

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА РЕПЛИКАЦИЮ СУБГЕНОМНОГО РЕПЛИКОНА ВИРУСА ГЕПАТИТА С В КЛЕТКЕ

Е.Л. Мищенко¹, К.Д. Безматерных^{1,2}, В.А. Иванисенко¹,
В.А. Лихошвай^{1,2}, Н.А. Колчанов^{1,2}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: elmish@bionet.nsc.ru;

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Математическое моделирование является полезным инструментом для изучения действия противовирусных препаратов на сложные системы, одной из которых является вирус–клетка. Построена математическая модель, описывающая действие потенциальных противовирусных препаратов на репликацию РНК репликона вируса гепатита С в Huh-7 клетке. Рассчитаны динамики вирусных компонент (РНК, полипротеина, активной репликазы, супрамолекулярных комплексов плюс- и минус-цепей РНК и активной репликазы) в клетке в присутствии потенциальных противовирусных препаратов – ингибиторов инициации трансляции. Для ингибиторов разных типов – NS3/NS4A протеазы, NS5B полимеразы и инициации трансляции рассчитаны зависимости минимального времени, требуемого для удаления репликона из клетки, от аффинности ингибитора к мишени. Сравнение этих зависимостей показало, что наиболее эффективной мишенью действия препаратов является NS5B полимеразы.

Ключевые слова: математическое моделирование, субгеномный репликон вируса гепатита С, предсказание эффектов противовирусных препаратов, специфические ингибиторы белков ВГС.

Введение

Инфекция вирусом гепатита С (ВГС) способна вызывать тяжелое хроническое поражение печени, часто приводящее к циррозу и (или) злокачественному перерождению клеток печени. В настоящее время около 2–3 % мирового населения инфицировано ВГС и, согласно прогнозам, распространенность этой инфекции в ближайшем будущем будет увеличиваться (Hoofnagle, 2002; Chou *et al.*, 2004). Поиск новых и эффективных анти-ВГС препаратов чрезвычайно актуален, так как вакцина против ВГС не получена, а современная терапия, основанная на комбинированном применении интерферона альфа (IFN) и нуклеозидного аналога рибавирина, малоэффективна (Dudley *et al.*, 2006; El-Gogo *et al.*, 2008).

Знание жизненного цикла ВГС предоставляет новые перспективы для разработки эффектив-

ных противовирусных препаратов, направленно действующих на мишени ВГС. В настоящее время в качестве таких потенциальных препаратов проходят испытания высокоспецифичные ингибиторы NS3/NS4A протеазы (Pause *et al.*, 2003; Tsantrizos *et al.*, 2003), NS5B полимеразы (Tomei *et al.*, 2004), а также ингибиторы инициации трансляции генома ВГС (Tallet-Lopez *et al.*, 2003). Клеточная линия Huh-7, способная реплицировать субгеномный фрагмент ВГС (РНК репликон ВГС, кодирующий неструктурные белки NS2-NS5B), является удобной модельной системой для изучения действия анти-ВГС препаратов. После трансфекции Huh-7 клеток репликоном ВГС концентрация репликона в клетках растет и через 2–3 дня выходит на стационарный уровень (470–5000 молекул репликона на клетку). Стационарная концентрация репликона в клетках сохраняется в процессе культивирования клеток (Lohmann

et al., 1999; Quinkert *et al.*, 2005). Новые анти-ВГС препараты тестируют по эффективности подавления стационарной концентрации РНК репликона ВГС в клетках.

Математическое моделирование может быть полезным инструментом для изучения действия противовирусных препаратов на такие сложные системы, как вирус–клетка. Математическая модель позволяет численно исследовать поведение молекулярно-генетической системы, проводить оценки действия потенциальных противовирусных препаратов, выявлять оптимальные мишени действия препаратов, а также вырабатывать оптимальную терапевтическую стратегию. Одной из проблем при разработке математической модели репликации репликона ВГС в клетке является описание предполагаемых механизмов, ответственных за установление стационарного уровня репликона, так как эти механизмы до сих пор не ясны. Были получены две разные математические модели репликации репликона ВГС в клетке (Dahari *et al.*, 2007; Mishchenko *et al.*, 2007). В модели (Dahari *et al.*, 2007) фактором, ограничивающим репликацию репликона ВГС, является количество активных рибосом (0,1 % общего количества рибосом в эукариотической клетке). В модели, описанной нами ранее (Mishchenko *et al.*, 2007), в качестве фактора, лимитирующего репликацию репликона ВГС, был взят некоторый обобщенный клеточный фактор F , критичный для формирования активной репликазы ВГС. Экспериментальные данные подтверждают участие некоторых клеточных факторов в формировании этой репликазы, включающей менее 0,1 % всех неструктурных белков ВГС (Gao *et al.*, 2004; Quinkert *et al.*, 2005; Randall *et al.*, 2007). Кроме того, ранее сконструированная модель (Mishchenko *et al.*, 2007) включает действие потенциальных анти-ВГС препаратов – специфических ингибиторов вирусных ферментов NS3/NS4A протеазы и NS5B полимеразы.

