых производилась сборка полноразмерного репликона и клонирование в плазмиду pBAC_lacZ с использованием Golden Gate-подхода

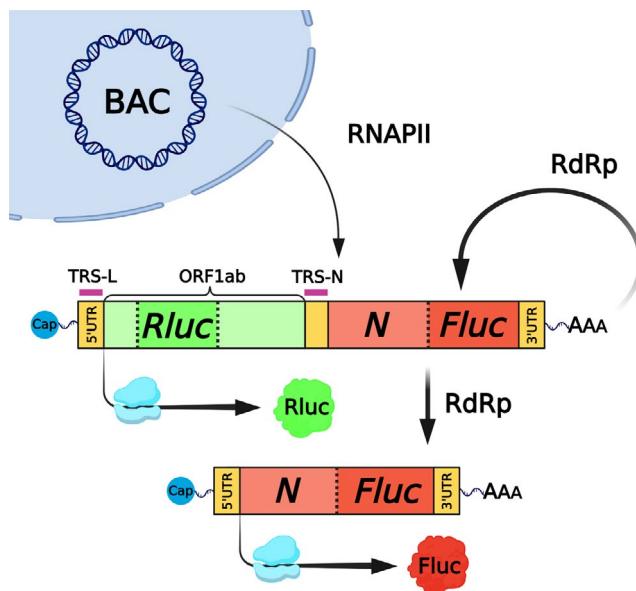


Рис. 2. Схема функционирования репликона. Экспрессия первого репортера (Rluc) может происходить как за счёт транскрипции с векторной ДНК (BAC) клеточной РНК-полимеразой II (RNAPII), так и за счёт репликации вирусной РНК под действием RdRp. Второй репортер (Fluc) может транскрибироваться только вирусной RdRp через механизм прерывистой транскрипции

Сборка производилась с использованием 7 фрагментов, т.к., помимо описанных 6 фрагментов кДНК вируса, в качестве вектора использовалась плазмида pBAC_lacZ.

В качестве вектора была выбрана BAC, поскольку такой тип вектора позволяет нарабатывать большие генетические конструкции, содержащие токсичные для *E. coli* последовательности. В процессе получения полноразмерного репликона в бактериальных клетках мы столкнулись с проблемой плохой наработки конструкции в штамме *E. coli* XL1 Blue, что, вероятно, было связано как с недостаточно эффективной трансформацией клеток ввиду большого размера конструкции, так и с крайне низкой копийностью BAC. Для решения этой проблемы был использован специальный штамм *E. coli* TransforMax EPI300, позволяющий не только нарабатывать большие генетические конструкции, но и контролировать число копий вектора на клетку с помощью низкомолекулярных индукторов репликации BAC. В геноме данного штамма содержится индуцибельный мутантный ген *trfA*, необходимый для инициации увеличения числа копий вектора ДНК с ориджина репликации *oriV* в присутствии индуктора L-арabinозы [24]. Полученную конструкцию тестировали с помощью аналитической ПЦР с использованием праймеров к концам соединяемых фрагментов, затем последовательность подтверждалась секвенированием. В результате была

получена конструкция, соответствующая полноразмерному репликону REP, представленному на рис. 1.

Помимо этого, для подтверждения функциональной активности полученного нами репликона REP мы решили создать аналогичную конструкцию с каталитически неактивной RdRp (далее REP_mut). Для этого в последовательности полимеразной субъединицы (NSP12) RdRp в составе фрагмента 4 (рис. 1) два аминокислотных остатка аспарагиновой кислоты каталитической триады активного центра NSP12 были заменены на остатки аланина: D760A и D761A. Потеря каталитической активности RdRp в результате этих замен была показана ранее [25]. Наличие мутаций было подтверждено секвенированием ПЦР-продукта соответствующего участка гена субъединицы NSP12.

Для корректного сопоставления результатов тестирования потенциальных ингибиторов в предлагаемой системе с данными, полученными в других исследованиях на клетках, инфицированных SARS-CoV-2, была выбрана клеточная линия Vero E6. Эта линия является наиболее широко используемой в работах по изучению различных вирусов из-за отсутствия интерферонового ответа в клетках при заражении вирусом [26, 27].

Репортерные конструкции REP и REP_mut доставлялись в клетки с помощью липофекции, а спустя 48 ч измерялся уровень экспрессии первой (Rluc) и второй (Fluc) люцифераз (рис. 3). Данная временная точка была выбрана, поскольку в предварительных экспериментах через 24 ч сигнал люминесценции был существенно ниже, чем через 48 ч. При этом уровень сигнала через 72 ч не изменялся по сравнению с 48 ч (данные не представлены). Как и ожидалось, уровень первой люциферазы значительно превосходил уровень второй люциферазы, которая не могла синтезироваться клеточными РНК-полимеразами,

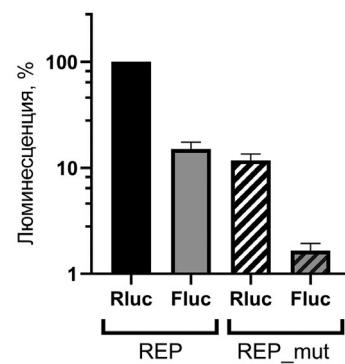


Рис. 3. Сравнение уровней экспрессии люцифераз рениллы (Rluc) и светлячка (Fluc) в клетках Vero E6, трансфицированных репликонами REP и REP_mut. Представлены средние значения по результатам не менее 3 экспериментов \pm стандартное отклонение

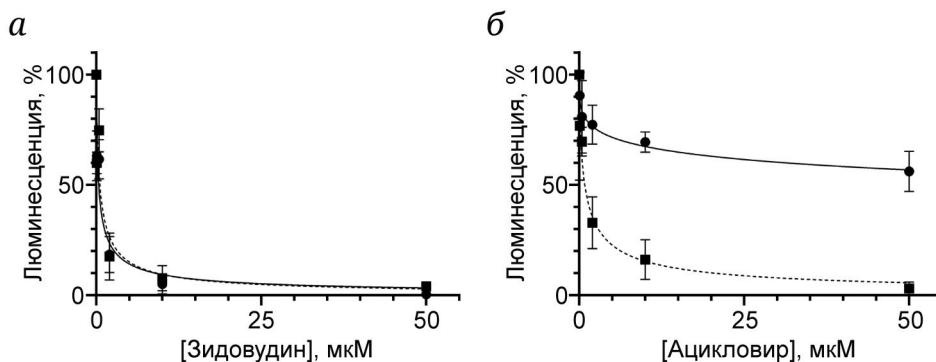


Рис. 4. Проверка ингибирующей активности зидовудина (а) и ацикловира (б) в клеточных линиях Vero E6 (сплошная линия) и Vero E6_TK (пунктирная линия), трансдуцированных репликативно-некомпетентным вектором на основе ВИЧ-1, кодирующим репортерный белок – люциферазу светлячка. Представлены средние значения по результатам не менее 3 экспериментов \pm стандартное отклонение

а только RdRp SARS-CoV-2. Важно также, что уровень экспрессии обеих люцифераз при трансфекции репортером REP_mut с каталитически неактивной RdRp был значительно ниже, чем в случае репортера REP с полностью функциональной RdRp. Уровень экспрессии второй люциферазы в случае мутантного репортера был ненамного выше фона, что однозначно указывало на отсутствие транскрипции Fluc клеточными РНК-полимеразами.

