

ВИРУС ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ЧЕЛОВЕКА: ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ И ПОИСК ИНГИБИТОРОВ

©2014 г. М. К. КУХАНОВА, А. Н. КОРОВИНА,
С. Н. КОЧЕТКОВ

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
Москва*

I. Введение. II. Вирус простого герпеса первого типа: общая характеристика, жизненный цикл и репликация. III. Ингибиторы репликации вируса герпеса: клинические препараты и лабораторные разработки. IV. Молекулярно-генетический анализ резистентных к клиническим препаратам штаммов ВПГ. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

По данным ВОЗ около 90% жителей Земли инфицированы вирусами герпеса (Herpesviridae) разных типов. Заболевания человека вызывают восемь видов Herpesviridae, из которых наибольшее распространение получил вирус простого герпеса первого типа (ВПГ-1). ВПГ-1 обычно находится в латентном состоянии, а при активации становится причиной таких заболеваний, как оральная и генитальная герпес, конъюнктивит, кератит, опоясывающий лишай, инфекционный мононуклеоз, саркома Капоши. Кроме того, вирус герпеса практически всегда соп-

Принятые сокращения: ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ВПГ-1 – вирус простого герпеса тип 1; ВГЧ-3 – вирус ветряной оспы; ЦМВ – цитомегаловирус человека; ВГЧ-6А, 6В, 7, 8 – вирусы герпеса человека тип 6А, 6В, 7, 8; ND-10 – ядерный домен 10; HCFC1 – клеточный фактор С1; IFI16 – интерферон-индуцибельный транскрипционный активатор; IRF-3 – интерферон-регулирующий фактор 3; DAI – ДНК-зависимый активатор интерферон-регулирующих факторов; LAT – транскрипт, связанный с латентностью; АСВ – ацикловир; GCV – ганцикловир; РСВ – пенцикловир; PFA – фоскарнет; PМЕА – фосфометилэтоксиденин; НрАСВ – Н-фосфонат ацикловира; РР – рибонуклеотидредуктаза; BVDU – бромвинилдезоксисуридин; АгаА – арабинозиладенозин.

Адрес для корреспонденции: kukhan86@hotmail.com, anna.korovina@gmail.com, kochet@eimb.ru

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 12-04-00581 и 13-04-40307-Н и программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

ровождает ВИЧ-инфекцию, что значительно осложняет лечение. По некоторым данным вирус также участвует в развитии рассеянного склероза [1] и может приводить к мужскому бесплодию [2].

Структурной организации, механизмам репликации и стратегии поиска ингибиторов ВПГ-1 и посвящен настоящий обзор.

II. ВИРУС ПРОСТОГО ГЕРПЕСА ПЕРВОГО ТИПА: ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ И РЕПЛИКАЦИЯ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕМЕЙСТВА HERPESVIRIDAE

Вирусы семейства Herpesviridae (более 200 видов) поражают млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий, рыб и двустворчатых моллюсков. Предполагается, что это семейство имеет общего предка с хвостатыми фагами Caudovirales несмотря на серьёзные различия в их морфологии, организмах-носителях и других свойствах [3]. Исторически к семейству Herpesviridae относят вирусы с определённой общей архитектурой вирусной частицы. Обычно вирусная частица состоит из кора, содержащего двухцепочечную ДНК, капсида в форме икосаэдра, состоящего из 162 капсомеров, окружающей его неструктурированной белковой оболочки, называемой тегументом, и внешнего липидного бислоя с экспонированными на нем разветвленными гликопротеинами.

По этим морфологическим признакам к семейству герпесвирусов относят разнообразные вирусы, паразитирующие в различных организмах-хозяевах, от двустворчатых моллюсков до человека.

На сегодняшний день идентифицировано девять типов герпесвирусов, заражающих человека: ВПГ первого и второго типа (типы 1 и 2), вирус ветряной оспы (ВГЧ-3), вирус Эпштейна-Барр (тип 4), цитомегаловирус человека (ЦМВ, тип 5), розеоловирусы (ВГЧ-6А, 6В и 7) и герпесвирус человека 8 типа (ВГЧ-8), ассоциированный с саркомой Капоши. Вирус Эпштейна-Барр и ВГЧ-8 проявляют онкогенные свойства [4, 5].

В конце 70-х годов XX века, основываясь на различиях в биологических свойствах, семейство Herpesviridae разделили на три подсемейства:

1. Альфагерпесвирусы (alphaherpesvirinae). Это подсемейство включает вирусы, которые инфицируют различные типы клеток, имеют относительно короткий жизненный цикл, быстро реплицируются в клеточной культуре, эффективно разрушают инфицированные клетки и обнаруживают латентную форму инфекции преимущественно в

чувствительных ганглиях. К этому подсемейству относят род *Simplexvirus*, который включает ВПГ-1 и 2, *Varicellovirus*, в который входит вирус ветряной оспы (ВГЧ-3), а также некоторые герпесвирусы птиц. ВГЧ-3 может вызывать два заболевания: ветряную оспу (ветрянка) у детей и опоясывающий лишай у взрослых.

2. Бетагерпесвирусы (*betaherpesvirinae*). К этому подсемейству относят вирусы, инфицирующие в основном небольшую группу организмов, с длинным жизненным циклом и медленно развивающейся в культуре клеток инфекцией. Инфицированные клетки разрастаются и увеличиваются в размере (цитомегалия). Латентная форма инфекции развивается в секреторных железах, лимфоретикулярных клетках, почках и других тканях. В это подсемейство входят цитомегаловирус человека (ЦМВ) и розеоловирус (ВГЧ-6), а также другие вирусы, поражающие млекопитающих.

3. Гаммагерпесвирусы (*gammaherpesvirinae*). Включают вирусы ВГЧ-8, ассоциированный с саркомой Капоши, и Эпштейна-Барр, который вызывает лимфому Беркитта (преимущественно у жителей Центральной Африки) и мононуклеоз (у жителей США и других стран) [4].

Вирусы семейства *Herpesviridae* относятся к числу сложно организованных и их геномы кодируют большое количество ферментов метаболизма нуклеиновых кислот (тимидинкиназа, тимидилатсинтаза, дезоксиуридинтрифосфатаза, рибонуклеотидредуктаза), биосинтеза ДНК (ДНК-полимераза, хеликаза, праймаза), а также репарации ДНК (урацил-N-гликозилаза, UL2) и посттрансляционных модификаций (протеинкиназы). Синтез ДНК и сборка вирусного капсида происходят в ядре, а созревание вириона в цитоплазме. Образование нового инфекционного поколения вирусов всегда приводит к разрушению клетки-хозяина.

При латентной инфекции клетки содержат кольцевую форму вирусного генома и только небольшое количество экспрессируемых вирусом РНК. Латентный геном сохраняет способность реплицироваться и вызывать болезнь при рецидивирующей инфекции. Механизм реактивации вируса из латентного состояния не изучен до конца и может отличаться для разных герпесвирусов. Латентное состояние разных герпесвирусов поддерживается разными типами клеток. Например, латентная форма ВПГ-1 обнаружена только в нейронах и ганглиях, иннервирующих подверженные инфекции ВПГ-1 эпителиальные ткани [6], а латентная форма вируса Эпштейна-Барр наблюдалась преимущественно в В-лимфоцитах [7].

СТРУКТУРА ВИРИОНА ВПГ-1

На рис. 1А схематически представлено строение вириона ВПГ-1. Наиболее детальные данные о структуре вириона с разрешением 7 нм были получены с помощью криоэлектронной томографии [9].

Вирион представляет собой сферу диаметром 186 нм, а с учётом гликопротеиновых выступов – 225 нм. Нуклеокапсид расположен не в центре вириона, а в непосредственной близости от внешней оболочки с одной стороны (проксимальный полюс) и на расстоянии 30–35 нм от неё с другой стороны (дистальный полюс). В тегументе были обнаружены структурированные части с 7 нм филаментами, примыкающими к мембране.

В состав вириона входят 40 белков как вирусного, так и клеточного происхождения, десять из которых гликозилированы; одиннадцать белков находятся на поверхности вириона.

Кор содержит двухцепочечный геном в форме тороида. Небольшое количество вирусной ДНК может находиться в кольцевой форме. Полиамины спермин и спермидин клетки-хозяина входят в состав кора и выполняют функцию нейтрализации отрицательного заряда ДНК и обеспечения её правильного фолдинга. В вирионе содержится около 70000 и 40000 молекул спермина и спермидина, соответственно. Полиамины прочно связаны с вирусной ДНК и не обмениваются при добавлении извне радиоактивно меченных полиаминов. Разрушением внешней оболочки детергентами и мочевиной можно удалить из вириона спермидин, но не спермин. В последнее время полиамины, включая и модифицированные полиамины, рассматривают как потенциальные регуляторы и ингибиторы некоторых вирусных инфекций. Показано, что конъюгированные с декстраном полиамины, в частности, декстран-пропан-1,3-диамин, способны подавлять развитие ВПГ-1 в клеточной линии BS-C-1 [10].

В состав тегумента входят около 26 белков, причем некоторые из них участвуют в транспорте капсида к ядру клетки и другим органеллам (UL36, UL37, ICP0) [11], проникновении вирусной ДНК в ядро (VP1-2, UL36) [12], активации транскрипции ранних вирусных генов (VP16, кодируемый геном UL48) [13], подавлении клеточного белкового синтеза и деградации мРНК (VHS, UL41) [14].

Очищенные вирионы содержат клеточные и вирусные транскрипты, которые предположительно находятся в тегументе (поскольку именно там имеются три РНК-связывающих белка – US11, UL47 и UL49).

Капсид имеет форму икосаэдра и состоит из 162 элементов – капсомеров (рис. 1А), 150 из которых имеют формы шестиугольника – гексамеры, и 12 – пятиугольника, пентамеры.

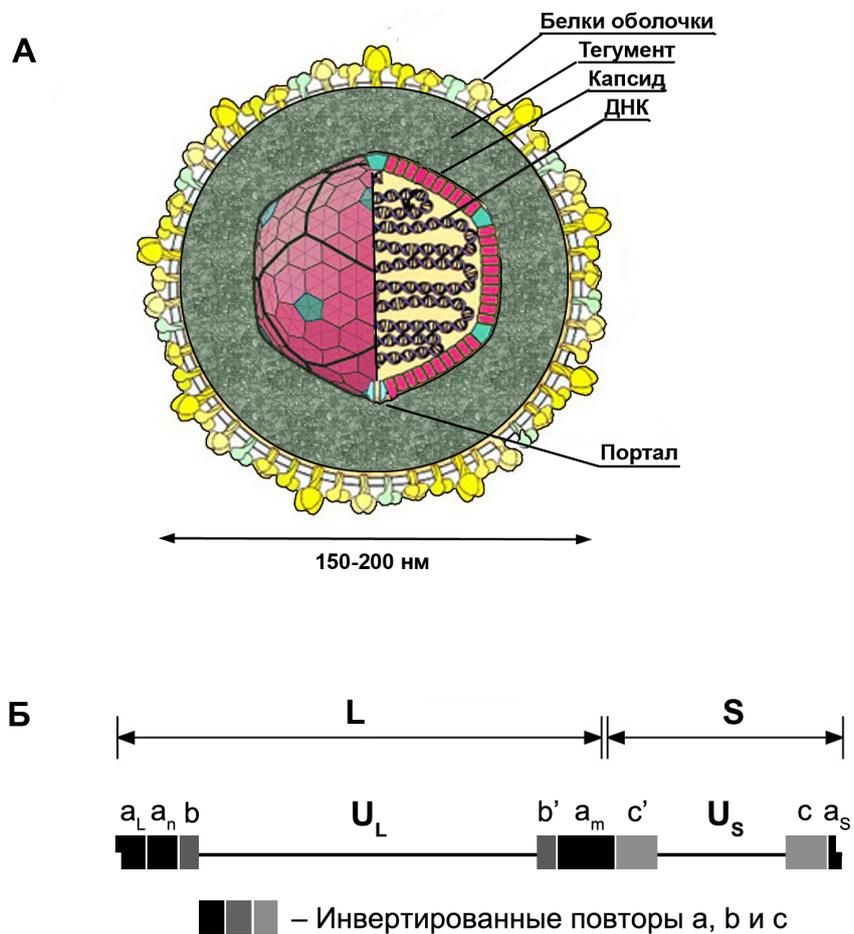


Рис. 1. А – Строение вириона ВПГ-1. Б - Структура генома ВПГ-1.