IRES (internal ribosomal entry site) область генома ВГС высококонсервативна и критична для инициации трансляции (Sarnov, 2003). В последнее время с целью получения потенциальных анти-ВГС препаратов исследуются антисенс-олигомеры к доменам IRES, так как они способны блокировать инициацию трансляции генома ВГС (Tallet-Lopez *et al.*, 2003;

Kikuchi *et al.*, 2005). Препараты такого типа могут оказаться весьма перспективными, так как в отличие от ингибиторов вариабельных вирусных ферментов вирус не будет проявлять устойчивости к антисенс-олигомерам IRES. Модель (Mishchenko *et al.*, 2007) чувствительна к параметру, контролирующему скорость трансляции репликона. В этой связи представляло интерес ввести в модель описание механизма действия ингибиторов инициации трансляции и исследовать действие этого типа ингибиторов на репликацию репликона ВГС в клетке.

Математическая модель, представленная в данной работе, расширена введением механизма действия ингибиторов инициации трансляции. Рассчитаны кинетики РНК ВГС и других важных вирусных компонент в присутствии препаратов этого типа. Для ингибиторов разных типов (NS3/NS4A протеазы, NS5B полимеразы и инициации трансляции) оценено минимальное время, необходимое для удаления репликона из клетки, в зависимости от аффинности ингибитора к мишени. NS5B полимеразы определена как наиболее результативная мишень действия потенциальных анти-ВГС препаратов.

Материалы и методы

Описание метода. Для построения математической модели и выполнения расчетов использовался пакет MGSMoeller (Kazantsev *et al.*, 2008). Оценку параметров проводили, как описано в подразделе «Оценка параметров». Концентрации клеточных компонент выражали числом молекул в клетке.

Описание модели. В математическую модель (Mishchenko *et al.*, 2007) был дополнительно включен механизм действия ингибиторов инициации трансляции (рис. 1). Модель была построена на основании следующих основных предположений: трансляция РНК репликона ВГС с образованием полипротеина (Z) происходит с константой скорости k_1 , Z деградирует с константой скорости μ_z , уравнение (1). Процессинг Z приводит к образованию неактивной репликазы (M^*) с константой скорости k_2 , уравнения (1) и (2). Интегральный клеточный фактор (F) взаимодействует с M^* с константой скорости k_3 с образованием минорной фракции активной репликазы (M), способной реплици-

(Tallet-Lopez *et al.*, 2003). Мы предположили, что при взаимодействии этого типа ингибитора L_{r^+} с плюс-цепью РНК r^+ образуется нетранслируемый комплекс $r^+L_{r^+}$ с константой скорости k_{12} , который способен реплицироваться с образованием r^- . Комплекс $r^+L_{r^+}$ диссоциирует на r^+ и L_{r^+} , уравнения (5), (18), (19). Эффект ингибиторов инициации трансляции рассчитывали при концентрации $L_{r^+} = 100$ мсМ или 6×10^7 молекул в клетке. Концентрацию РНК ВГС при действии ингибитора инициации трансляции выражали как $(r^+ + L_{r^+} r^+)$.

Минимальное время, необходимое для необратимого подавления репликации РНК ВГС

в клетке в присутствии ингибиторов NS3/NS4A протеазы, NS5B полимеразы и инициации трансляции, рассчитывали при концентрации ингибиторов 100 мсМ.

Мы предполагали, что приток ингибиторов в клетку постоянен и начинается после выхода концентрации РНК ВГС на стационарный уровень (20 дней после трансфекции), нуклеозидтрифосфаты, аминокислоты, АТФ имеются в клетке в достаточном количестве. Математическая модель действия потенциальных анти-ВГС препаратов на репликацию субгеномного репликаона ВГС включает 19 дифференциальных уравнений:

$$\frac{dZ}{dt} = k_1 \cdot r^+ - k_2 \cdot Z - \mu_Z \cdot Z - k_6 \cdot L_z \cdot Z + k_7 \cdot ZL_z \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \frac{dM^*}{dt} = & k_2 \cdot Z - k_5 \cdot M^* - k_3 \cdot M^* \cdot F + k_4 \cdot M - \\ & - \mu_M \cdot M^* - k_{10} \cdot L_M \cdot M^* + k_{11} \cdot M^* L_M \end{aligned} \quad (2)$$