Сравнение уровней экспрессии люцифераз из обоих репортерных блоков однозначно показало, что закодированная в репликоне REP полимераза функционально активна и способна осуществлять как репликацию, так и прерывистую транскрипцию вирусной РНК, продуктами которых являются люциферазы Rluc и Fluc соответственно.

Оптимизация безопасной клеточной системы для тестирования потенциальных нуклеозидных ингибиторов RdRp SARS-CoV-2. Нуклеозидные ингибиторы – соединения, имеющие структурное сходство с природными нуклеозидами, которые воспринимаются вирусным репликативным аппаратом как субстрат для синтеза нуклеиновой кислоты. Для встраивания в растущую цепь нуклеиновой кислоты эти соединения должны быть трижды фосфорилированы клеточными киназами с образованием соответствующих нуклеозид-5'-трифосфатов. Если второй и третий акт фосфорилирования происходит под действием клеточных ферментов независимо от структуры нуклеозида, то первый этап фосфорилирования является определяющим для активации соединения и строго зависит от способности клеточных нуклеозидкиназ распознавать структуры ингибиторов. Спектр соединений, которые являются субстратами для клеточных нуклеозидкиназ, ограничен, поэтому многие нуклеозидные ингибиторы, применяемые в медицинской практике, используют в виде депо-форм – модифицированных

нуклеозидов, содержащих модифицированный определённым образом первый фосфат. Однако из-за увеличения стоимости синтеза создание депо-форм для всех соединений, используемых для скрининга в качестве потенциальных ингибиторов, является нецелесообразным. Вместе с тем при непосредственном тестировании модифицированных нуклеозидов в качестве ингибиторов есть риск ложноотрицательных результатов, что сужает спектр потенциальных ингибиторов.

Для решения проблемы «первого фосфорилирования» нами была создана клеточная линия, в геноме которой содержится ген тимидинкиназы вируса простого герпеса человека первого типа (ТК). Этот фермент обладает относительно низкой субстратной специфичностью и может фосфорилировать достаточно широкий набор модифицированных нуклеозидов [28].

Для встраивания гена ТК в геном клеток Vero E6 была проведена трансдукция клеток лентивирусным вектором, в котором закодирован ген ТК, а также селективные маркеры – ген устойчивости к пуромицину и GFP. После трансдукции для очистки ТК-позитивных клонов клетки подвергали сортировку по наличию флуоресценции GFP, слитого с ТК. В результате были получены клетки Vero E6_TK, стабильно экспрессирующие ТК.

Способность аналогов нуклеозидов фосфорилироваться в полученных клетках проверяли с помощью функционального теста. Для этого клетки линии Vero E6 и Vero E6_TK трансдуцировали VSV-G-псевдотипированным репликативно-некомпетентным лентивирусным вектором на основе ВИЧ-1 (модель ранних этапов репликации ВИЧ-1), кодирующим люциферазу светлячка под контролем CMV-промотора, в присутствии различных концентраций известного нуклеозидного ингибитора ВИЧ-1 – зидовудина (3'-азидо-3'-дезокситимидин) или ацикловира (2-амино-9-(2-гидроксиэтокси)метил)-1,9-дигидро-6Н-пурин-6-он), который

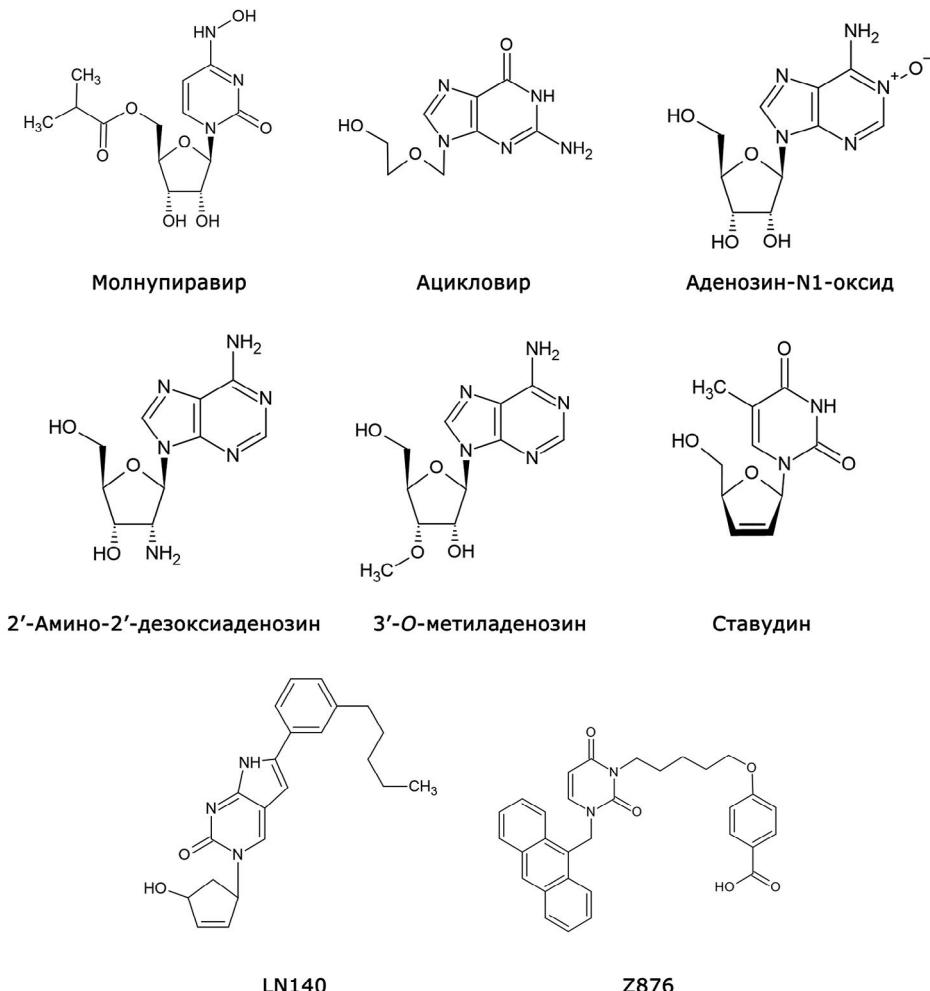


Рис. 5. Структуры исследованных соединений

fosфорилируется только ТК вируса герпеса, но не клеточными киназами, что не позволяет ему проявлять антиретровирусную активность в отношении ВИЧ-1 в обычных клетках. Через 24 ч анализировали уровень люминесценции, который коррелирует с эффективностью протекания ранних этапов репликации ВИЧ-1 (рис. 4). Зидовудин был практически одинаково активен в обеих клеточных линиях (IC_{50} составили порядка 0,4 мкМ в обоих случаях), в то время как ацикловир, практически неактивный в клетках Vero E6, эффективно ингибиравал экспрессию лентивирусного вектора в клетках Vero E6_TK (IC_{50} составили более 100 мкМ и 0,8 мкМ соответственно). Полученные данные подтвердили, что нам удалось получить линию, стабильно экспрессирующую ТК. Отсутствие различий в значениях IC_{50} для зидовудина можно объяснить тем, что данный нуклеозид в клетках Vero E6 достаточно эффективно фосфорилируется клеточными киназами, хотя в других линиях клеток его активность существенно возрасала в присутствии ТК вируса простого герпеса [28].