Инвертированные повторы **ab** и **a'b'** окружают длинную часть генома (L), повторы **ac** и **a'c'** – короткую часть генома (S). Число повторов последовательности **a** на стыке U_L и U_S и на L-конце может варьировать. Концевые последовательности a_L и a_S уникальны и асимметричны, a_n и a_m – повторы последовательности **a** с $n \geq 0$ и $m \geq 1$. Последовательность **a** (400–500 п.о.) высококонсервативна и состоит из частично повторяющихся фрагментов, число которых может варьировать. Концевой a_L участок укорочен и содержит дополнительный неспаренный нуклеотид на 5'-конце, концевая последовательность a_S содержит неспаренный нуклеотид на 3'-конце. Участки a_L и a_S объединяются при переходе генома в кольцевую форму. Рисунок составлен на основании данных работы [8].

В инфицированной клетке могут присутствовать три формы капсида: А, В и С. В А-капсидах, которые также называют прокапсидами, отсутствует ДНК; В-капсид содержит белковый каркас для ДНК, но не содержит самого генома; С-капсид содержит вирусную ДНК [15, 16].

В состав любого типа капсида ВПГ-1 входят четыре белка: основной белок капсида UL19 (VP5), капсомер-связывающий белок UL35 (VP26), а также белки UL18 (VP23) и UL38 (VP19С), функции которых до конца не определены. Каждый шестигранный капсомер содержит шесть копий белка VP5, пятигранный – пять. По шесть копий белка VP26 находятся на каждом шестигранном капсомере, образованном копиями белка VP5. Две копии белка VP23 и одна копия VP19С образуют псевдотример, каждая субъединица которого взаимодействует с двумя капсомерами, таким образом, связывая их. В центре каждого капсомера располагается канал, соединяющий внешнюю поверхность вириона с ДНК кором. Диаметр канала в гексамерах составляет четыре нанометра, в пентамерах он несколько уже, а в случае В-капсида пентамерный канал полностью закрыт. Капсид содержит также белок UL6, который образует вокруг одной из 12 осей капсида «портал» (рис. 1А), через который предположительно упаковывается вирусный геном [17], и протеазу VP24 (UL26), разрушающую каркас в процессе упаковки.

Внешняя оболочка вириона состоит из липидного бислоя и приблизительно 11 экспонированных гликопротеинов (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK), и двух погружённых гликопротеинов gL и gM (рис. 1А) [18]. Внешняя оболочка содержит также как минимум два негликозилированных мембранных белка (UL20, US9). Оболочка формируется из плазматической клеточной мембраны при выходе вириона посредством экзоцитоза. В настоящий момент активно исследуется роль гликопротеинов вирусной оболочки в проникновении вируса в клетку.

СТРУКТУРА ГЕНОМА ВПГ-1

Большая часть генома ВПГ-1 (номер в базе GeneBank X14112) (рис. 1Б) представляет собой линейную двухцепочечную GC-богатую ДНК длиной 152261 п.о. (G+C – 68%) [19]. Концы генома, вероятно, соединены или расположены близко друг от друга, поскольку небольшая фракция упакованной ДНК – кольцевая или приобретает кольцевую форму в отсутствие белкового синтеза после проникновения в ядро инфицированной клетки.

Геном ВПГ-1 состоит из двух больших уникальных последовательностей, длинной (long, U_L) и короткой (short, U_S), разделённых

инвертированными повторами. Повторы, которые окружают длинную часть генома, называют **ab** и **a'b'**, а те, которые окружают короткую, – **ac** и **a'c'** (рис. 1Б).

Благодаря наличию инвертированных повторов L и S элементы генома могут быть по разному ориентированы друг относительно друга. Таким образом, геном ВПГ-1 состоит из 4-х линейных изомеров. Однако показано, что ни наличие, ни отсутствие инвертированных повторов, ни ориентация UL и US элементов генома не влияют на жизнеспособность вируса в культуре клеток *Vero* [20].

Геном ВПГ-1 кодирует около 90 транскрипционных единиц и, как минимум, 84 из них кодируют белки. За редким исключением один транскрипт кодирует один белок и не содержит интронов. Некоторые транскрипты не кодируют белки, из них наиболее изучены транскрипты, связанные с латентностью вируса (LAT) [21] и закодированные в участке *oriS* регуляторные микроРНК [22].

На разных этапах инфекции ВПГ-1 экспрессирует различные гены, которые последовательно регулируют экспрессию друг друга. По этому признаку их подразделяют на три основных класса: α – очень ранние, β – ранние и γ – поздние гены [23]. Очень ранние гены α локализованы на краях L и S компонент генома. Гены $\alpha 0$ и $\alpha 4$ расположены в инвертированных повторах L и S компонент, соответственно [24].

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ, ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ И РЕПЛИКАЦИЯ ВПГ-1

Жизненный цикл вируса можно разделить на несколько основных этапов: проникновение в клетку, экспрессия вирусных генов, репликация, сборка вириона и высвобождение нового поколения вирусных частиц (рис. 2А). В чувствительных к вирусу клеточных линиях этот цикл проходит за 18–20 часов.

В настоящее время предложено два механизма проникновения ВПГ-1 в клетку-реципиент (рис. 2А). Основным механизмом предполагается слияние вирусной оболочки с плазматической мембраной и дальнейший транспорт вирусного капсида в ядро. Ключевой стадией этого процесса является взаимодействие гликопротеинов на поверхности вирусной частицы со специфическими рецепторами на поверхности клетки. Вспомогательный путь проникновения вируса в клетку основан на эндоцитозе покрытого оболочкой вириона и последующим слиянием оболочки с внутриклеточными пузырьками (везикулами) [25].

Связывание вирусной частицы с поверхностью клетки происходит за счёт образования комплексов вирусных гликопротеинов gC и gB с

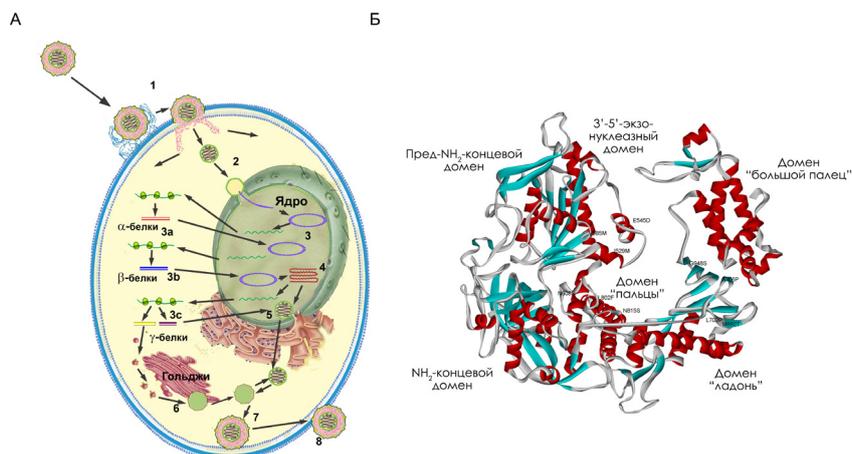


Рис. 2. А – Жизненный цикл ВПГ-1.

1 – связывание и проникновение в клетку; 2 – транспорт в ядро; 3 – экспрессия вирусных генов: очень ранних (а), ранних (б) и поздних (с); 4 – репликация вирусной ДНК; 5 – сборка нуклеокапсида; 6 – формирование оболочки; 7 – сборка вирусной частицы; 8 – почкование вируса.

Б – Пространственная структура ДНК-полимеразы ВПГ-1.

Рисунок составлен на основании данных работы [53] с помощью программы PDB Viewer.e

гликозаминогликанами клеточной поверхности, а именно с гепарансульфатом [26].

Для проникновения вируса в клетку-хозяина путём слияния внешней оболочки вируса и плазматической мембраны необходимо взаимодействие четырёх гликопротеинов: gD, gV и гетеродимера gH/gL [27, 28]. Гликопротеин gD может связываться с тремя видами рецепторов: нектинами 1 и 2, медиатором проникновения вируса герпеса (HVEM), и 3-О-сульфатированным гепарансульфатом (3-OS-HS), модификацию которого осуществляют 3-О-сульфотрансферазы 2–7 (3-OST) [25], что делает их привлекательными терапевтическими мишенями для создания антигерпетических препаратов [29].

Кроме связывания gD с клеточными рецепторами, он запускает процесс слияния мембран путем передачи сигнала на комплекс gV и gH/gL. Окончательный механизм и все действующие лица этого процесса не установлены, однако, известно, что N-концевой участок gD взаимодействует с клеточными рецепторами, в результате чего высвобождается C-концевой домен, связывающийся и активирующий запуск слияния мембран комплексом gV и gH/gL. В несвязанном с

лигандом состояния С-концевой домен gD заблокирован [27]. Интересной дополнительной функцией gD является его способность подавлять апоптоз инфицированной клетки [30]. Для проникновения вируса в клетку необходимо также взаимодействие gB с парным Ig-подобным рецептором типа 2 α (PILR α). Добавление антител к этим рецепторам подавляет инфекцию в культуре клеток [31].

После проникновения в цитоплазму вирусной частицы, представляющей собой капсид, покрытый тегументом, она транспортируется к ядерным порам с последующим попаданием в ядро (рис. 2А). ВПГ-1 перемещается по клеткам на относительно большие расстояния, особенно в случае нервных клеток. Методом непрямой иммунофлуоресценции удалось выяснить, что к ядру вирусный капсид транспортируется по сети микротрубочек с участием моторного белка динеина [32]. В бесклеточной системе было показано, что с моторными белками, ассоциированными с микротрубочками (динеин, динактин и кинезины 1 и 2) связываются капсиды, покрытые внутренним тегументом, содержащим белки US3, UL36, UL37, ICP0, UL14, UL16 или UL21. Наиболее вероятными кандидатами на роль связывающего звена между белками-моторами и капсидом являются белки UL36 и UL37. Капсиды, не покрытые тегументом, или покрытые тегументом с другим белковым составом, не связываются с белками-моторами. Предположительно, при слиянии внешней оболочки вириона с клеточной мембраной, белки внешней части тегумента остаются связанными с мембраной. Таким образом, на поверхности капсида экспонируются белки внутреннего тегумента, которые и связываются с белками-моторами [11].