$$\frac{dM^\wedge}{dt} = k_5 \cdot M^* - \mu_M \cdot M^\wedge - k_{10} \cdot L_M \cdot M^\wedge + k_{11} \cdot M^\wedge L_M \quad (3)$$

$$\begin{aligned} \frac{dM}{dt} = & k_3 \cdot M^* \cdot F - k_4 \cdot M - k_i^+ \cdot M \cdot R^+ - k_i^- \cdot M \cdot R^- + k_e \cdot M^+ + \\ & + k_e \cdot M^- - \mu_M \cdot M - k_{10} \cdot L_M \cdot M + k_{11} \cdot ML_M \end{aligned} \quad (4)$$

$$\frac{dr^+}{dt} = k_e \cdot M^- - \mu_r \cdot r^+ - k_{12} \cdot L_{r^+} \cdot r^+ + k_{13} \cdot r^+ L_{r^+} \quad (5)$$

$$\frac{dM^+}{dt} = k_i^+ \cdot M \cdot R^+ - k_e \cdot M^+ - \mu_M \cdot M^+ \quad (6)$$

$$\frac{dr^-}{dt} = k_e \cdot M^+ - \mu_r \cdot r^- \quad (7)$$

$$\frac{dM^-}{dt} = k_i^- \cdot M \cdot R^- - k_e \cdot M^- - \mu_M \cdot M^- \quad (8)$$

$$\begin{aligned} \frac{dF}{dt} = & k_{in} - k_{out} \cdot F - k_3 \cdot F \cdot (M^* + M^* L_M) + \\ & + k_4 \cdot (M + ML_M) - k_8 \cdot L_F \cdot F + k_9 \cdot FL_F \end{aligned} \quad (9)$$

$$\frac{dL_z}{dt} = k_{L_z in} - k_{L_z out} \cdot L_z - k_6 \cdot L_z \cdot Z + k_7 \cdot ZL_z \quad (10)$$

$$\frac{dZL_z}{dt} = k_6 \cdot L_z \cdot Z - k_7 \cdot ZL_z - \mu_{ZL_z} \cdot ZL_z \quad (11)$$

$$\frac{dL_F}{dt} = k_{L_F in} - k_{L_F out} \cdot L_F - k_8 \cdot L_F \cdot F + k_9 \cdot FL_F \quad (12)$$

$$\frac{dFL_F}{dt} = k_8 \cdot L_F \cdot F - k_9 \cdot FL_F - \mu_{FL_F} \cdot FL_F \quad (13)$$

$$\frac{dL_M}{dt} = k_{L_{M_{in}}} - k_{L_{M_{out}}} \cdot L_M - k_{10} \cdot L_M \cdot (M + M^* + M^\wedge) + k_{11} \cdot (ML_M + M^*L_M + M^\wedge L_M) \quad (14)$$

$$\frac{dM^*L_M}{dt} = k_{10} \cdot L_M \cdot M^* - k_{11} \cdot M^*L_M - k_5 \cdot M^*L_M - k_3 \cdot M^*L_M \cdot F + k_4 \cdot ML_M - \mu_{ML_M} \cdot M^*L_M \quad (15)$$

$$\frac{dM^\wedge L_M}{dt} = k_{10} \cdot L_M \cdot M^\wedge - k_{11} \cdot M^\wedge L_M + k_5 \cdot M^*L_M - \mu_{ML_M} \cdot M^\wedge L_M \quad (16)$$

$$\frac{dML_M}{dt} = k_{10} \cdot L_M \cdot M - k_{11} \cdot ML_M + k_3 \cdot M^*L_M \cdot F - k_4 \cdot ML_M - \mu_{ML_M} \cdot ML_M \quad (17)$$

$$\frac{dL_{r^+}}{dt} = k_{L_{r^+_{in}}} - k_{L_{r^+_{out}}} \cdot L_{r^+} - k_{12} \cdot L_{r^+} \cdot r^+ + k_{13} \cdot r^+ L_{r^+} \quad (18)$$

$$\frac{dr^+ L_{r^+}}{dt} = k_{12} \cdot L_{r^+} \cdot r^+ - k_{13} \cdot r^+ L_{r^+} - \mu_r \cdot r^+ L_{r^+} \quad (19)$$