С учётом полученных результатов тестирование потенциальных нуклеозидных ингибиторов RdRp SARS-CoV-2 проводилось нами не только на клеточной линии Vero E6, но и на полученной линии Vero E6_TK.

Тестирование потенциальных ингибиторов RdRp SARS-CoV-2 в безопасной клеточной системе с использованием сконструированного полноразмерного репликона. Для данного исследования была выбрана серия из 6 модифицированных нуклеозидов – молнупиравир (5'-дезокси-5'-изобутирил-N4-гидроксицитидин), ацикловир (2'-амино-9-((2-гидроксиэтокси)метил)-1,9-дигидро-6Н-пурин-6-он), ставудин (2',3'-дидегидро-2',3'-дидеокситимидин), 2'-амино-2'-дезоксиаденозин, аденоzin-N1-оксид, 3'-O-метиладеноzin – и двух соединений ненуклеозидной природы: LN140, Z876 (рис. 5). В первую очередь была проверена цитотоксичность всех соединений с помощью MTT-теста, который показал, что исследуемые соединения не оказывают значительного цитотоксического действия на клетки Vero E6 и Vero E6_TK в исследованных концентрациях до 50 мкМ.

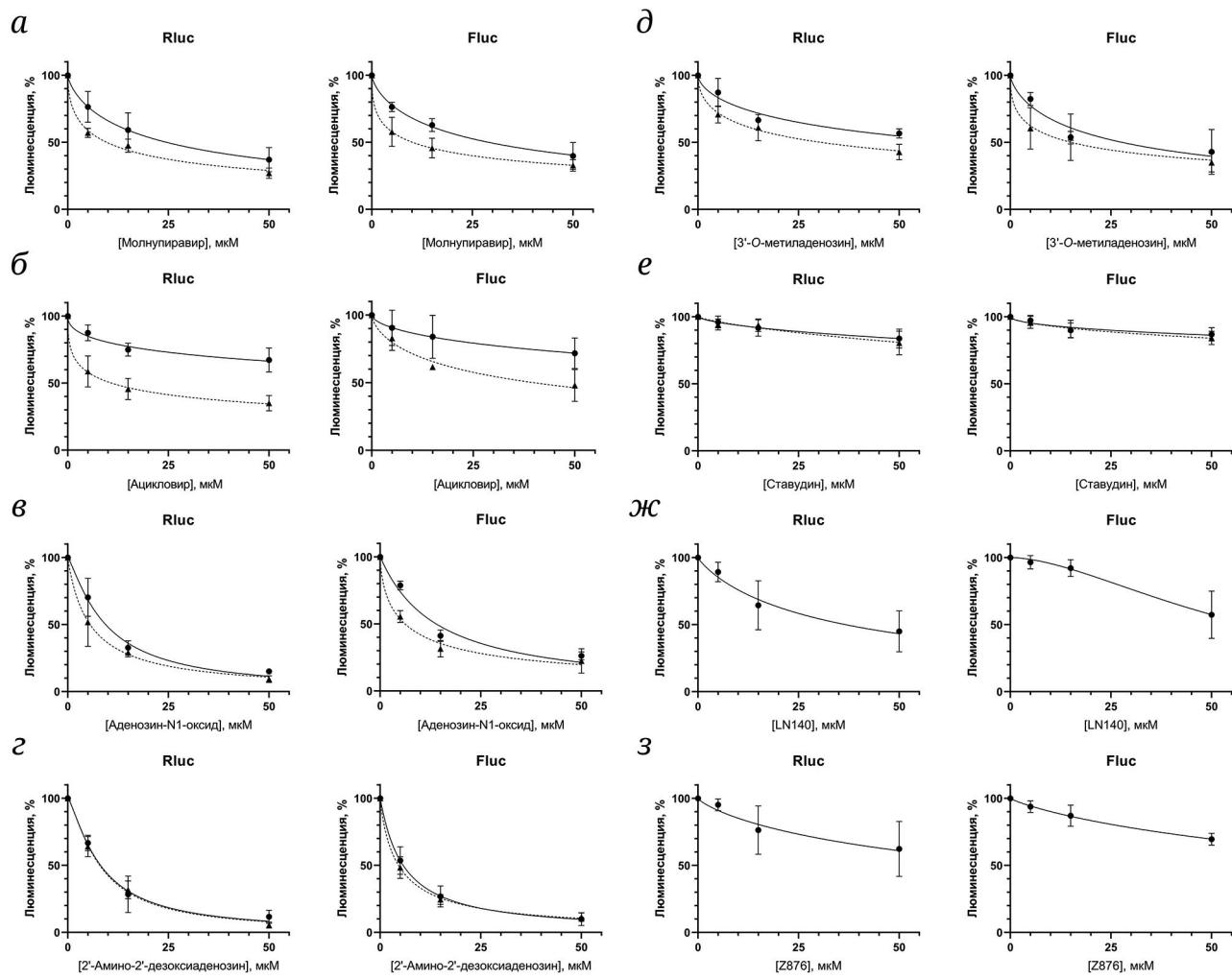


Рис. 6. Результаты тестирования способности соединений – молнупиравира (а), ацикловира (б), 2'-аденозин-N1-оксида (в), амино-2'-дезоксиаденозина (г), 3'-O-метиладенозина (д), ставудина (е), LN140 (ж) и Z876 (з) – ингибировать активность RdRp SARS-CoV-2 при использовании репликона REP в клеточных линиях Vero E6 (сплошная линия) и Vero E6_TK (пунктирная линия). Представлены средние значения по результатам не менее 4 экспериментов \pm стандартное отклонение

Анализ способности модифицированных нуклеозидов ингибировать репликацию и транскрипцию с репликона REP проверяли на обеих клеточных линиях, Vero E6 и Vero E6_TK, а соединений LN140, Z876 – только на клетках Vero E6, поскольку они могли выступать только в качестве ненуклеозидных ингибиторов полимеразы, для которых фосфорилирование не требуется. Полученные результаты представлены на рис. 6 и в табл. 1.