На поверхности ядерной мембраны капсид ассоциирован с комплексом ядерной поры [33]. Ключевым участником этого взаимодействия оказывается белок внутреннего тегумента UL36 (VP1/2), содержащий сигнал ядерной локализации [34], а также нуклеопорины Nup358 и Nup214, непосредственно или опосредованно связывающие капсид. Капсид связывается с комплексом ядерной поры таким образом, что его вершина, содержащая уникальный «портал» для выхода ДНК, располагается непосредственно над ядерной порой. Предполагается, что все эти взаимодействия необходимы для транспорта вирусной ДНК по β -импортиновому пути ядерного транспорта [35].

В ядре происходят транскрипция и репликация вирусного генома (рис. 2А), а также сборка вирусных капсидов следующего поколения. Инфекция сопровождается реорганизацией ядра, выражающейся в его увеличении, разрушении ядрышка [36] и ядерного домена-10 (ND-10) [37], конденсации хроматина и последующей деструкции его и ядерной ламины [38] на поздних стадиях инфекции. Подавляются

и ключевые клеточные процессы – транскрипция [39], сплайсинг клеточной РНК [40], биосинтез белков [41], а также клеточный ответ на инфекцию [42]. Все это способствует повышению эффективности репликации и транскрипции вируса.

Синтез вирусной мРНК осуществляется РНК-полимеразой II клетки-хозяина при участии вирусных факторов на всех стадиях инфекции. Вирусные белки регулируют последовательные транскрипционные каскады (α , β и γ гены, рис. 2А) и ряд посттрансляционных модификаций.

Для транскрипции очень ранних α генов необходимо присутствие белка тегумента VP16 [43]. Все α гены в отличие от прочих вирусных генов содержат несколько копий консенсусной последовательности: 5' – GyATGnTAATGArATTСуTTGnGGG – 3', где у – пиримидиновые основания, г – пуриновые основания, n – любые основания [43]. С этой последовательностью связывается клеточный фактор транскрипции Oct-1, с которым взаимодействует VP16 и вместе с белком HCFC1 формирует комплекс, активирующий транскрипцию α генов.

Любопытной чертой VP16 является регуляция им метилирования и деметилирования гистона H3, который связывается в процессе инфекции с ненуклеосомной вирусной ДНК на промоторах α , β и γ генов. На очень ранних стадиях инфекции VP16 прямо или опосредовано приводит к активации вирусных промоторов α генов и элиминации гистона H3. По-видимому, связывание гистона H3 с промоторами α генов является результатом клеточного ответа на появление в ядре чужеродной ДНК, которую клетка пытается перевести в неактивную форму [44].

К группе очень ранних относят шесть генов: ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47 и US1.5, пять из которых (ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 и US1.5) активируют транскрипцию β генов, по крайней мере в некоторых типах клеток. Очень ранние белки многофункциональны и осуществляют кардинальную перестройку клеточных процессов в интересах вируса. Например, белок ICP0 содержит домен, обладающий E3-убиквитинлигазной активностью в отношении широкого круга субстратов. Путём непосредственного или опосредованного взаимодействия, или фосфорилирования субстрата может запускаться протеасомная деградация некоторого количества белков, в число функций которых входит и клеточная защита, ограничивающая вирусную инфекцию. Так, в первичной культуре фибробластов мишенью убиквитинилирования белком ICP0, приводящего к протеасомной деградации, является локализованный в ядре интерферон-индуцируемый белок 16 (IFI16). Этот ДНК-сенсор

запускает каскад IRF-3 сигнального пути врожденного иммунитета [45]. Кроме того, ICP0, подобно упомянутому выше белку VP16, может регулировать активацию и конденсацию вирусного хроматина [46].

Однако в противостоянии вирус - клетка последняя также имеет некоторые инструменты подавления инфекции. Так, ДНК-зависимый активатор интерферон регулирующих факторов (DAI), – цитозольный ДНК-сенсор, дополняющий находящиеся на плазматической мембране Toll-подобный рецептор 9, узнаёт ДНК патогена [47] и ингибирует раннюю экспрессию генов ВПГ-1 посредством подавления активации промотора гена ICP0 [48]. Белок ICP22 выполняет роль репрессора ряда клеточных и вирусных промоторов. С помощью иммунопреципитации было показано, что он, также как и вирусный трансаактиватор транскрипции VP16, образует комплекс с фактором элонгации транскрипции ν (P-TEFb) и блокирует его связывание с вирусными промоторами [49].

Основной же функцией кодируемых α генами белков является активация экспрессии β транскриптов. Белки и ферменты, кодируемые β генами, участвуют в репликации вирусного генома (например, ДНК-полимераза ВПГ, UL30), регуляции метаболизма нуклеотидов (например, тимидинкиназа UL23), подавлении экспрессии ранних α генов и активации поздних γ генов. Регуляция экспрессии β генов, также как и γ генов, более разнообразна, поэтому время начала, продолжительность и уровни экспрессии этих генов в отличие от α не совпадают.

Уровень экспрессии основного белка репликации ВПГ, ДНК-полимеразы, понижен по сравнению с другими β генами, например, тимидинкиназой, что является результатом неэффективной инициации его трансляции. Транскрипт этого гена содержит выше и ниже (+55) сайта инициации трансляции последовательности, образующие шпильки, препятствующие связыванию клеточных факторов инициации трансляции. Уровень экспрессии ДНК-полимеразы достигает максимума только через четыре часа после инфекции [50].

Вирусная ДНК реплицируется сначала по Θ -механизму, потом по механизму катящегося кольца [51] с образованием конкатемеров, которые разрезаются позже в процессе сборки нуклеокапсида.

На первом этапе репликации вируса белок UL9 и/или белок ICP8 (UL29) разрушают двойную спираль в АТ-богатом участке одного из сайтов инициации репликации - *oriS* или *oriL*. Последние находятся в S и L участках вирусной ДНК, в двух и в одной копии, соответственно. Белок ICP8 связывается с одноцепочечными фрагментами ДНК, а специфичная хеликаза UL9 расплетает участок *ori*. Затем следует

сборка хеликазно-праймазного комплекса, состоящего из белков UL5, UL8 и UL52, расплетающего ДНК и синтезирующего праймер. Этот комплекс способен расплести ДНК-дуплекс только при наличии одноцепочечного участка длиной в шесть неспаренных нуклеотидов. Эту функцию может выполнять и клеточная праймаза ДНК-полимеразы α .

Синтез лидирующей и отстающей цепи осуществляет вирусная ДНК-полимераза (UL30) в комплексе с фактором процессивности (UL42). Белок UL42 – нетипичный фактор процессивности. В отличие от широко известного ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA), он взаимодействует с ДНК в виде мономера и, таким образом, не образует кольцевую (тороидальную) структуру [52].

Кроме семи белков репликационной вилки в репликации участвуют также несколько клеточных белков: ДНК-лигаза, топоизомераза II, различные компоненты систем репарации и рекомбинации [54]. Показано, что в сайтах репликации необходимо присутствие шаперона Hsp90. Его ингибирование приводит к замедлению синтеза вирусной ДНК и неправильной локализации ДНК-полимеразы ВПГ в цитоплазме и её протеасомной деградации [55].

Несколько вирусных белков участвуют в метаболизме нуклеотидов, например вирусная тимидинкиназа (UL23), рибонуклеотидредуктаза (UL39, UL40), дезоксиуридинтрифосфатпирофосфатаза (UL50), урацил-ДНК-гликозилаза (UL2), щелочная нуклеаза (UL12). Функционирование этих ферментов существенно для синтеза и репарации вирусной ДНК, поскольку синтез их клеточных аналогов в инфицированных клетках подавлен.

С инициацией репликации вирусной ДНК повышаются уровни транскрипции поздних γ генов, кодирующих белки, участвующие в сборке вирионов следующего поколения вируса, в первую очередь белки капсида. Сборка капсидов и упаковка вирусного генома происходит в ядре (рис. 2А), после чего нуклеокапсид выходит из ядра через пору или путём отпочковывания от ядерной мембраны. При участии белков UL36 и UL37 капсид транспортируется из ядра в цитоплазму [56], где происходит созревание вириона и формирование внешней оболочки вирусной частицы. Окончательно внешняя оболочка вириона формируется при выходе вирусной частицы из клетки путём экзоцитоза (рис. 2А). Также как и во время проникновения вируса в клетку выход вируса осуществляется с участием микротрубочек и комплекса вирусного белка UL37 с молекулярным мотором – белком дистонином. С помощью видеомикроскопии живых инфицированных клеток установлено, что недостаток дистонина сильно подавляет

движение вирусного капсида в цитоплазме во время высвобождения вируса [57].

Кроме инфекционных вирионов в инфицированной клетке образуются неинфекционные «лёгкие» L-частицы, представляющие собой тегумент и вирусную оболочку без капсида и вирусного генома. Предположительно L-частицы облегчают протекание инфекции за счёт дополнительной доставки в инфицированную клетку белков тегумента. В образовании внешней оболочки вирусных и L-частиц вероятно принимает участие белок клатрин, образующий жёсткие сети, которые иногда связаны с сайтами сборки вирусных и L-частиц [58].

Как показали эксперименты с малыми интерферирующими РНК, на жизнеспособность и развитие ВПГ-1 оказывают влияние не менее 15 клеточных белков, участвующих во внутриклеточном транспорте (ARF1, HSPA8, RAB2A, RAB5A, RAB6A, RAB10, RAB11A), экспрессии генов (DDX3X, HSPA8, EIF4H), передаче сигнала (CD59, MIF, YWHAZ, YWHAZ), апоптозе (MIF, YWHAZ) и формировании цитоскелета (KRT10). Включение большинства этих белков в зрелые вирионы представляется необходимым условием для оптимального протекания следующего раунда вирусной инфекции, а подавление их экспрессии приводит к подавлению репликации вируса в клеточной культуре без сколько-нибудь существенного влияния на жизнеспособность самих клеток [59]. Еще один клеточный белок – GTPаза Rab27a – колокализуется с вирусными гликопротеинами gD и gH в аппарате Гольджи и, возможно, участвует в высвобождении вируса из олигодендритных клеток. В клетках, не экспрессирующих этот ген, наблюдается понижение вирусного титра [1].

Интересной и вместе с тем весьма неприятной чертой ВПГ-1 является его способность находиться в латентном состоянии. После первичного инфицирования вирус либо реализует литическую инфекцию в эпителиальных клетках, либо проникает в аксон нервной клетки и с помощью ретроградного транспорта попадает в ядро нейрона. Там вирусная ДНК сохраняется в кольцевой форме без существенной экспрессии литических генов, однако экспрессируется ассоциированный с латентностью транскрипт LAT, который подвергается сплайсингу с образованием нескольких РНК-продуктов. Показано, что как транскрипционноактивные, так и молчащие участки вирусной ДНК в латентном состоянии ассоциированы с нуклеосомоподобными структурами, сходными с хроматином эукариотических клеток [60]. Данные, описывающие функции LAT довольно противоречивы, однако, предположительно основной из них является образование miRNA и

siRNA, подавляющих экспрессию ICPO и других литических генов. Латентность, реактивация и рецидивизирующая герпесная инфекция изучена на животных моделях кролика и мыши [6].