Принятые обозначения концентраций: Z – полипротеин; M – активная репликаза; M^* – неактивная репликаза; M^\wedge – форма неактивной репликасы, не способная переходить в активную репликасу; F – клеточный фактор; r^+ (r^-) – плюс- (минус-) цепь РНК; M^+ (M^-) – супрамолекулярный комплекс плюс- (минус)- цепи РНК со свободным сайтом инициации и активной репликасы; L_Z – ингибитор NS3/NS4A протеазы; ZL_Z – комплекс «полипротеин– Z -ингибитор L_Z »; L_F – ингибитор клеточного фактора F ; FL_F – комплекс «клеточный фактор– F -ингибитор L_F »; L_M – неконкурентный ингибитор NS5B полимеразы; ML_M , M^*L_M и $M^\wedge L_M$ – комплексы ингибитора L_M с формами репликасы M , M^* , M^\wedge соответственно. R^+ или R^- – средняя концентрация плюс- или минус-цепи РНК (r^+ или r^-) со свободным сайтом инициации (см. формулы ниже) в предположении, что активные репликасы (M^+ или M^-) равномерно распределены по всей длине цепи. N – длина РНК ВГС (~ 8,000 нуклеотидов), n – размер сайта связывания активной репликасы с РНК (~ 100 нуклеотидов). R^+ и R^- рассчитывали по формулам:

$$R^+ = (r^+ + r^+ L_{r^+}) \cdot [1 - (n \cdot M^+) / (N \cdot (r^+ + r^+ L_{r^+}))]$$

$$R^- = r^- \cdot [1 - (n \cdot M^-) / (N \cdot r^-)].$$

Константы скоростей процессов приведены в табл. 1 (см. Оценка параметров) и табл. 1–4 (Mishchenko *et al.*, 2007).

Оценка параметров. Верификация параметров проведена так, как описано в работе Е. Мищенко с соавт. (Mishchenko *et al.*, 2007): параметры k_1 , k_2 , k_e , μ_{r^+} , μ_{r^-} , μ_{M^*} , k_6 , k_7 , k_{10} , k_{11} были верифицированы на основе литературных данных вручную; параметры k_3 , k_4 , k_5 , k_i^+ , k_i^- , k_m и k_{out} были подобраны так, чтобы модель соответствовала а) времени выхода вирусных белков и РНК на стационарные концентрации, б) значениям стационарных концентраций белков и РНК, в) кинетике подавления стационарного уровня вирусной РНК в присутствии ингибитора NS3/NS4A протеазы. При введении в модель описания механизма действия ингибиторов инициации трансляции были сделаны следующие оценки параметров: константы скорости k_{12} (образование комплексов $r^+ L_{r^+}$) были приняты равными константе скорости образования комплекса «РНК–аптамер» $5,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Kikuchi *et al.*, 2005). Константы скорости k_{13} (диссоциация комплексов $r^+ L_{r^+}$) были определены из значений K_d (табл. 1).

Результаты

Представленная модель описывает механизмы действия ряда потенциальных противовирусных препаратов, таких, как ингибитор NS3/NS4A протеазы, ингибитор NS5B полимеразы и ингибитор инициации трансляции, что позволяет оценить их влияние на репликацию репликаона ВГС.

Таблица 1

Оценки констант скоростей для ингибитора инициации трансляции и его комплексов с плюс-цепью РНК ВГС в Huh-7 клетке, несущей репликон ВГС

Константа скорости	Процесс	Значение [s ⁻¹]
k_{12}	Образование комплекса r^+L_{r+}	$0,88 \times 10^{-7}$ [молекула ⁻¹]
k_{13}	Диссоциация комплекса r^+L_{r+}	$k_{12} \times K_d^a$
μ_{r+L}	Деградация комплекса r^+L_{r+}	2×10^{-5}
k_{Lr+in}	Приток L_{r+}	$L_{r+} \times k_{Lr+out}^b$
k_{Lr+out}	Деградация L_{r+}	10^{-5}

^a Определено для различных r^+L_{r+} комплексов как $k_{12} \times K_d$; ^b определено как $k_{Lr+out} \times L_{r+} = 100$ мсМ.