Молнупиравир, который является модифицированным вариантом N4-гидроксицитидина и используется для лечения пациентов, инфицированных SARS-CoV-2 [29], был использован в качестве контроля пригодности сконструированного нами репликона для скрининга потенциальных ингибиторов RdRp SARS-CoV-2. В нашей системе молнупиравир оказался несколько менее эффективен (табл. 1), чем в тестах на клетках, инфи-

цированных непосредственно SARS-CoV-2: показатель IC_{50} варьировал между 0,3 мкМ и 3,5 мкМ в зависимости от использованного изолята вируса и культуры клеток [29]. Тем не менее молнупиравир практически одинаково ингибировал репортерные белки и из первого (Rluc), и из второго (Fluc) блоков (табл. 1), т.е. он ингибировал активность RdRp и в реакции репликации вирусного генома, и в прерывистой транскрипции, результатом которой является экспрессия люциферазы Fluc. Надо также отметить, что в клетках Vero E6_TK ингибирование происходило более эффективно (рис. 6, а), что подтверждает активность молнупиравира как нуклеозидного ингибитора RdRp, для которого необходимо фосфорилирование и превращение в нуклеозидтрифосфат.

Ацикловир хорошо известен как ингибитор герпесвирусов [30, 31] и никогда не применялся для подавления SARS-CoV-2. И действительно,

Таблица 1. Ингибирующая активность исследуемых соединений (IC_{50}) в реакциях репликации вирусной РНК (экспрессия Rluc) и прерывистой транскрипции (экспрессия Fluc) при использовании репликона REP в клеточных линиях Vero E6 и Vero E6_TK

Название	Значения IC_{50}^* , мкМ			
	Rluc		Fluc	
	Vero E6	Vero E6_TK	Vero E6	Vero E6_TK
Молнунировир	25 ± 6	10 ± 2	29 ± 7	10 ± 3
Ацикловир	> 100	40 ± 10	> 100	11 ± 3
Аденозин-N1-оксид	9 ± 3	6 ± 2	14 ± 5	6 ± 2
2'-Амино-2'-дезоксиаденозин	8 ± 2	8 ± 2	6 ± 2	5 ± 1
3'-O-метиладенозин	70 ± 20	31 ± 9	28 ± 8	15 ± 4
Ставудин	> 100	> 100	> 100	> 100
LN140	37 ± 11	н.д.**	> 100	н.д.
Z876	45 ± 13	н.д.	> 100	н.д.

* Представлены средние значения по результатам не менее 4 экспериментов ± стандартное отклонение.

** н.д. – нет данных.

в клетках Vero E6 он был практически не активен в отношении репликона REP. Однако в клетках Vero E6_TK он оказался способен ингибирировать RdRp SARS-CoV-2 (рис. 6, б), хотя и значительно менее эффективно, чем молнунировир (табл. 1).

Аденозин-N1-оксид и 2'-амино-2'-дезоксиаденозин ранее никогда не тестировались в качестве ингибиторов SARS-CoV-2, но оба оказались активными ингибиторами вирусной RdRp (рис. 6, в, г соответственно). Они практически одинаково ингибировали экспрессию обеих репортерных люцифераз (табл. 1). Интересно при этом, что наличие в клетках ТК несколько усиливало ингибиторное действие аденоzin-N1-оксида, но при этом никак не влияло на активность 2'-амино-2'-дезоксиаденозина.

3'-O-метиладенозин также оказался способен ингибирировать RdRp SARS-CoV-2 (рис. 6, д), однако эффективность его ингибирующего действия оказалась ниже, чем у двух предыдущих аналогов аденоzина. Надо отметить, что 3'-O-метиладенозин сильнее влиял на эффективность прерывистой транскрипции, чем репликации, поскольку в его присутствии уровень люминесценции Fluc снижался сильнее, чем для Rluc (табл. 1). Кроме того, в клетках Vero E6_TK ингибирирование под действием 3'-O-метиладенозина происходило более эффективно, что указывает на его действие как нуклеозидного ингибитора RdRp.

В отличие от трёх предыдущих соединений ставудин является производным тимицина, способным эффективно ингибирировать РНК-зависимую ДНК-полимеразу ВИЧ-1 [32]. Однако ставудин

оказался неспособен достоверно снижать уровень ни одной из люцифераз (рис. 6, е). Исследование на клетках Vero E6_TK также не позволило детектировать его ингибирующую активность.

Соединения LN140 и Z876 не являются нуклеозидами и не могут фосфорилироваться нуклеозидкиназами, поэтому их тестировали только на линии Vero E6. Оба соединения оказались заметно более эффективными ингибиторами экспрессии первой люциферазы, Rluc (рис. 6, ж и з соответственно). Надо отметить, что ингибирующая активность LN140 при использовании репликона оказалась сравнима с его способностью ингибировать гибель клеток Vero, индуцированную заражением штаммом PIK35 вируса SARS-CoV-2 [33]. Этот результат дополнительно подтверждает функциональную активность нашего репликона и его применимость для скрининга ингибиторов RdRp SARS-CoV-2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Пандемия инфекционного заболевания COVID-19, которое вызывается бетакоронавирусом SARS-CoV-2, сделала крайне актуальной разработку простых и безопасных клеточных систем для изучения патогенеза этой вирусной инфекции, позволяющих манипулировать геномом вируса, а также проводить высокопроизводительный скрининг его потенциальных ингибиторов. В случае коронавирусов создание таких систем осложняется крайне большим размером вирусной РНК,

составляющим в зависимости от вируса 26–32 тысяч оснований [34]. Тем не менее развитие методов молекулярного клонирования позволило работать с кДНК коронавирусов и собирать полноразмерные вирусные кДНК из отдельных фрагментов. Полученные таким образом генетические системы сыграли значительную роль в содействии разработке вакцин против SARS-CoV-2 и терапевтических средств первого поколения.

Удобным вариантом системы для скрининга противовирусных препаратов является полноразмерная кДНК вируса, клонированная в ВАС. Векторы на основе ВАС подходят для клонирования фрагментов ДНК больших размеров, до 300 тысяч п.н. [35]. При размножении в клетках *E. coli* сохраняется только одна или две копии ВАС на клетку, что позволяет минимизировать токсичность, связанную с присутствием последовательностей вирусного генома [36]. После трансфекции эукариотических клеток ВАС-вектором, содержащим полноразмерную кДНК вируса, клеточной РНК-полимеразой синтезируется вирусная РНК и собираются инфекционные вирусные частицы.