ДНК-ПОЛИМЕРАЗА ВПГ-1

ДНК-полимераза ВПГ-1 – центральный фермент вирусного репликационного комплекса, принадлежит к В-семейству полимераз, в которое входят также ДНК-полимеразы человека α , δ и ϵ . Молекулярная масса ДНК-полимеразы ВПГ-1 составляет 136 кДа, что как минимум на 300 аминокислотных остатков больше, чем у других полимераз этого семейства. Степень гомологии с последними составляет 16–50%.

ДНК-полимераза образует комплекс с вспомогательным ДНК-связывающим белком UL42 ($M_r = 65$ кДа), который взаимодействует с С-концевым участком фермента и выполняет функцию фактора процессивности [61, 62]. С-Концевой участок полимеразы, связывающийся с UL42, содержит сигнал ядерной локализации RRMLHR (аминокислотные остатки 1224–1229) [63]. Сам холофермент кроме полимеразной обладает 3'-5'-эксонуклеазной [64] и предположительно 5'-3' экзонуклеазной активностями, а также активностью РНКазы Н [65], необходимой для удаления РНК-праймеров во время синтеза фрагментов Оказаки. Неожиданной чертой герпесной ДНК-полимеразы является АР-лиазная активность I и II типов, свойственная репаративным полимеразам [66]. Эта активность совместно с вирусной урацил-ДНК-гликозилазой выполняет репаративную функцию, аналогичную клеточной системе репарации BER. Результатом этого взаимодействия является задержка полимеразной реакции на остатке U в матричной ДНК из-за образования на его месте АР-сайта [67].

Полимераза ВПГ-1 состоит из 6 доменов. Кроме типичных для полимераз доменов «ладони», «пальцев» и «большого пальца» в её состав входят дополнительные пред-NH₂, NH₂- и 3'-5'-эксонуклеазный домены [53] (рис. 2Б).

Эксонуклеазный домен полимеразы содержит консервативные для семейства α -полимераз участки *exo I*, *exo II* (консервативный участок IV) и *exo III* (δ -С участок). Консервативные участки III и VI находятся в домене «пальцы»; I, II и VI – в домене «ладонь»; а V – в домене «большой палец». В домене «ладонь» находятся аминокислотные остатки D717, F718 и D888, необходимые для каталитической активности фермента и координирующие ионы магния в активном центре. Остаток Y722, взаимодействует с рибозным кольцом входящего в активный центр дезоксинуклеозидтрифосфата и создаёт стерические препятствия для включения в растущую цепь рибонуклеотидов. Боковая цепь N815 участвует в стэкинге с основанием

нуклеотида и стабилизирует его. Остатки R785, R789 и K811 домена «пальцы» взаимодействуют с фосфатными группами нуклеотида и важны для их правильного расположения относительно 3'-конца праймера Консервативный мотив KKKY, а также остатки Y818, Y884 и D886 участвуют в распознавании ошибочного спаривания во вновь образованном дуплексе [53].

Недавно установлено, что пре-NH2-домен, а точнее расположенный в нём консервативный для всех герпесвирусов человека мотив FYNPYL (аминокислотные остатки 44–49), важен для эффективной репликации ВПГ-1. Эффективность одного цикла репликации вирусов, несущих делецию 52 и 141 аминокислотных остатков на N-конце фермента, понижалась в 5–7 раз или до нуля соответственно. При этом соответствующие мутантные ферменты, с делецией пятидесяти двух N-концевых остатков или заменой мотива FYNPYL на шесть аланинов, сохраняли 3'-5'-полимеразную активность *in vitro*, близкую к таковой фермента дикого типа. Можно предположить, что этот участок фермента взаимодействует с неизвестным пока фактором, привлекающим полимеразу к репликативной вилке. Кандидатами на эту роль являются компонент вирусного хеликазно-праймазного комплекса UL8, белок ICP8, связывающий одноцепочечную ДНК, щелочная нуклеаза UL12, или шаперон Asf1b [68].

III. ИНГИБИТОРЫ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА ГЕРПЕСА: КЛИНИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ И ЛАБОРАТОРНЫЕ РАЗРАБОТКИ

Как было сказано в первой части обзора, герпетическая инфекция человека имеет повсеместное распространение и является одной из центральных проблем, как в России, так и за рубежом [69]. Среди ВИЧ инфицированных пациентов, ко-инфицированных вирусом герпеса, около 6–10% имеют штаммы вируса, резистентные к имеющимся антигерпетическим препаратам.

Большинство современных препаратов для лечения герпетических инфекций основаны на использовании в качестве лекарственных средств модифицированные нуклеозиды или их депо-формы [70]*. Действие препаратов направлено, главным образом, на подавление активности основного фермента репликации вируса – ДНК-полиме-

* Депо-формы (prodrugs) представляют собой соединения, сами по себе не проявляющие антивирусного действия, но которые после проникновения в инфицированную клетку, в результате химических или ферментативных превращений образуют активные ингибиторы вируса.

разы. Следует отметить, что препараты не избавляют пациентов от рецидивирующего характера течения болезни, а результатом их длительного приёма может стать возникновение резистентных штаммов вируса. Эти обстоятельства делают актуальным поиск новых антигерпетических препаратов и их новых мишеней. Ниже приведены данные по применению клинически одобренных антигерпетических препаратов, а также по поиску новых эффективных и малотоксичных веществ, подавляющих репликацию ВПГ-1 человека.

КЛИНИЧЕСКИ ОДОБРЕННЫЕ АНТИГЕРПЕТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

Первый антигерпетический препарат нуклеозидной природы 5-иодо-2'-дезоксифлуридин был создан в конце 60-х годов В. Прусовым [71] и широко использовался в клинической практике для лечения герпесного кератита. Это был первый противовирусный препарат нуклеозидной природы, который лег в основу развития противовирусной терапии. В следующие два десятилетия для терапии были одобрены трифтортимидин, аденинарабинозид и бромвинилдезоксифлуридин, также являющиеся аналогами нуклеозидов. Эти препараты, однако, имели низкую селективность и проявляли довольно высокую токсичность, вследствие чего их использовали только для наружного применения. Второе поколение антигерпетических препаратов было создано на основе ациклических нуклеозидов (ацикловир, валацикловир, ганцикловир, пенцикловир, фамцикловир), подавляющих инфекции, вызываемые HSV-1, HSV-2, VZV и цитомегаловирусом [69, 70]. Структурные формулы этих соединений представлены на рис. 3.

АЦИКЛОВИР И ВАЛАЦИКЛОВИР

Ацикловир (ACV, ранее название – ациклогуанозин, рис. 3а) как антигерпетический препарат впервые был предложен в 1977 г. [72]. С его появлением началась новая эра в развитии антигерпетической химиотерапии. До настоящего времени ацикловир остаётся золотым стандартом при поиске антигерпетических препаратов [73], а автор его разработки, Гертруда Элайн, в 1988 году получила Нобелевскую премию по физиологии и медицине [74].

Ацикловир оказался эффективным и малотоксичным препаратом. Механизм действия ацикловира основан на его фосфорилировании вирусной тимидинкиназой с образованием соответствующего монофосфата (ACVMP). Последующие две стадии фосфорилирования ACVMP катализируют киназы клетки-хозяина с образованием трифосфата (ACVTP), который является субстратом вирусной ДНК-полимеразы, включается в цепь вирусной ДНК и блокирует ее синтез [72].

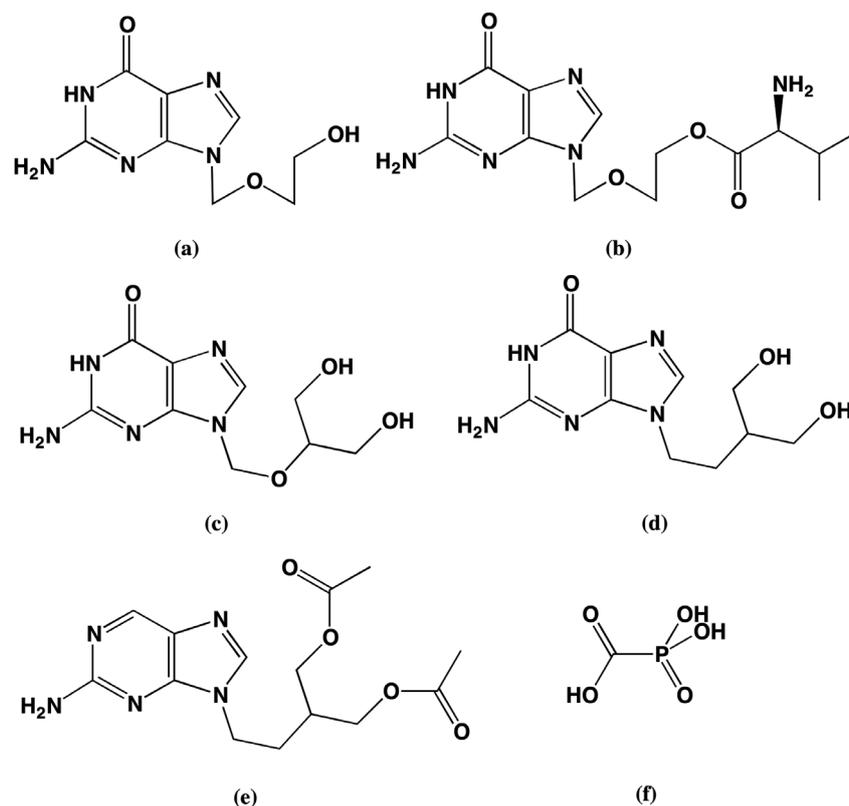


Рис. 3. Структурные формулы антигерпетических препаратов, применяемых в клинике: (а) ацикловир, (b) валацикловир, (c) ганцикловир, (d) пенцикловир, (e) фамцикловир, (f) фоскарнет.

Недостатком ацикловира были низкая оральная биодоступность (10–30%), плохая растворимость и короткое время жизни препарата в кровотоке. В связи с этим, для поддержания необходимой концентрации ацикловира в крови пациентов необходимы были достаточно большие дозы и частое введение препарата, что, в свою очередь увеличивало его токсический эффект. Для улучшения растворимости и повышения биодоступности было синтезировано несколько депо-форм ацикловира, первыми из которых были его глициновый- и L-аланиновый эфиры [70]. Однако при клинических исследованиях препараты проявили достаточно высокую токсичность.

Эффективным и безопасным препаратом оказался L-валиновый эфир ацикловира – валацикловир (рис. 3b). Препарат имел повышенную

оральную биодоступность, являющуюся результатом быстрой кишечной абсорбции, которая регулируется транспортёром пептидов 1 (hPEPT1) с последующим эффективным превращением препарата в ацикловир в результате гидролиза в тонком кишечнике [70].