Расчет динамик концентраций компонент ВГС в клетке в присутствии ингибиторов инициации трансляции. Динамики концентраций вирусных компонент (РНК, полипротеина, активной репликазы, супрамолекулярных комплексов плюс- и минус-цепей РНК и активной репликазы) в клетке в присутствии ингибиторов инициации трансляции (L_r) рассчитывали при значениях константы диссоциации нетранслируемого комплекса «плюс-цепь РНК–ингибитор», $K_d = 0,074 - 640$ нМ. Расчеты показали (рис. 2, а), что динамика уменьшения стационарной концентрации РНК ВГС (в виде суммарной концент-

рации свободной и связанной с ингибитором плюс-цепи РНК) для высокоаффинных ингибиторов L_r ($K_d = 0,074 - 3$ нМ) была эффективной и практически не зависела от K_d (время уменьшения концентрации РНК на 50%, $t_{1/2} = 16,1 - 16,8$ ч). Динамики изменения стационарной концентрации РНК для ингибиторов L_r меньшей аффинности ($K_d = 7,5 - 120$ нМ) коррелировали с аффинностью L_r к мишени ($t_{1/2} = 17,4 - 43,5$ ч). Низкоаффинный ингибитор L_r ($K_d = 640$ нМ) незначительно влиял на стационарную концентрацию РНК. Экспериментально действие ингибиторов инициации трансляции было изучено на Huh-7

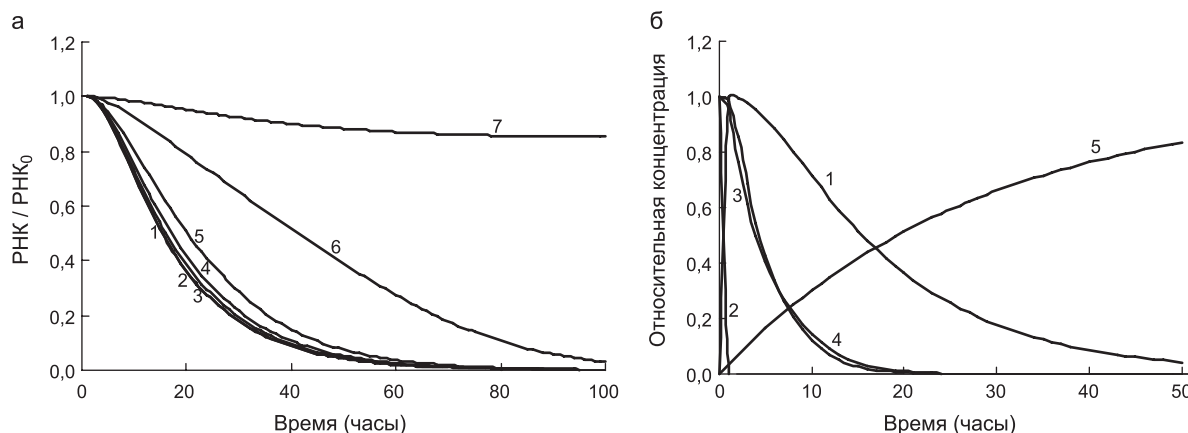


Рис. 2. Рассчитанные кинетики изменения концентраций компонент ВГС в Huh-7 клетке в присутствии ингибиторов инициации трансляции (100 мсМ).

Значения концентраций приведены в относительных единицах (нормализованы к максимальной концентрации). а – кинетики подавления стационарной концентрации РНК репликона ВГС в присутствии ингибиторов: 1 – I ($K_d = 0,074$ нМ); 2 – II ($K_d = 0,24$ нМ); 3 – III ($K_d = 3$ нМ); 4 – IV ($K_d = 7,5$ нМ); 5 – V ($K_d = 21$ нМ); 6 – VI ($K_d = 120$ нМ); 7 – VII ($K_d = 640$ нМ); б – кинетики изменения концентраций компонент ВГС в присутствии высокоаффинного ингибитора инициации трансляции ($K_d = 0,074$ нМ): 1 – образования нетранслируемого комплекса «ингибитор–плюс-цепь РНК (r^+L_r)»; изменения стационарных концентраций: 2 – свободной плюс-цепи РНК (r^+); 3 – активной репликазы (M); 4 – супрамолекулярного комплекса плюс-цепи РНК, имеющей свободный сайт инициации, и активной репликазы (M^+); 5 – кинетика равновесной концентрации ингибитора инициации трансляции ($K_d = 0,074$ нМ) в клетке (в относительных единицах).

клетках, трансфицированных РНК транскриптом, содержащим IRES ВГС и кодирующую последовательность люциферазы *Renilla* (Tallet-Lopez *et al.*, 2003), поэтому мы не могли сравнить расчетные и экспериментальные данные.