Поскольку нам необходимо было создать безопасную клеточную систему, которая позволила бы проводить скрининг ингибиторов SARS-CoV-2, а также исследовать отдельные этапы репликации и транскрипции вирусной РНК, для клонирования в ВАС-вектор была использована не полноразмерная кДНК, а кДНК модифицированного генома SARS-CoV-2, не содержащего генов структурных белков S, E и M (рис. 1). Помимо этого, впервые в состав репликона был вставлен не один, а два блока репортерных генов. Первый блок, представленный люциферазой *Renilla reniformis* и зелёным флуоресцентным белком (Rluc-GFP), находится под контролем CMV-промотора. Второй блок репортерных генов представлен люциферазой светлячка *Photinus pyralis* и красным флуоресцентным белком (Fluc-RFP) и находится после последовательности, регулирующей прерывистую транскрипцию (transcription regulation sequence, TRS), характерную для семейства *Coronaviridae*. При синтезе (–)цепи РНК РНК-полимерный комплекс диссоциирует от (+)РНК-матрицы в районе TRS, связывается в области 5'-UTR и продолжает синтез РНК. В некоторых случаях «перескок» РНК-полимеразного комплекса возможен и при синтезе (+)РНК-цепи; в этом случае комплекс диссоциирует от TRS-последовательности, расположенной в 5'-UTR, и вновь гибридизуется с TRS перед началом белок-кодирующей последовательности. Полученные в процессе такой прерывистой транскрипции укороченные РНК служат матрицей для последующей трансляции неструктурных белков SARS-CoV-2 [5]. В сконструированном нами репликоне белки второго блока репортеров

должны синтезироваться именно с такой укороченной РНК, которая образуется в результате работы вирусной RdRp. В то же время экспрессия первого репортера, который находится под контролем CMV-промотора, может происходить как в результате репликации вирусной РНК под действием RdRp самого вируса, так и в результате транскрипции под действием клеточной РНК-полимеразы II (рис. 2). Соответственно, уровень экспрессии люциферазы Rluc из первого репортерного блока должен быть выше уровня экспрессии люциферазы Fluc из второго блока. Именно этот результат был зафиксирован после трансфекции клеток Vero E6 сконструированным репликоном REP (рис. 3). Тем не менее для дополнительной проверки функциональной активности закодированной в репликоне вирусной RdRp нами был создан мутантный вариант репликона, REP_mut, в котором в активном центре полимеразной субъединицы RdRp (NSP12) произведены замены аминокислот (D760A, D761A) методом сайт-направленного мутагенеза. Указанные замены, согласно литературным данным [25], приводят к потере катализической активности RdRp. Трансфекция клеток Vero E6 репликоном REP_mut показала, что в этом случае экспрессия первой люциферазы, Rluc, существенно снижена, а второй, Fluc – практически отсутствует (рис. 3). Эти данные подтвердили функциональную активность сконструированного репликона REP и позволили использовать его для скрининга потенциальных ингибиторов полимеразы SARS-CoV-2. При этом проверялась способность исследуемых соединений подавлять экспрессию как первой, так и, главное, второй репортерной полимеразы – Fluc, которая является продуктом прерывистой транскрипции, осуществляющей вирусной полимеразой.

Существует два типа ингибиторов вирусных полимераз: нуклеозидные и ненуклеозидные [37]. Нуклеозидные ингибиторы – соединения, имеющие структурное сходство с природными нуклеозидами, которые воспринимаются вирусным репликативным аппаратом как субстрат для синтеза нуклеиновой кислоты – включаются в растущую цепь нуклеиновой кислоты и нарушают репликацию вируса. Для того чтобы полимераза могла встроить нуклеозидные ингибиторы в растущую цепь нуклеиновой кислоты, они должны быть предварительно превращены в нуклеозид-5'-трифосфаты в результате тройного фосфорилирования клеточными ферментами.

Ненуклеозидные ингибиторы обычно действуют как аллостерические ингибиторы, и их связывание вызывает структурные изменения активного центра фермента, приводящие к потере его ферментативной активности. Для проявления ингибирующего действия никакой

дополнительной модификации ненуклеозидным ингибиторам не требуется.

Мы использовали соединения как нуклеозидной, так и ненуклеозидной природы для проверки их способности ингибировать функционирование закодированной в репликоне REP вирусной полимеразы. В качестве контрольного нуклеозидного ингибитора использовали молнуниравир, встраивание которого в РНК приводит к ошибкам полимеразы при её повторном прохождении через сайт включения ингибитора, в результате чего происходит изменение нуклеотидной последовательности генома вируса [29]. Учитывая, что модифицированные нуклеозиды могут оказаться плохими субстратами для клеточных нуклеозидкиназ, осуществляющих первое фосфорилирование, мы сконструировали клеточную линию Vero E6_TK, в геноме которой содержится ген ТК. Ранее было показано, что наличие ТК в клетке повышает способность 3'-азидотимицина ингибировать репликацию ВИЧ-1 [28].

Молнуниравир практически одинаково ингибирал экспрессию обеих люцифераз, при этом в клетках Vero E6_TK ингибирование происходило более эффективно, чем в клетках Vero E6 (рис. 6, а). Это дополнительно подтвердило активность молнуниравира как нуклеозидного ингибитора RdRp, для которого необходимо фосфорилирование. Убедившись в том, что с помощью репликона REP и клеточной линии Vero E6_TK можно не только проверить ингибирующее действие соединений, но и достоверно показать механизм их действия как нуклеозидных ингибиторов полимеразы, мы проверили активность нескольких модифицированных нуклеозидов: ацикловира, 2'-амино-2'-дезоксиаденозина, аденоцин-N1-оксида, 3'-О-метиладенозина и ставудина (2',3'-дидегидро-2',3'-дидеокситимицина).

Ацикловир является известным ингибитором герпесвирусов, однако в присутствии ТК он способен также ингибировать обратную транскриптазу ВИЧ-1 [38]. Мы впервые показали, что в клетках Vero E6_TK ацикловир способен ингибировать RdRp SARS-CoV-2 (рис. 6, б), хотя и гораздо менее эффективно, чем молнуниравир (табл. 1). В то же время в клетках Vero E6 ацикловир не проявлял ингибирующей активности.

Из всех модифицированных аналогов аденоцина – 2'-амино-2'-дезоксиаденозина, аденоцин-N1-оксида и 3'-О-метиладенозина – наиболее эффективным ингибитором экспрессии обеих люцифераз оказался 2'-амино-2'-дезоксиаденозин (табл. 1). Интересно при этом, что его ингибирующее действие не зависело от наличия ТК в клетках. Возможно, наличие 2'-аминогруппы не препятствует узнаванию и эффективному фосфорилированию этого нуклеозида клеточной аденоцинкиназой.