Ганцикловир

Ганцикловир (GCV) – 9-(1,3-дигидрокси-2-пропоксиметил)гуанин – ациклический аналог гуанозина (рис. 3с), структура которого близка к структуре ацикловира [75]. Препарат оказался активным в отношении ЦМВ, ВПГ-1 и -2, вирусов ветряной оспы и Эпштейна-Барр, однако в клинике нашел применение только для лечения ЦМВ-инфекции. Как и в случае ацикловира, оральная биодоступность ганцикловира низка, и, чтобы преодолеть эту проблему, была синтезирована его депо-форма валганцикловир, валиновый эфир ганцикловира [76].

Пенцикловир и фамцикловир

Пенцикловир (PCV, рис. 3d) представляет собой ациклический аналог гуанозина со структурой, близкой к структурам ацикловира и ганцикловира, но без кислорода в ациклической «сахарной» части и с ОН-группой в позиции, эквивалентной 3'-ОН-группе природного дезоксинуклеозида. Впервые PCV был синтезирован в лабораториях компании Beecham Pharmaceuticals. В экспериментах на клеточных линиях препарат был менее активен против ВПГ-1, чем ацикловир, но эффективно подавлял репликацию ВГЧ-3 у животных и нашел широкое применение при лечении поражений кожи, вызванных вирусом простого герпеса. В отличие от ацикловира, препарат подавлял также развитие штамма ВПГ-1, несущего ген мутантной ДНК-полимеразы [77]. Аналогично ACV, PCV превращается в монофосфат вирусной тимидинкиназой. Первоначальное превращение PCV в PCVMP более эффективно, чем фосфорилирование ACV, однако трифосфат пенцикловира, образующийся в инфицированных клетках, является менее эффективным ингибитором синтеза вирусной ДНК, чем ACVTP. Оральная биодоступность PCV оказалась ниже, чем у ацикловира. Для улучшения свойств препарата была синтезирована его депо-форма – фамцикловир (рис. 3е), являющаяся диацетильным производным пенцикловира. Фамцикловир превращается в пенцикловир *in vivo* под действием эстеразы, катализирующей удаление ацетильных групп, и альдегидоксидазы, окисляющей пуриновое основание. Следует отметить, что в культурах тканей фамцикловир не обладает противовирусной активностью, так как в них не происходит окисления пенцикловира, но при пероральном применении он оказался даже более

эффективным, чем ацикловир в элиминации вируса из поражённых органов. Еще одним важным преимуществом фамцикловира является его способность предотвращать латентную инфекцию ВПГ-1. При лечении фамцикловиrom по сравнению с валацикловиrom в ганглиях мышей обнаруживается значительно меньше латентного вируса [78]. Причины предотвращения рецидивирующей инфекции фамцикловиrom в условиях, когда валацикловир не приводит к таким результатам, остаются пока без объяснения.

Фоскарнет

Фоскарнет (PFA) (рис. 3f) представляет собой аналог пирофосфата и является ненуклеозидным ингибитором ДНК-полимеразы ВПГ. Фоскарнет неконкурентно (по отношению к нуклеотидам) связывается с активным центром фермента и имитирует уходящую пирофосфатную группу, препятствуя связыванию входящего нуклеозидтрифосфата [79]. PFA не нашел широкого применения в клинике вследствие более высокой токсичности по сравнению с ацикловиром и используется только в тех случаях, когда лечение ацикловиром и другими нуклеозидными препаратами невозможно в связи с возникшей к ним резистентностью [80].

Поиск новых антигерпетических препаратов

В литературе описан ряд новых интересных производных нуклеозидов, обладающих антигерпетической активностью в опытах на культурах клеток и лабораторных животных. Они не прошли, однако, клинических испытаний, но могут быть использованы в качестве основы для разработки новых препаратов. Среди таких соединений можно назвать аналоги гуанина: ациклический H2G (рис. 4a), карбоциклические циклобутановый (лобукавир) (рис. 4b) и циклопропановый (A-5021) аналоги (рис. 4c). После клинических испытаний эти соединения не были одобрены как лекарственные препараты из-за повышенной токсичности [81].

Фосфонатные производные нуклеозидов

В настоящее время в клинике используется три фосфонатных производных ациклических нуклеозидов, которые активируются в клетке, минуя стадию первичного фосфорилирования: аналог цитидина сидофовир, применяемый для лечения ЦМВ-инфекции, и аналоги аденина – адефовир и тенофовир, применяемые в терапии гепатита В и ВИЧ, соответственно. Были синтезированы и испытаны как ингибиторы ВПГ-1 ациклические ненасыщенные фосфонатные аналоги,

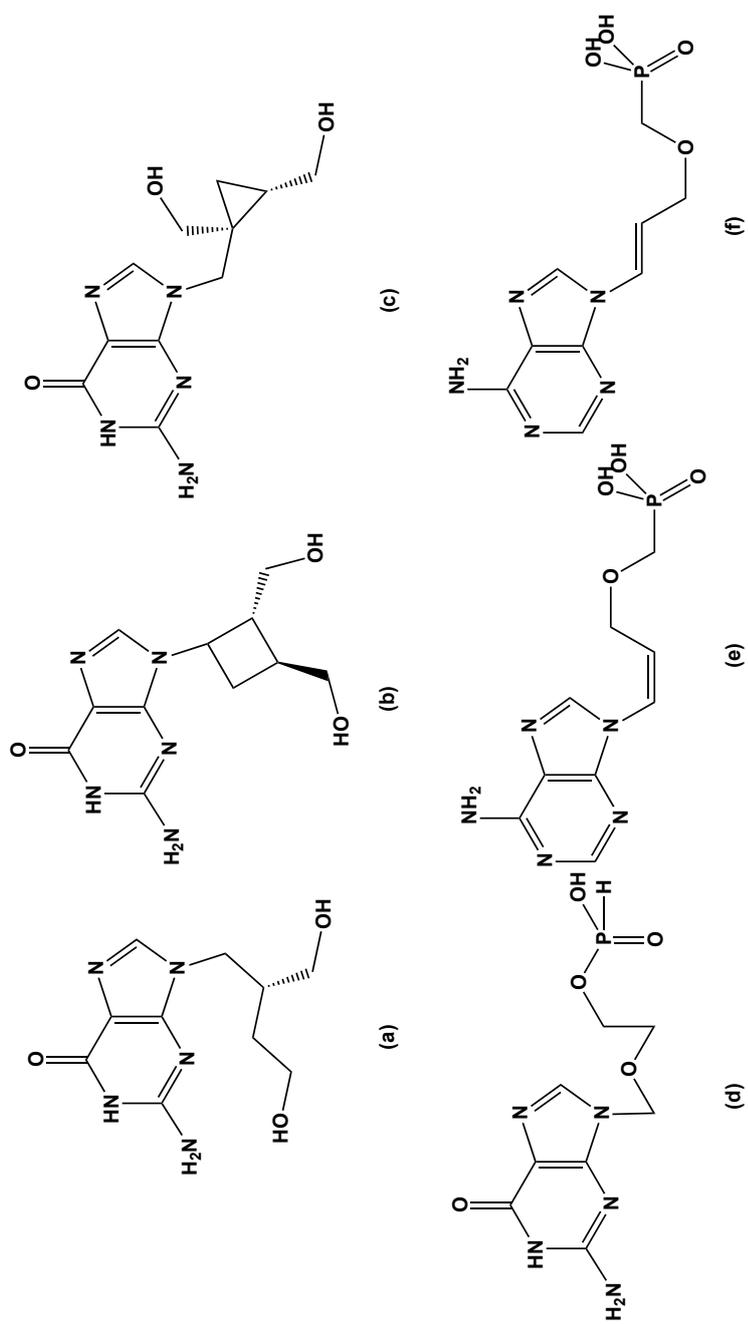


Рис. 4. Структурные формулы антигипертензивных препаратов: (а) H2G, (b) лобукавир, (с) А-5021, (d) HрАСУ, (е) (Z)-9-[3-(фосфонометоксипроп)-1-ен-1-ил] аденин, (f) (E)-9-[3-(фосфонометоксипроп)-1-ен-1-ил] аденин.

(Z)- и (E)-изомеры 9-[3-(фосфонометоксипроп)-1-ен-1-ил] аденина [75] и фосфонатный аналог ацикловира (фосфит ацикловира, НрАСV) (рис. 4d) [82].

Интересным свойством этих соединений была их способность ингибировать как репликацию ВПГ-1, так и вируса иммунодефицита человека в культурах клеток. При этом концентрация Z-изомера (рис. 4e), подавляющая развитие вирусов на 50% (IC_{50}), была существенно ниже, чем E-изомера (рис. 4f). Токсичность обоих соединений была ниже, чем у известного анти-ВИЧ препарата {2-(6-амино-9H-пурин-9-ил)этокси}метил}фосфоновой кислоты (РМЕА). Механизм действия соединений заключается в их фосфорилировании до дифосфатфосфонатов аденина, которые избирательно включаются в цепь вирусной ДНК и терминируют ее синтез. Оба изомера подавляют также резистентные к ацикловиру штаммы ВПГ-1, дефицитные по тимидинкиназе, так как для их активации не требуется первой стадии фосфорилирования. Синтезированные дифосфаты соединений были субстратами как обратной транскриптазы ВИЧ, так и ДНК-полимеразы ВПГ-1, включались в 3'-конец праймер-матричного комплекса и терминировали дальнейшую элонгацию [83]. Обсуждаемые соединения не являлись субстратами клеточной ДНК-полимеразы α , что согласуется с данными их низкой токсичности, полученными в опытах на клеточных культурах. Полученные соединения являются примерами пока еще немногих описанных в литературе препаратов, одновременно подавляющих как ВИЧ, так и ВПГ.

Интересными оказались свойства *H*-фосфоната ацикловира (НрАСV, рис. 4d), который подавлял репликацию ВПГ в культуре клеток и снижал вероятность летального исхода лабораторных животных, инфицированных ВПГ [84]. Было отмечено, что подобно ацикловиру, НрАСV в комбинации с интерфероном α проявляет синергизм их действия [85]. Необычной чертой НрАСV было подавление ацикловир-резистентных штаммов вируса, дефицитных по тимидинкиназе, при этом его концентрация была всего в два раза выше, чем в случае ацикловир-чувствительных штаммов. В аналогичных экспериментах концентрация ацикловира, ингибирующая последние, увеличивалась почти в 500 раз. Появление резистентности к НрАСV штаммов возникает медленнее, чем к АСV и при более высоких концентрациях (100–800 мкг/мл против 2,5–100 мкг/мл, соответственно). Таким образом, можно полагать, что метаболизмы АСV и НрАСV существенно различаются. Действительно, если АСV при попадании в клетку должен фосфорилироваться тимидинкиназой, то при исследовании метаболизма НрАСV на клетках *Vero* было

показано, что после проникновения в клетку он в значительной степени непосредственно превращается в монофосфат ацикловира (АСVMP) и только небольшая его часть гидролизует до АСV [84].

Производные триазолопиримидинов

Производные 1,2,3-триазоло[1.5- α]пиримидина представляют собой основу для синтеза многих физиологически активных соединений.