Динамики концентраций других важных вирусных компонент (связанной в комплекс с ингибитором плюс-цепи РНК $L_r r^+$, свободной плюс-цепи РНК r^+ , полипротеина Z , активной репликазы M , супрамолекулярных комплексов плюс- и минус-цепей РНК и активной репликазы M^+ и M^-) были рассчитаны для высокоаффинного ингибитора L_r ($K_d = 0,074$ нМ). Расчеты показали (рис. 2, б), что одновременно с образованием нетранслируемого комплекса $L_r r^+$, концентрация которого увеличивалась в течение 1 ч, происходило падение стационарной концентрации r^+ ($t_{1/2} = 0,4$ ч). Изменение стационарных концентраций M и M^+ было более медленным (M , $t_{1/2} = 4,2$ ч; M^+ , $t_{1/2} = 4,6$ ч). Динамика падения стационарной концентрации Z была такой же, как динамика падения r^+ , динамика падения стационарной концентрации M^- была такой же, как динамика падения M^+ .

Расчет минимального времени, необходимого для удаления РНК ВГС из клетки в присутствии ингибиторов, направленных на вирусные мишени, NS3/NS4A протеазу, NS5B полимеразу и IRES область генома. Минимальное время, необходимое для необратимого подавления репликации РНК ВГС в клетке, рассчитывали для ингибиторов разных типов в зависимости от аффинности ингибиторов к мишеням. Расчеты показали (рис. 3), что для высокоаффинных ингибиторов NS3/NS4A протеазы ($K_i = 1$ пМ – 0,63 нМ), NS5B полимеразы ($K_i = 1$ пМ – 31 нМ) и инициации трансляции ($K_i = 1$ пМ – 10 нМ) это время очень мало (около 1 ч) и практически не зависит от K_i . Уменьшение аффинности ингибиторов: NS3/NS4A протеазы ($K_i = 0,63$ нМ – 12 нМ), NS5B полимеразы ($K_i = 31$ нМ – 2,0 мсМ) и инициации трансляции ($K_i = 10$ нМ – 200 нМ) приводило к увеличению этого параметра от 1 ч до 5 дней. Дальнейшее сравнительно небольшое уменьшение аффинности ингибиторов: NS3/NS4A протеазы ($K_i = 12$ нМ – 16 нМ), NS5B полимеразы ($K_i = 2,0$ мсМ – 2,5 мсМ) и инициации трансляции ($K_i = 200$ нМ – 250 нМ) вызывало резкое возрастание минимального времени от 5 дней до бесконечности.

Обсуждение

Препятствием для получения эффективных анти-ВГС препаратов является высокая гетерогенность и мутационная скорость ВГС. Мутации в связывающих центрах вирусных ферментов NS3/NS4A протеазы и NS5B полимеразы способны значительно уменьшать аффинность ингибиторов к этим мишеням, приводя к устойчивости ВГС к потенциальным противовирусным препаратам (Lu *et al.*, 2004; Kukulj *et al.*, 2005). Устойчивые варианты вируса могут возникать даже в течение 14–25 дней применения препаратов (Trozzi *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004), что соизмеримо с однократным курсом применения одного препарата.

Антисенс-олигомеры к консервативным доменам IRES ВГС способны блокировать IRES-зависимую инициацию трансляции генома ВГС и могут быть перспективными анти-ВГС препаратами, так как вирус не будет проявлять к ним устойчивость (Tallet-Lopez *et al.*, 2003; Kikuchi *et al.*, 2005). При введении описания механизма действия такого типа ингибиторов в математическую модель мы предположили, что при взаимодействии ингибитора с плюс-цепью РНК ВГС образуется нетранслируемый комплекс, который, как и свободная плюс-цепь

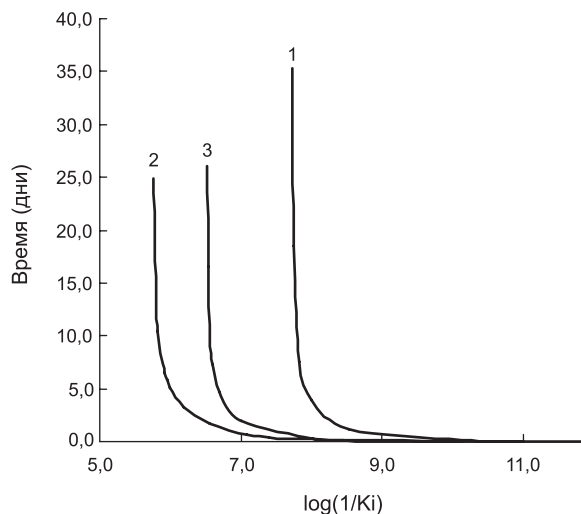


Рис. 3. Зависимость минимального времени, необходимого для необратимого подавления репликации РНК ВГС в клетке, от аффинности ингибиторов (при концентрации 100 мсМ).

1 – NS3/NS4A протеазы; 2 – NS5B полимеразы; 3 – инициации трансляции.