Аденозин-N1-оксид и 3'-О-метиладенозин также оказались ингибиторами RdRp SARS-CoV-2, но их ингибирующее действие сильнее проявлялось в клетках Vero E6_TK (табл. 1). Отметим также, что ингибирующая активность 3'-О-метиладенозина была заметно ниже, чем у двух других аналогов аденоцина. Способность ингибировать REP для всех исследованных нами производных аденоцина была показана впервые. Ранее *in vitro* изучалась способность ингибировать действие полимеразного комплекса, состоящего из полимеразной субъединицы NSP12 и субъединиц NSP7 и NSP8, для 5'-трифосфатов 2'-амино-2'-дезоксиуридина и 3'-О-метилуридина, т.е. аналогов уридина, содержащих такие же модификации, как у исследованных нами аналогов аденоцина. При этом было обнаружено, что 2'-амино-2'-дезоксиуридин не является ингибитором полимеразы, а 5'-трифосфат 3'-О-метилуридина эффективно встраивается в РНК и обрывает рост цепи [39].

Ставудин известен как эффективный ингибитор обратной транскриптазы ВИЧ-1 [40]. В нашем исследовании он был выбран, поскольку в *in vitro* экспериментах по ингибированию полимеразного комплекса, состоящего из полимеразной субъединицы NSP12 и субъединиц NSP7 и NSP8, 5'-трифосфат ставудина эффективно терминировал синтез новой цепи РНК [39]. Однако в экспериментах на разработанной нами клеточной системе ставудин не проявил ингибирующее действие. Очевидно, это связано с различиями использованных систем для тестирования ингибиторов, из-за которых данные, полученные на рекомбинантных белках и в клеточных системах, не всегда совпадают.

В качестве потенциальных ненуклеозидных ингибиторов RdRp SARS-CoV-2 мы исследовали соединения LN140 и Z876, которые ранее продемонстрировали антивирусную активность на клетках Vero E6, инфицированных SARS-CoV-2 [20, 41]. Для соединения Z876 было также с помощью докинга показано, что оно может связываться с гидрофобной областью RdRp этого вируса, и экспериментально продемонстрирована его способность ингибировать полимеразный комплекс, состоящий из полимеразной субъединицы NSP12 и субъединиц NSP7 и NSP8. Эти результаты позволили авторам предположить, что Z876 является ненуклеозидным ингибитором вирусной полимеразы. Однако если IC₅₀ для Z876 в клетках Vero E6 по отношению к различным штаммам SARS-CoV-2 варьировалась от 20 до 30 мкМ, то его IC₅₀ по отношению к полимеразному комплексу была больше 50 мкМ [20]. Мы решили проверить, являются ли соединения LN140 и Z876 ненуклеозидными ингибиторами RdRp SARS-CoV-2 на сконструированном нами репликоне. Как LN140, так и Z876 оказались способны ингибировать экспрессию

только первой люциферазы Rluc (табл. 1). При этом ингибирующая активность обоих соединений была сравнима с активностью, приведённой в опубликованных ранее работах: для LN140 IC_{50} 37 ± 11 (табл. 1) и 21 ± 6 [33], для Z876 IC_{50} 45 ± 13 (табл. 1) и 29,33 для штамма Дельта [20]. Учитывая, что Rluc образуется в результате трансляции с РНК, которая может синтезироваться как вирусной RdRp, так и клеточной РНК-полимеразой II, мы не можем однозначно утверждать, что эти соединения действительно являются ненуклеозидными ингибиторами RdRp SARS-CoV-2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведённого исследования нами была получена улучшенная безвирусная репортерная система для поиска нуклеозидных и ненуклеозидных ингибиторов RdRp SARS-CoV-2. Для облегчения поиска нуклеозидных ингибиторов RdRp была создана клеточная линия Vero E6_TK, экспрессирующая тимидинкиназу вируса простого герпеса, способную осуществить первую стадию фосфорилирования различным образом модифицированных нуклеозидов в клетке. Созданная система была использована для проверки способности ряда соединений ингибировать каталитическую активность RdRp SARS-CoV-2. В результате проведённого тестирования была впервые обнаружена антивирусная активность у 2'-амино-2'-дезоксиаденозина и аденоzin-N1-оксида, превышающая активность используемого для лечения COVID-19 молнунипиравира.

Вклад авторов. Концепция – А.Н.А., М.Б.Г., С.П.К., С.Н.К. и А.Л.Х.; методология – А.Н.А., С.О.Г., М.Б.Г., С.П.К. и А.Л.Х.; проведение экспериментов – Л.А.А., А.Н.А., С.О.Г., Е.С.М., М.С.Н., С.П.К., А.Л.Х., А.А.Ш. и М.В.Я.; анализ данных – А.Н.А., С.П.К. и А.А.Ш.; научное руководство – М.Б.Г., С.Н.К. и А.Л.Х.; написание текста – А.Н.А., М.Б.Г., С.П.К., А.Л.Х. и А.А.Ш.; редактирование текста – А.Н.А., М.Б.Г., С.П.К., С.Н.К. и А.Л.Х.; привлечение финансирования – С.Н.К. Все авторы прочитали текст статьи и согласны на её публикацию.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации («Аналоги компонентов нуклеиновых кислот как потенциальные ингибиторы коронавирусов»).

Благодарности. Лентивирусный вектор, кодирующий тимидинкиназу вируса простого герпеса первого типа, был любезно предоставлен к.б.н., н.с. Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН И.В. Алексеенко. Отбор клеток Vero E6_TK проводили под руководством д.х.н., проф. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова М.П. Рубцовой с помощью сортировки GFP+ клеток на проточном цитофлуориметре BD FACSaria III, приобретённом по Программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова ПНР 5.13.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Amani, B., and Amani, B. (2023) Efficacy and safety of nirmatrelvir/ritonavir (Paxlovid) for COVID-19: A rapid review and meta-analysis, *J. Med. Virol.*, **95**, e28441, <https://doi.org/10.1002/jmv.28441>.
2. Sola, I., Almazan, F., Zuniga, S., and Enjuanes, L. (2015) Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses, *Annu. Rev. Virol.*, **2**, 265-288, [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3).
3. Masters, P. S. (2006) The molecular biology of coronaviruses, *Adv. Virus Rev.*, **66**, 193-292, [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3).
4. Kurhade, C., Xie, X., and Shi, P.-Y. (2023) Reverse genetic systems of SARS-CoV-2 for antiviral research, *Antiviral Res.*, **210**, 105486, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105486>.
5. Галкин С. О., Анисенко А. Н., Шадрина О. А., Готтих М. Б. (2022) Генно-инженерные системы для изучения вирусных патогенов человека из семейства Coronaviridae, *Мол. Биол.*, **56**, 82-102, <https://doi.org/10.31857/S0026898422010025>.
6. Chiem, K., Ye, C., and Martinez-Sobrido, L. (2020) Generation of recombinant SARS-CoV-2 using a bacterial artificial chromosome, *Curr. Protoc. Microbiol.*, **59**, e126, <https://doi.org/10.1002/cpmc.126>.
7. Chiem, K., Park, J., Morales Vasquez, D., Plemper, R. K., Torrelles, J. B., Kobie, J. J., Walter, M. R., Ye, C., and Martinez-Sobrido, L. (2022) Monitoring SARS-CoV-2 infection using a double reporter-expressing virus, *Microbiol. Spectr.*, **10**, e0237922, <https://doi.org/10.1128/spectrum.02379-22>.
8. Ye, C., and Martinez-Sobrido, L. (2022) Use of a bacterial artificial chromosome to generate recombinant SARS-CoV-2 expressing robust levels of reporter genes, *Microbiol. Spectr.*, **10**, e0273222, <https://doi.org/10.1128/spectrum.02732-22>.