Соединение (а) на рис. 5 было описано как ингибитор дефицитной по гомологу фосфатазы и тензина (PTEN) раковой клеточной линии [86], а соединение (с) проявляло антигерпетическую активность [87], рибозилированное производное (b) было активно против риновирусов [88]. Были опубликованы данные об антигерпетических свойствах производных триазопиримидинов: ациклические производные 1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин-7-онов изучены как ингибиторы репликации ВПГ-1 в культуре клеток *Vero* [87]. Структурные формулы соединений приведены на рис. 5с-г.

Было показано, что синтезированные соединения проявляют умеренную антигерпетическую активность на культуре клеток, инфицированной ВПГ, а их трифосфаты ингибируют синтез ДНК, катализируемый ДНК полимеразой ВПГ-1. Наиболее сильным ингибитором был трифосфат соединения (е) с R = SMe [87]. Следовательно, одной из мишеней действия соединений может являться герпесвирусная ДНК-полимераза.

Наряду с поисками ингибиторов репликации вируса герпеса, мишенью которых является ДНК-полимераза вируса, проводятся интенсивные исследования возможности использования других вирусных мишеней.

Ингибиторы хеликазы-праймазы

За последние 10 лет было создано несколько новых классов соединений, проявляющих антигерпетическую активность благодаря подавлению комплекса вирусной хеликазы-праймазы (UL5, UL52, UL8). В 2002 г. компания Bayer создала серию производных тиазолмочевины, которые подавляли развитие герпетической инфекции в клеточных и животных моделях с большей эффективностью, чем ацикловир и его производные. Соединение-лидер BAY 57-1293 (N-[5-(аминосульфонил)-4-метил-1,3-тиазол-2-ил]-N-метил-2-[4-(2-пиридинил)фенил]ацетамид) (рис. 6а) было достаточно хорошо растворимо в воде и проявляло ярко выраженные противогерпетические свойства, как на клеточных линиях, так и на животных моделях, при этом вирус не проявлял кросс-резистентности относительно ацикловира.

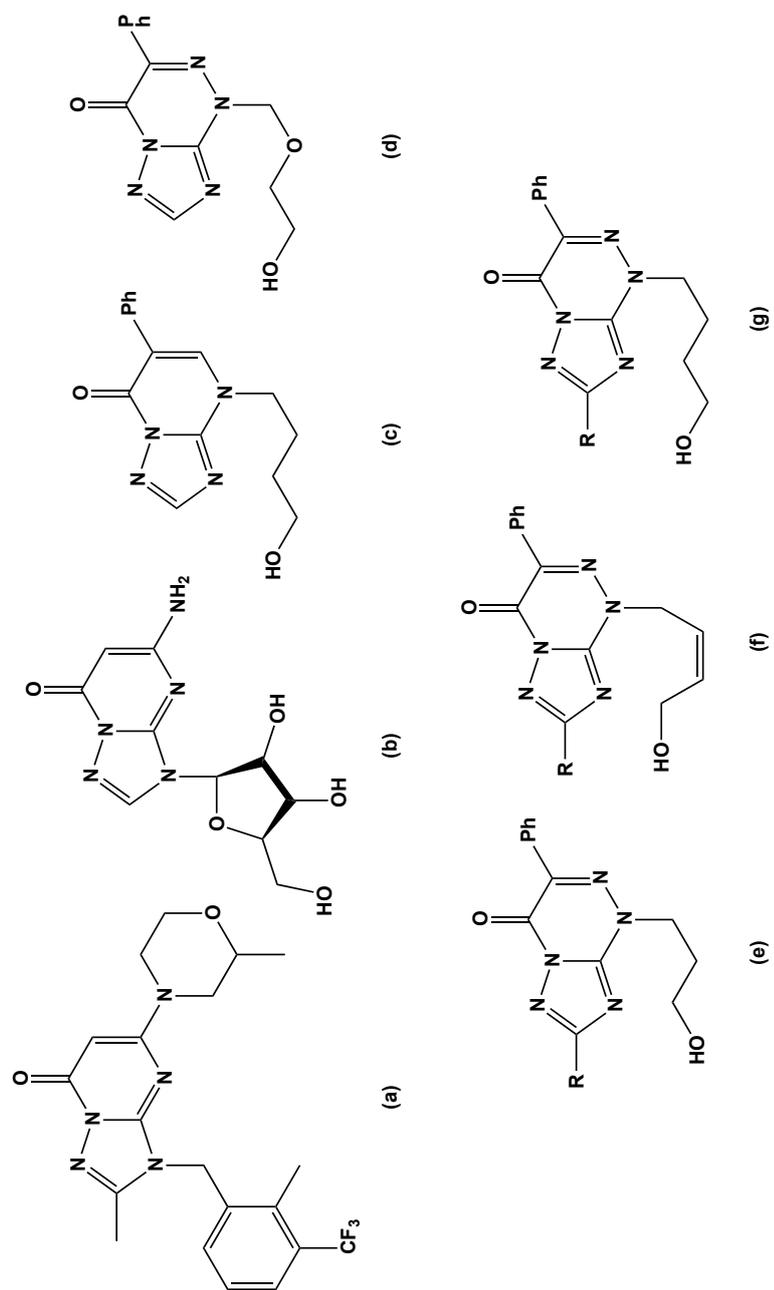


Рис. 5. Структурные формулы производных триазолопиримидинов.

Механизм действия ВАУ 57-1293 заключается в полном блокировании синтеза вирусной ДНК после стадии транскрипции очень ранних генов. Анализ 10 резистентных к соединению штаммов вируса показал, что резистентность возникает в результате мутаций в генах, кодирующих UL5 и/или UL52 – компоненты хеликазно-праймазного комплекса вируса, что было подтверждено ингибированием АТФазной активности комплекса *in vitro*. Следует отметить, что частота возникновения резистентных к этому соединению вирусов, была на порядок меньше по сравнению с возникновением резистентности к ацикловиру.

Единственным недостатком данного соединения было дозозависимое формирование гиперплазии эпителия мочевого пузыря у крыс при пероральном приеме соединения, однако у собак в тех же условиях никаких токсикологически значимых изменений не наблюдалось. (Известно, что первичные сульфонамиды, подавляя дегидратазу, вызывают гиперплазию эпителия мочевого пузыря у грызунов, но не у других животных и человека [89]). Кроме того, ВАУ 57–1293 значительно эффективнее понижало количество эпизодов реактивации вируса (ВПГ-2) из латентного состояния на модели морских свинок, чем валацикловир при терапии на ранней стадии инфекции [90].

Параллельно в компании Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals была создана серия родственных соединений, которые подавляли репликацию ВПГ *in vitro* и *in vivo*.

Соединение BILS 179 BS (рис. 6b) было приблизительно в 10 раз эффективнее АСВ при испытаниях на культуре клеток, а также подавляло развитие герпетической инфекции у животных [91].

Оксадиазолилфенильное производное (ASP2151, рис. 6с), в отличие от описанных выше соединений, активно подавляло как ВПГ-1 и 2, так и ВГЧ-3 [92]. Эффективность ASP2151 значительно превосходила валацикловир и в 2011 г. соединение прошло вторую фазу клинических исследований.

Ингибиторы рибонуклеотидредуктазы

Рибонуклеотидредуктаза (РР) имеет существенное значение для вирусной репликации при герпетических заболеваниях глаз и для реактивации вируса из латентного состояния при кожных вирусных инфекциях. Для подавления герпесной РР сначала был предложен класс тиокарбонгидразонов. Однако оказалось, что они ингибируют не только вирусный, но и клеточный фермент, поэтому могут рассматриваться только с точки зрения местного применения.

Гидроксимочевина, которая также является неселективным ингибитором рибонуклеотидредуктазы, в 3–4 раза усиливала подавление репликации ВПГ на клетках *Vero ACV* и другими нуклеозидными препаратами. Причём эффект проявлялся и на резистентных к *ACV* штаммах с мутациями как в гене ТК, так и ДНК-полимеразы [93].

Соединение BILD 1633 SE (рис. 6е), пептидомиметик С-конца малой субъединицы герпесной рибонуклеотидредуктазы, подавляло вирусную РР в концентрации 3 нМ и было активно как на вирусе дикого типа, так и на резистентных к *ACV* штаммах в концентрации около 0,4 мкМ при подавлении инфекции в бестимусных мышах.

Для соединений BILD 1633 SE и *ACV* отмечен синергизм их действия, поскольку подавление активности вирусной РР приводило к понижению пула dGTP и увеличению соотношения концентрации *ACV* к dGTP в клетке [94].

Ингибиторы процессов адгезии и проникновения вируса в клетки

Известно, что в процессы связывания и проникновения ВПГ в клетку вовлечены гепарансульфат, медиатор проникновения вируса герпеса (HVEM), нектин-1 и 2 на поверхности клетки и вирусные гликопротеины gB, gC, gD, gH и gL (см. часть II). Было многократно показано, что полианионы обладают противовирусными свойствами *in vitro*, поскольку они имитируют цепочки гепарансульфата и конкурентно ингибируют связывание gB и gC с клеткой. Так, в качестве противогерпетических препаратов была предложена смесь высокосульфатированных олигосахаридов маннозы (PI-88), которая, однако, не проявляла вируцидных свойств [95]. Мутационный анализ резистентных вирусов, отобранных под давлением соединения PI-88 показал, что за чувствительность вируса к препарату отвечают гликопротеины gC, gB и gD [95]. Те же авторы [96] создали ряд соединений на основе различных олигосахаридов и PI-88, конъюгированных с гидрофобными агликоновыми группами, одно из которых, холестанилгликозид сульфатированного тетрасахарида [Man α (1→3)-Man α (1→3)-Man α (1→2)-Man] (соединение 14) (рис. 6d). Соединение подавляло не только репликацию вируса в клеточной культуре GMK АН-1 ($IC_{50} = 2,1$ мкг/мл), но и конкурировало с гепарансульфатом за связывание с вирусными гликопротеинами, что препятствовало проникновению вируса в клетку и его дальнейшей передаче от клетки к клетке. Соединение инактивировало также вирусные частицы, что, по-видимому, является результатом дестабилизации вирусной оболочки липофильной холестанильной группой.

Общим недостатком сульфатированных олиго- и полисахаридов является частичное разрушение обычно непроницаемого для патогенов слизистого слоя кишечника [97].

Ретроциклин 2, короткий циклический пептид из группы Θ -дефензинов [98], и лактоферрин [99] также защищают клетки от проникновения ВПГ-1 за счёт связывания с вирусными гликопротеинами. В отличие от олигосахаридов, которые подходят только для местного применения, лактоферрин подавляет развитие кожных симптомов герпетического заболевания у мышей при пероральном приёме [99].

Таким образом, за последнее десятилетие существенно увеличилось количество перспективных вирусных мишеней и классов соединений проявляющих выраженные антигерпетические свойства. Однако новых эффективных и малотоксичных клинических препаратов как против вирусов дикого типа, так и резистентных к герпетическим препаратам штаммов пока не появилось.