РНК, способен реплицироваться с образованием минус-цепи РНК. Оценки показали, что эффективность подавления стационарного уровня РНК ВГС (в виде суммарной концентрации свободной и связанной в комплексе с ингибитором плюс-цепи) в присутствии ингибиторов определяется аффинностью ингибиторов к мишени (рис. 1, а). К сожалению, экспериментально действие олигонуклеотидов, комплементарных IIIId домену IRES ВГС, было изучено по подавлению экспрессии люциферазы *Renilla* в Huh-7 клетках, трансфицированных РНК транскриптом, содержащим IRES ВГС и кодирующую последовательность люциферазы *Renilla* (Tallet-Lopez *et al.*, 2003), поэтому мы не могли сравнить расчетные и экспериментальные данные.

Расчеты временных изменений вирусных компонент в присутствии ингибиторов важны для получения более полной динамической картины подавления вируса в клетке и выработки оптимального режима применения ингибиторов. Расчеты показали (рис. 2, б), что за 1 час действия высокоаффинного ингибитора инициации трансляции ($K_i = 74$ pM) в концентрации 100 мсМ концентрация свободной мишени падала практически до нуля. Следовательно, после 1 часа действия ингибитора можно уменьшить его концентрацию или даже прекратить его поступление в клетку.

Как известно, токсический эффект противовирусных препаратов на клетку снижается при уменьшении как концентрации, так и времени действия препаратов. С целью более точной оценки времени действия ингибиторов инициации трансляции, необходимого для необратимого подавления репликации репликаона ВГС, была рассчитана зависимость этого параметра от аффинности ингибитора к мишени (рис. 3, график 3). Оценки показали, что время, необходимое для подавления инфекции для ингибиторов с $K_i = 1$ pM – 200 nM, изменяется от 1 ч до 5 дней, а ингибиторы с $K_i \geq 250$ nM не способны излечить клетку (минимальное время лечения клетки бесконечно). Аналогичные расчеты были произведены для ингибиторов, действующих на NS3/NS4A протеазу и NS5B полимеразу. Анализ полученных зависимостей (рис. 3, графики 1–3) показал следующее: низкоаффинные и неспособные подавить вирусную

инфекцию ингибиторы, действующие на IRES ВГС (время подавления инфекции бесконечно), способны подавить эту инфекцию при действии на мишень NS5B (время подавления инфекции – несколько дней); низкоаффинные и неспособные подавить вирусную инфекцию ингибиторы, действующие на NS3/NS4A протеазу, могут быстро подавить инфекцию при действии на мишени IRES ВГС и NS5B полимеразу (время подавления инфекции около 1 часа). Таким образом, оценки показывают, что результативность вирусных мишеней падает в ряду NS5B полимеразы, IRES ВГС, NS3/NS4A протеазы.

Оценивая результативность действия ингибиторов на мишени ВГС, важно учитывать, что NS5B полимеразы вариабельна, а мишень IRES ВГС, напротив, высококонсервативна. Так, структура домена IIIId IRES ВГС абсолютно консервативна среди всех генотипов ВГС (Collier *et al.*, 1998). Поэтому ингибиторы инициации трансляции (например высокоаффинные антисенс-олигомеры к этому домену) могут оказаться наиболее перспективными противовирусными препаратами, так как будут характеризоваться достаточно высокой противовирусной активностью и отсутствием резистентности к ним вируса.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке проекта № 10.7 «Компьютерное моделирование и экспериментальное конструирование генных сетей» по программе РАН «Молекулярная и клеточная биология», НШ-2447.2008.4. Научная школа Н.А. Колчанова «Биоинформатика и системная компьютерная биология».

Литература

- Chou R., Clark E.C., Helfand M. Screening for hepatitis C virus infection: a review of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force // *Ann. Intern. Med.* 2004. V. 140. P. 465–479.
- Collier A., Tang S., Elliott R.M. Translation efficiencies of the 5' untranslated region from representatives of the six major genotypes of hepatitis C virus using a novel bicistronic reporter assay system // *J. Gen. Virol.* 1998. V. 79. P. 2359–2366.
- Dahari H., Ribeiro R.M., Rice C.M., Perelson A.S. Ма-