9. Chiem, K., Morales Vasquez, D., Park, J. G., Platt, R. N., Anderson, T., Walter, M. R., Kobie, J. J., Ye, C., and Martinez-Sobrido, L. (2021) Generation and Characterization of recombinant SARS-CoV-2 expressing reporter genes, *J. Virol.*, **95**, e0220920, <https://doi.org/10.1128/JVI.02209-20>.
10. Jin, Y.-Y., Lin, H., Cao, L., Wu, W.-C., Ji, Y., Du, L., Jiang, Y., Xie, Y., Tong, K., Xing, F., Zheng, F., Shi, M., Pan, J.-A., Peng, X., and Guo, D. (2021) A convenient and biosafe replicon with accessory genes of SARS-CoV-2 and its potential application in antiviral drug discovery, *Virol. Sin.*, **36**, 913-923, <https://doi.org/10.1007/s12250-021-00385-9>.
11. Zhang, Q. Y., Deng, C. L., Liu, J., Li, J. Q., Zhang, H. Q., Li, N., Zhang, Y. N., Li, X. D., Zhang, B., Xu, Y., and Ye, H. Q. (2021) SARS-CoV-2 replicon for high-throughput antiviral screening, *J. Gen. Virol.*, **102**, 001583, <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001583>.
12. Kotaki, T., Xie, X., Shi, P. Y., and Kameoka, M. (2021) A PCR amplicon-based SARS-CoV-2 replicon for antiviral evaluation, *Sci. Rep.*, **11**, 2229, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105486>.
13. Wang, B., Zhang, C., Lei, X., Ren, L., Zhao, Z., Wang, J., and Huang, H. (2021) Construction of non-infectious SARS-CoV-2 replicons and their application in drug evaluation, *Virol. Sin.*, **36**, 5, 890-900, <https://doi.org/10.1007/s12250-021-00369-9>.
14. He, X., Quan, S., Xu, M., Rodriguez, S., Goh, S. L., Wei, J., Fridman, A., Koeplinger, K. A., Carroll, S. S., Grobler, J. A., Espeseth, A. S., Olsen, D. B., Hazuda, D. J., and Wang, D. (2021) Generation of SARS-CoV-2 reporter replicon for high-throughput antiviral screening and testing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2025866118, <https://doi.org/10.1073/pnas.2025866118>.
15. Luo, Y., Yu, F., Zhou, M., Liu, Y., Xia, B., Zhang, X., Liu, J., Zhang, J., Du, Y., Li, R., Wu, L., Zhang, X., Pan, T., Guo, D., Peng, T., and Zhang, H. (2021) Engineering a reliable and convenient SARS-CoV-2 replicon system for analysis of viral RNA synthesis and screening of antiviral inhibitors, *mBio*, **12**, e02754-20, <https://doi.org/10.1128/mBio.02754-20>.
16. Kwong, C. D., Krauth, C. A., Shortnacy-Fowler, A. T., Arnett, G., Hollingshead, M. G., Shannon, W. M., Montgomery, J. A., and Secrist, J. A. III (1998) Synthesis and antiviral evaluation of analogs of adenosine-*N*¹-oxide and 1-(benzyloxy)adenosine, *Nucleosid. Nucleotid.*, **17**, 1409-1443, <https://doi.org/10.1080/07328319808003478>.
17. Alexandrova, L. A., and Smrt, J. (1977) Synthesis of cytidylyl-(3'→5')-2'-O(and 3'-O)-methyladenosine 3'-O(and 2'-O)-N-formyl-L-methionyl derivatives, *Collection Czech. Chem. Commun.*, **42**, 1694-1704, <https://doi.org/10.1135/cccc19771694>.
18. Шаркин Ю. А., Ясько М. В., Скоблов А. Ю., Александрова Л. А. (1996) Синтез 5'-Н-фосфонатов и фторфосфатов 2'-модифицированных нуклеозидов, *Биоорг. Хим.*, **22**, 297-302.
19. Klimenko, A., Matyugina, E., Logashenko, E., Solyev, P., Zenkova, M., Kochetkov, S., and Khandazhinskaya, A. (2018) Novel 5'-norcarbocyclic derivatives of bicyclic pyrrolo-and furano[2,3-d]pyrimidine nucleosides, *Molecules*, **23**, 2654, <https://doi.org/10.3390/molecules23102654>.
20. Siniavin, A. E., Novikov, M. S., Gushchin, V. A., Terechov, A. A., Ivanov, I. A., Paramonova, M. P., Gureeva, E. S., Russu, L. I., Kuznetsova, N. A., Shidlovskaya, E. V., Luyksaar, S. I., Vasina, D. V., Zolotov, S. A., Zigangirova, N. A., Logunov, D. A., and Gintzburg, A. L. (2022) Antiviral activity of N1,N3-disubstituted uracil derivatives against SARS-CoV-2 variants of concern, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 10171, <https://doi.org/10.3390/ijms231710171>.
21. Wang, Y., Wang, F., Wang, R., Zhao, P., and Xia, Q. (2015) 2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori*, *Sci. Rep.*, **5**, 16273, <https://doi.org/10.1038/srep16273>.
22. Almazan, F., DeDiego, M. L., Galan, C., Escors, D., Alvarez, E., Ortego, J., Sola, I., Zuniga, S., Alonso, S., Moreno, J. L., Nogales, A., Capiscol, C., and Enjuanes, L. (2006) Construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus infectious cDNA clone and a replicon to study coronavirus RNA synthesis, *J. Virol.*, **80**, 10900-10906, <https://doi.org/10.1128/JVI.00385-06>.
23. Ye, C., Chiem, K., Park, J.-G., Oladunni, F., Platt, R. N., Anderson, T., and Martinez-Sobrido, L. (2020) Rescue of SARS-CoV-2 from a single bacterial artificial chromosome, *mBio*, **11**, e02168-20, <https://doi.org/10.1128/mbio.02168-20>.
24. Wright, D. A., Thibodeau-Beganny, S., Sander, J. D., Winfrey, R. J., Hirsh, A. S., Eichtinger, M., Fu, F., Porteus, M. H., Dobbs, D., Voytas, D. F., and Joung, J. K. (2006) Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly, *Nat. Protoc.*, **1**, 1637-1652, <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.259>.
25. Gao, Y., Yan, L., Huang, Y., Liu, F., Zhao, Y., Cao, L., Wang, T., Sun, Q., Ming, Z., Zhang, L., Ge, J., Zheng, L., Zhang, Y., Wang, H., Zhu, Y., Zhu, C., Hu, T., Hua, T., Zhang, B., Yang, X., Li, J., Yang, H., Liu, Z., Xu, W., Guddat, L. W., Wang, Q., Lou, Z., and Rao, Z. (2020) Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus, *Science*, **368**, 779-782, <https://doi.org/10.1126/science.abb7498>.
26. Emeny, J. M., and Morgan, M. J. (1979) Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production, *J. Gen. Virol.*, **43**, 247-252, <https://doi.org/10.1099/0022-1317-43-1-247>.
27. Chew, T., Noyce, R., Collins, S. E., Hancock, M. H., and Mossman, K. L. (2009) Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production, *Mol. Immunol.*, **46**, 393-399, <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.10.010>.