IV. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕЗИТЕНТНЫХ К КЛИНИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ ШТАММОВ ВПГ

Как было сказано выше, длительное применение лекарственных препаратов приводит к появлению резистентных штаммов ВПГ, что делает течение болезни неконтролируемым. В 95% случаев устойчивость к АСV обусловлена мутациями в гене тимидинкиназы, осуществляющей, как указывалось выше, первое фосфорилирование АСV, предопределяющее его превращение в АСVTP и включение в вирусную ДНК. Только в 5% случаев обнаружены мутации в гене ДНК-полимеразы, определяющие резистентность вируса к препаратам. Встречаются также вирусы, мутантные по обоим ферментам [100]. Ситуация осложняется ещё и тем, что большинство клинических изолятов оказываются гетерогенными, вызывая одновременную инфекцию несколькими вариантами устойчивых к АСV вариантов вируса.

В генах тимидинкиназы и ДНК-полимеразы клинических изолятов и лабораторных штаммов, резистентных к ацикловиру и другим препаратам выявлено огромное количество мутаций [101], причем некоторые из них приводят к потере активности фермента и, как следствие, к возникновению резистентности (рис. 7).

Мутация R220H в тимидинкиназе приводит к потере чувствительности вируса к АСV, PCV и GCV [102], противовирусная активность которых напрямую связана с функцией фермента. В работе [103]

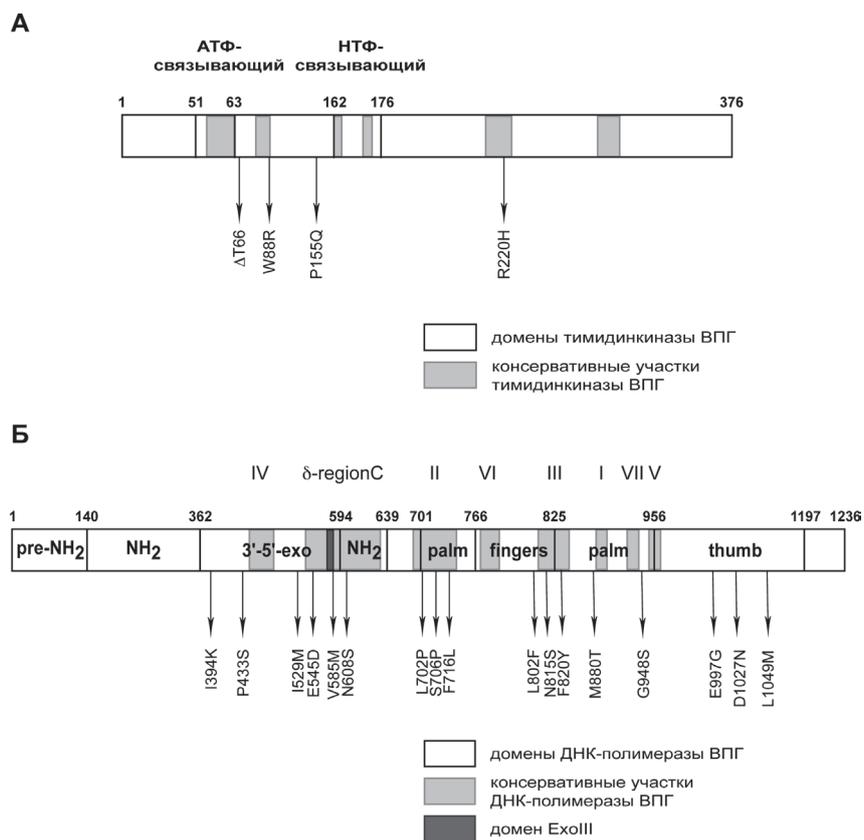


Рис. 7. Расположение аминокислотных замен из разных клинических и лабораторных изолятов относительно консервативных участков и доменов: А – тимидинкиназы, Б – ДНК-полимеразы ВПГ-1 [102, 105].

описана аналогичная мутация R220K в гене тимидинкиназы ВПГ-2, приводящая (совместно с другими заменами) к понижению чувствительности к GCV и BVDU на 1-2 порядка. В тоже время арабинозил-аденозин (AraA), механизм действия которого не зависит от тимидинкиназы, подавляет репликацию этого штамма почти также, как и штамма дикого типа [85]. Эта мутация присутствует также в гене тимидинкиназы лабораторного штамма, резистентного к HрACV, однако она не влияет на чувствительность вируса к последнему, поскольку, как указано выше, механизм его действия не зависит от тимидинкиназы. Мутация G59R в АТФ-связывающем сайте фермента, играет существенную роль в понижении его активности (рис. 7А).

В ДНК полимеразе ВПГ-1 нами было идентифицировано более 20 мутаций [102], некоторые из которых существенны для функционирования фермента (рис. 7Б).

Замены I394K, P433S и V585M находятся в 3'-5'-экзонуклеазном домене фермента, причем мутация V585M располагается в консервативном участке E α III (572-585). В работе [104] показано, что мутации в этом участке влияют на чувствительность вируса к препаратам. Мутация D581A, расположенная в непосредственной близости от V585M, приводит практически к полной потере 3'-5'-экзонуклеазной корректирующей активности фермента при частичном сохранении полимеразной активности [64]. В клинически изолированном изоляте штамме ВПГ-1 нами впервые были обнаружены аминокислотные замены I159M и E545D в 3'-5'-экзонуклеазном домене в ДНК-полимеразы, которые могут влиять на активность фермента [102]. Мутации в экзонуклеазном центре ДНК-полимеразы, как правило, приводят к снижению корректирующей активности, что, в свою очередь, понижает точность синтеза ДНК и, следовательно, повышает скорость возникновения мутаций.

Мутация N608S находится в консервативном δ участке C и приводит к устойчивости лабораторного штамма ВПГ-1 к ACV и H α ACV [105]. Было показано, что замена L702H в консервативном участке II ДНК полимеразы ВПГ-1 вызывает резистентность вируса к ацикловиру и сохранению чувствительности или незначительной резистентности по отношению к пенцикловиру и ганцикловиру. Замена гидрофобного лейцина 702 на пролин может способствовать изменению конформации β -листа в домене ладони, участвующего в координировании ионов магния и трифосфатного участка в активном центре фермента [106]. Аналогичный эффект вызывает мутация F716L, поскольку она располагается рядом с аминокислотным остатком D717, участвующим в координации ионов магния. При заменах гидрофобного валина 715 на более полярный метионин [107] и соседнего гидрофобного фенилаланина 716 на полярный лизин [102] происходит потеря чувствительности вируса к ACV.

Согласно кристаллографическим данным [53] мутация M880T (рис. 2Б, 7Б), расположенная достаточно близко от каталитической триады (D717, D886 и D888) и участка связывания фосфатного остатка нуклеозидтрифосфата и ионов магния, может создать стерические препятствия для связывания остатков фосфата и приводить к понижению чувствительности вируса, как к аналогам нуклеозидов, так и к PFA.

По данным работы [108] замена N815S приводит к устойчивости штамма к ацикловиру и его аналогам. Согласно кристаллографическим данным [53] боковая цепь N815 находится напротив основания нуклеотида, «входящего» в активный центр фермента. Компьютерное моделирование позволяет предположить, что боковая цепь мутантного остатка S815 имеет пространственную ориентацию, отличную от таковой остатка N815 исходного штамма; мутантная по этому остатку полимераза не встраивает АСVMР в растущую цепь ДНК [109].

Таким образом, резистентность как клинических, так и лабораторных штаммов объясняется мутациями как в ДНК-полимеразе, так и тимидинкиназе вируса герпеса, причем замены одного и того же аминокислотного остатка по-разному влияют на чувствительность ферментов к различным антигерпетическим препаратам.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данный обзор не претендует на полное изложение всего огромного материала, полученного при изучении вирусов герпеса, их взаимодействия с клеткой хозяина, а также при поиске антигерпетических препаратов. С момента создания золотого стандарта антигерпетической терапии, ацикловира, появилось много новых эффективных соединений, пришло иное понимание стратегий поиска препаратов, одной из которых является создание депо-форм с пониженной токсичностью, реализовано множество исследований, проливающих свет на детали взаимодействия вируса с клеткой [110]. Основная цель обзора заключалась в том, чтобы показать, что изучение вируса герпеса и поиск ингибиторов его репликации до сих пор остаются актуальной проблемой, требующей и в дальнейшем усилий химиков, биологов, фармацевтов и медиков.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bello-Morales, R., Crespillo, A.J., Fraile-Ramos, A., Tabares, E., Alcina, A., Lopez-Guerrero, J.A. (2012) Role of the small GTPase Rab27a during Herpes simplex virus infection of oligodendrocytic cells, *BMC microbiology*, **12**, 265.
2. Schuppe, H.C., Meinhardt, A., Allam, J.P., Bergmann, M., Weidner, W., Haidl, G. (2008) Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility?, *Andrologia*, **40**, 84–91.
3. Cardone, G., Heymann, J.B., Cheng, N., Trus, B.L., Steven, A.C. (2012) Procapsid assembly, maturation, nuclear exit: dynamic steps in the production of infectious herpesvirions, *Advances in experimental medicine and biology*, **726**, 423–439.
4. Raab-Traub, N. (2012) Novel mechanisms of EBV-induced oncogenesis, *Current opinion in virology*, **2**, 453–458.