- thematical modeling of subgenomic hepatitis C viral replication in Huh-7 cells // *J. Virol.* 2007. V. 81. P. 750–760.
- Dudley T., O'Donnell K., Haydon G., Mutimer D. Disappointing results of combination therapy for HCV? // *Gut.* 2006. V. 55. P. 1362–1363.
- El-Gogo S., Staib C., Lasarte J.J. *et al.* Protective vaccination with hepatitis C virus NS3 but not core antigen in a novel mouse challenge model // *J. Gene Med.* 2008. V. 10. P. 177–186.
- Gao L., Aizaki H., He J.W., Lai M.M. Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft // *J. Virol.* 2004. V. 78. P. 3480–3488.
- Hoofnagle J.H. Course and outcome of hepatitis C // *Hepatology.* 2002. V. 36. P. S21–S29.
- Kazantsev F.V., Akberdin I.R., Bezmaternykh K.D. *et al.* MGSmodeller – a computer system for reconstruction, calculation and analysis of mathematical models of molecular genetic system // *Proc. of the 6th Intern. Conf. on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (BGRS'2008).* 2008. P. 113.
- Kikuchi K., Umehara T., Fukuda K. *et al.* A hepatitis C virus (HCV) internal ribosome entry site (IRES) domain III-IV-targeted aptamer inhibits translation by binding to an apical loop of domain IIIId // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. P. 683–692.
- Kukolj G., McGibbon G.A., McKercher G. *et al.* Binding site characterization and resistance to a class of non-nucleoside inhibitors of the hepatitis C virus NS5B polymerase // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 39260–39267.
- Lohmann V., Korner F., Koch J. *et al.* Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line // *Science.* 1999. V. 285. P. 110–113.
- Lu L., Pilot-Matias T.J., Stewart K.D. *et al.* Mutations conferring resistance to a potent hepatitis C virus serine protease inhibitor *in vitro* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004. V. 48. P. 2260–2266.
- Mishchenko E.L., Bezmaternykh K.D., Likhoshvai V.A. *et al.* Mathematical model for suppression of subgenomic hepatitis C virus RNA replication in cell culture // *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2007. V. 5. P. 593–609.
- Pause A., Kukolj G., Bailey M. *et al.* An NS3 serine protease inhibitor abrogates replication of subgenomic hepatitis C virus RNA // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 20374–20380.
- Quinkert D., Bartenschlager R., Lohmann V. Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex // *J. Virol.* 2005. V. 79. P. 13594–13605.
- Randall G., Panis M., Cooper J.D. *et al.* Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 12884–12889.
- Sarnow P. Viral internal ribosome entry site elements: novel ribosome-RNA complexes and roles in viral pathogenesis // *J. Virol.* 2003. V. 77. P. 2801–2806.
- Tallet-Lopez B., Aldaz-Carroll L., Chabas S. *et al.* Antisense oligonucleotides targeted to the domain IIIId of the hepatitis C virus IRES compete with 40S ribosomal subunit binding and prevent *in vitro* translation // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. P. 734–742.
- Tomei L., Altamura S., Bartholomew L. *et al.* Characterization of the inhibition of hepatitis C virus RNA replication by nonnucleosides // *J. Virol.* 2004. V. 78. P. 938–946.
- Trozzi C., Bartholomew L., Ceccacci A. *et al.* *In vitro* selection and characterization of hepatitis C virus serine protease variants resistant to an active-site peptide inhibitor // *J. Virol.* 2003. V. 77. P. 3669–3679.
- Tsantrizos Y.S., Bolger G., Bonneau P. *et al.* Macrocyclic inhibitors of the NS3 protease as potential therapeutic agents of hepatitis C virus infection // *Angew. Chem.* 2003. V. 42. P. 1355–1360.

**MATHEMATICAL MODELING OF EFFECTS OF POTENTIAL ANTIVIRALS
ON SUBGENOMIC HEPATITIS C VIRUS REPLICON REPLICATION
IN A CELL**

**E.L. Mishchenko¹, K.D. Bezmaternykh^{1,2}, V.A. Ivanisenko¹,
V.A. Likhoshvai^{1,2}, N.A. Kolchanov^{1,2}**

¹Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: elmish@bionet.nsc.ru;

²Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Mathematical modeling is an advantageous tool in studies of drug effects on complex systems such as the virus–cells. We have developed the mathematical model that describes the effects of drugs on the hepatitis C virus RNA replicon replication in Huh-7 cells. The dynamics of the viral components (RNA, polyprotein, active replicase, the supramolecular complexes of the plus- and minus-RNA strands and active replicase) in the cell in the presence of potential drugs acting as translation initiation inhibitors was calculated. For inhibitors of different types – NS3/NS4A protease, NS5B polymerase, and translation initiation, the dependencies of the minimal time for HCV replicon clearance from the cell on the affinity of the inhibitor for the target was studied. Comparison of these dependencies has demonstrated that NS5B polymerase is the most efficient target for the effects of these drugs.