28. Guettari, N., Loubiere, L., Brisson, E., and Klatzmann, D. (1997) Use of herpes simplex virus thymidine kinase to improve the antiviral activity of zidovudine, *Virology*, **235**, 398-405, <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8706>.
29. Tian, L., Pang, Z., Li, M., Lou, F., An, X., Zhu, S., Song, L., Tong, Y., Fan, H., Fan, J. (2022) Molnupiravir and its antiviral activity against COVID-19, *Front. Immunol.*, **13**, 855496, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.855496>.
30. Elion, G. B., Furman, P. A., Fyfe, J. A., De Miranda, P., Beauchamp, L., and Schaeffer, H. J. (1977) Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5716-5720, <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5716>.
31. Freeman, S., and Gardiner, J. M. (1996) Acyclic nucleosides as antiviral compounds, *Mol. Biotechnol.*, **5**, 125-137, <https://doi.org/10.1007/BF02789061>.
32. Hurst, M., and Noble, S. (1999) Stavudine: an update of its use in the treatment of HIV infection, *Drugs*, **58**, 919-949, <https://doi.org/10.2165/00003495-199958050-00012>.
33. Матюгина Е. С., Новиков М. С., Козловская Л. И., Волок В. П., Шустова Е. Ю., Ишмухаметов А. А., Кочетков С. Н., Хандажинская А. Л. (2021) Оценка противовирусного потенциала модифицированных гетероциклических оснований и 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов в отношении SARS-CoV-2, *Acta Naturae*, **13**, 78-81, <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11479>.
34. Lai, M. M., and Cavanagh, D. (1997) The molecular biology of coronaviruses, *Adv. Virus Res.*, **48**, 1-100, [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60286-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60286-9).
35. Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., and Simon, M. (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 8794-8797, <https://doi.org/10.1073/pnas.89.18.8794>.
36. Adler, H., Messerle, M., and Koszinowski, U. H. (2003) Cloning of herpesviral genomes as bacterial artificial chromosomes, *Rev. Med. Virol.*, **13**, 111-121, <https://doi.org/10.1002/rmv.380>.
37. Singh, A. K., and Das, K. (2022) Insights into HIV-1 reverse transcriptase (RT) inhibition and drug resistance from thirty years of structural studies, *Viruses*, **14**, 1027, <https://doi.org/10.3390/v14051027>.
38. Lisco, A., Vanpouille, C., Tchesnokov, E. P., Grivel, J. C., Biancotto, A., Brichacek, B., Elliott, J., Fromentin, E., Shattock, R., Anton, P., Gorelick, R., Balzarini, J., McGuigan, C., Derudas, M., Gotte, M., Schinazi, R. F., and Margolis, L. (2008) Acyclovir is activated into a HIV-1 reverse transcriptase inhibitor in herpesvirus-infected human tissues, *Cell Host Microbe*, **4**, 260-270, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.07.008>.
39. Jockusch, S., Tao, C., Li, X., Anderson, T. K., Chien, M., Kumar, S., Russo, J. J., Kirchdoerfer, R. N., and Ju, J. (2020) A library of nucleotide analogues terminate RNA synthesis catalyzed by polymerases of coronaviruses that cause SARS and COVID-19, *Antiviral Res.*, **180**, 104857, <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104857>.
40. Huang, P., Farquhar, D., and Plunkett, W. (1992) Selective action of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidinetriphosphate on human immunodeficiency virus reverse transcriptase and human DNA polymerases, *J. Biol. Chem.*, **267**, 2817-2822.
41. Matyugina, E., Petushkov, I., Surzhikov, S., Kezin, V., Maslova, A., Ivanova, O., Smirnova, O., Kirillov, I., Fedyakina, I., Kulbachinskiy, A., Kochetkov, S., and Khandazhinskaya, A. (2023) Nucleoside analogs that inhibit SARS-CoV-2 replication by blocking interaction of virus polymerase with RNA, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 3361, <https://doi.org/10.3390/ijms24043361>.

DUAL-REPORTER SARS-CoV-2 REPLICON FOR SCREENING VIRAL POLYMERASE INHIBITORS

**S. P. Korolev^{1,2,3*}, A. A. Shulepova^{1,3}, A. N. Anisenko^{1,2,3}, S. O. Galkin³,
L. A. Alexandrova⁴, M. V. Jasko⁴, E. S. Matyugina⁴, M. S. Novikov⁵,
A. L. Khandazhinskaya⁴, S. N. Kochetkov^{2,4}, and M. B. Gottikh^{1,2}**

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia; e-mail: spkorolev@mail.ru*

² *Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

³ *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia*

⁴ *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia*

⁵ *Department of Pharmaceutical & Toxicological Chemistry, Volgograd State Medical University,
400131 Volgograd, Russia*

To prepare a safe cellular system for testing inhibitors targeting the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of SARS-CoV-2, a genetic construct containing viral cDNA with two blocks of reporter genes while lacking genes encoding the structural S, E and M proteins was engineered. The first reporter block, consisting of renilla luciferase and green fluorescent protein (Rluc-GFP), located upstream of the SARS-CoV-2 5'-UTR. Meanwhile, the second block, represented by firefly luciferase and red fluorescent protein (Fluc-RFP), was positioned downstream of the transcription regulatory sequence (TRS-N). Although the first block of reporter genes can be transcribed by both viral RdRp and cellular polymerases, the second block can only be transcribed by the viral polymerase, aligning with the *Coronaviridae* discontinuous transcription mechanism. This allowed us to accurately assess the effectiveness of viral RdRp inhibition. To facilitate the search for nucleoside RdRp inhibitors the cell line was obtained expressing herpes simplex virus thymidine kinase which provides the first stage of nucleoside phosphorylation. When screening the ability of a number of compounds to inhibit the catalytic activity of SARS-CoV-2 RdRp, we first discovered the antiviral activity of 2'-amino-2'-deoxyadenosine and adenosine-N1-oxide, exceeding the activity of molnupiravir, a therapeutic agent used in the treatment of COVID-19.

Keywords: dual-reporter replicon, inhibitors, RNA-dependent RNA polymerase, SARS-CoV-2, viruses