5. Mesri, E.A., Cesarman, E., Boshoff, C. (2010) Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus, *Nature reviews Cancer*, **10**, 707–719.
6. Webre, J.M., Hill, J.M., Nolan, N.M., Clement, C., McFerrin, H.E., Bhat-tacharjee, P.S., Hsia, V., Neumann, D.M., Foster, T.P., Lukiw, W.J., Thom-son, H.W. (2012) Rabbit and mouse models of HSV-1 latency, reactivation, and recurrent eye diseases, *Journal of biomedicine & biotechnology*, **2012**, 612316.
7. Grinde, B. (2013) Herpesviruses: latency and reactivation – viral strate-gies and host response, *Journal of oral microbiology*, **5**, 22766 – <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v5i0.22766>.
8. Mocarski, E.S., Roizman, B. (1982) Structure and role of the herpes sim-plex virus DNA termini in inversion, circularization and generation of virion DNA, *Cell*, **31**, 89–97.
9. Grunewald, K., Desai, P., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Belnap, D.M., Baumeister, W., Steven, A.C. (2003) Three-dimensional structure of her-pes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science*, **302**, 1396–1398.
10. Yudovin-Farber, I., Gurt, I., Hope, R., Domb, A.J., Katz, E. (2009) Inhi-bition of herpes simplex virus by polyamines, *Antiviral chemistry & chemotherapy*, **20**, 87–98.
11. Radtke, K., Kieneke, D., Wolfstein, A., Michael, K., Steffen, W., Scholz, T., Karger, A., Sodeik, B. (2010) Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures, *PLoS pa-thogens*, **6**, e1000991.
12. Jovasevic, V., Liang, L., Roizman, B. (2008) Proteolytic cleavage of VP1–2 is required for release of herpes simplex virus 1 DNA into the nucleus, *Journal of virology*, **82**, 3311–3319.
13. Ace, C.I., McKee, T.A., Ryan, J.M., Cameron, J.M., Preston, C.M. (1989) Construction and characterization of a herpes simplex virus type 1 mutant unable to transinduce immediate-early gene expression, *Journal of virology*, **63**, 2260–2269.
14. Barzilai, A., Zivony-Elbom, I., Sarid, R., Noah, E., Frenkel, N. (2006) The herpes simplex virus type 1 vhs-UL41 gene secures viral replication by tem-porarily evading apoptotic cellular response to infection: Vhs-UL41 activity might require interactions with elements of cellular mRNA degradation machinery, *Journal of virology*, **80**, 505–513.
15. Gibson, W., Roizman, B. (1972) Proteins specified by herpes simplex virus. 8. Characterization and com-position of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2, *Journal of virology*, **10**, 1044–1052.
16. Sheaffer, A.K., Newcomb, W.W., Gao, M., Yu, D., Weller, S.K., Brown, J.C., Tenney, D.J. (2001) Herpes simplex virus DNA cleavage and packaging proteins associate with the procapsid prior to its maturation, *Journal of virology*, **75**, 687–698.
17. Brown, J.C., Newcomb, W.W. (2011) Herpesvirus capsid assembly: insights from structural analysis, *Current opinion in virology*, **1**, 142–149.
18. Chowdhury, S., Chouljenko, V.N., Nadheri, M., Kousoulas, K.G. (2013) The Amino Terminus of Herpes Simplex Virus Type-1 (HSV-1) Gly-coprotein K (gK) is Required for Virion Entry via The Paired Immuno-globulin-like Type-2 Receptor Alpha (PILRalpha), *Journal of virology*, **87**, 3305–3313.
19. Kieff, E.D., Bachenheimer, S.L., Roiz-man, B. (1971) Size, composition, and structure of the deoxyribonucleic acid of herpes simplex virus subtypes 1 and 2, *Journal of virology*, **8**, 125–132.
20. Jenkins, F.J., Roizman, B. (1986) Herpes simplex virus 1 recombinants with noninverting genomes frozen in different isomeric arrangements are

- capable of independent replication, *Journal of virology*, **59**, 494–499.
21. Roizman, B., Zhou, G., Du, T. (2011) Checkpoints in productive and latent infections with herpes simplex virus 1: conceptualization of the issues, *Journal of neurovirology*, **17**, 512–517.
 22. Jurak, I., Kramer, M.F., Mellor, J.C., van Lint, A.L., Roth, F.P., Knipe, D.M., Coen, D.M. (2010) Numerous conserved and divergent microRNAs expressed by herpes simplex viruses 1 and 2, *Journal of virology*, **84**, 4659–4672.
 23. Honess, R.W., Roizman, B. (1974) Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins, *Journal of virology*, **14**, 8–19.
 24. Chou, J., Roizman, B. (1986) The terminal a sequence of the herpes simplex virus genome contains the promoter of a gene located in the repeat sequences of the L component, *Journal of virology*, **57**, 629–637.
 25. Arai, J., Uema, M., Morimoto, T., Sagar, H., Akashi, H., Ono, E., Arase, H., Kawaguchi, Y. (2009) Entry of herpes simplex virus 1 and other alphaherpesviruses via the paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha, *Journal of virology*, **83**, 4520–4527.
 26. Herold, B.C., Visalli, R.J., Susmarski, N., Brandt, C.R., Spear, P.G. (1994) Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B, *The Journal of general virology*, **75** (Pt 6), 1211–1222.
 27. Gianni, T., Amasio, M., Campadelli-Fiume, G. (2009) Herpes simplex virus gD forms distinct complexes with fusion executors gB and gH/gL in part through the C-terminal profusion domain, *The Journal of biological chemistry*, **284**, 17370–17382.
 28. Avitabile, E., Forghieri, C., Campadelli-Fiume, G. (2009) Cross talk among the glycoproteins involved in herpes simplex virus entry and fusion: the interaction between gB and gH/gL does not necessarily require gD, *Journal of virology*, **83**, 10752–10760.
 29. Baldwin, J., Shukla, D., Tiwari, V. (2013) Members of 3-O-Sulfotransferases (3-OST) Family: A Valuable Tool from Zebrafish to Humans for Understanding Herpes Simplex Virus Entry, *The open virology journal*, **7**, 5–11.
 30. Zhou, G., Galvan, V., Campadelli-Fiume, G., Roizman, B. (2000) Glycoprotein D or J delivered in trans blocks apoptosis in SK-N-SH cells induced by a herpes simplex virus 1 mutant lacking intact genes expressing both glycoproteins, *Journal of virology*, **74**, 11782–11791.
 31. Satoh, T., Arai, J., Suenaga, T., Wang, J., Kogure, A., Uehori, J., Arase, N., Shiratori, I., Tanaka, S., Kawaguchi, Y., Spear, P.G., Lanier, L.L., Arase, H. (2008) PILRalpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B, *Cell*, **132**, 935–944.
 32. Sodeik, B., Ebersold, M.W., Helenius, A. (1997) Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus, *The Journal of cell biology*, **136**, 1007–1021.
 33. Ojala, P.M., Sodeik, B., Ebersold, M.W., Kutay, U., Helenius, A. (2000) Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro, *Molecular and cellular biology*, **20**, 4922–4931.
 34. Abaitua, F., O'Hare, P. (2008) Identification of a highly conserved, functional nuclear localization signal within the N-terminal region of herpes simplex virus type 1 VP1-2 tegument protein, *Journal of virology*, **82**, 5234–5244.

35. Copeland, A.M., Newcomb, W.W., Brown J.C. (2009) Herpes simplex virus replication: roles of viral proteins and nucleoporins in capsid-nucleus attachment, *Journal of virology*, **83**, 1660–1668.
36. Calle, A., Ugrinova, I., Epstein, A.L., Bouvet, P., Diaz, J.J., Greco, A. (2008) Nucleolin is required for an efficient herpes simplex virus type 1 infection, *Journal of virology*, **82**, 4762–4773.
37. Everett, R.D., Freemont, P., Saitoh, H., Dasso, M., Orr, A., Katoria, M., Parkinson, J. (1998) The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms, *Journal of virology*, **72**, 6581–6591.
38. Simpson-Holley, M., Colgrove, R.C., Nalepa, G., Harper, J.W., Knipe, D.M. (2005) Identification and functional evaluation of cellular and viral factors involved in the alteration of nuclear architecture during herpes simplex virus 1 infection, *Journal of virology*, **79**, 12840–12851.
39. Jenkins, H.L., Spencer, C.A. (2001) RNA polymerase II holoenzyme modifications accompany transcription reprogramming in herpes simplex virus type 1-infected cells, *Journal of virology*, **75**, 9872–9884.
40. Hardy, W.R., Sandri-Goldin, R.M. (1994) Herpes simplex virus inhibits host cell splicing, and regulatory protein ICP27 is required for this effect, *Journal of virology*, **68**, 7790–7799.
41. Matis, J., Kudelova, M. (2001) Early shutoff of host protein synthesis in cells infected with herpes simplex viruses, *Acta virologica*, **45**, 269–277.
42. Neumann, L., Kraas, W., Uebel, S., Jung, G., Tampe, R. (1997) The active domain of the herpes simplex virus protein ICP47: a potent inhibitor of the transporter associated with antigen processing, *Journal of molecular biology*, **272**, 484–492.
43. Mackem, S., Roizman, B. (1982) Structural features of the herpes simplex virus alpha gene 4, 0, and 27 promoter-regulatory sequences which confer alpha regulation on chimeric thymidine kinase genes, *Journal of virology*, **44**, 939–949.
44. Herrera, F.J., Triezenberg, S.J. (2004) VP16-dependent association of chromatin-modifying coactivators and underrepresentation of histones at immediate-early gene promoters during herpes simplex virus infection, *Journal of virology*, **78**, 9689–9696.
45. Orzalli, M.H., DeLuca, N.A., Knipe, D.M. (2012) Nuclear IFI16 induction of IRF-3 signaling during herpesviral infection and degradation of IFI16 by the viral ICP0 protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, E3008–3017.
46. Boutell, C., Everett, R.D. (2013) Regulation of alphaherpesvirus infections by the ICP0 family of proteins, *The Journal of general virology*, **94**, 465–481.
47. Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M.K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., Ohba, Y., Taniguchi, T. (2007) DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response, *Nature*, **448**, 501–505.
48. Pham, T.H., Kwon, K.M., Kim, Y.E., Kim, K.K., Ahn, J.H. (2013) DNA sensing-independent inhibition of herpes simplex virus type-1 replication by DAI/ZBP1, *Journal of virology*, **87**, 3076–3086.
49. Guo, L., Wu, W.J., Liu, L.D., Wang, L.C., Zhang, Y., Wu, L.Q., Guan, Y., Li, Q.H. (2012) Herpes simplex virus 1 ICP22 inhibits the transcription of viral gene promoters by binding to and blocking the recruitment of P-TEFb, *PLoS one*, **7**, e45749.
50. Yager, D.R., Marcy, A.I. (1990) Translation regulation of Herpes simplex virus DNA polymerase, *Journal of virology*, **64**, 2217–2225.

51. Skaliter, R., Lehman, I.R. (1994) Rolling circle DNA replication in vitro by a complex of herpes simplex virus type 1-encoded enzymes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 10665–10669.
52. Zuccola, H.J., Filman, D.J., Coen, D.M., Hogle, J.M. (2000) The crystal structure of an unusual processivity factor, herpes simplex virus UL42, bound to the C terminus of its cognate polymerase, *Molecular cell*, **5**, 267–278.
53. Liu, S., Knafels, J.D., Chang, J.S., Waszak, G.A., Baldwin, E.T., Deibel, M.R., Jr., Thomsen, D.R., Homa, F.L., Wells, P.A., Tory, M.C., Poorman, R.A., Gao, H., Qiu, X., Seddon, A.P. (2006) Crystal structure of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase, *The Journal of biological chemistry*, **281**, 18193–18200.
54. Weller, S.K., Coen, D.M. (2012) Herpes simplex viruses: mechanisms of DNA replication, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **4**, a013011.
55. Burch, A.D., Weller, S.K. (2005) Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase requires the mammalian chaperone hsp90 for proper localization to the nucleus, *Journal of virology*, **79**, 10740–10749.
56. Sandbaumhuter, M., Dohner, K., Schipke, J., Binz, A., Pohlmann, A., Sodeik, B., Bauerfeind, R. (2013) Cytosolic herpes simplex virus capsids not only require binding inner tegument protein pUL36 but also pUL37 for active transport prior to secondary envelopment, *Cellular microbiology*, **15**, 248–269.
57. Pasdeloup, D., McElwee, M., Beilstein, F., Labetoulle M., Rixon F.J. (2012) Herpesvirus tegument protein pUL37 interacts with dystonin/BPAG1 to promote capsid transport on microtubules during egress, *Journal of virology*, **87**, 2857–2867.
58. Ibiricu, I., Maurer, U.E., Grunewald, K. (2013) Characterization of herpes simplex virus type 1 L-particle assembly and egress in hippocampal neurones by electron cryo-tomography, *Cellular microbiology*, **15**, 285–291.
59. Stegen, C., Yakova, Y., Henaff, D., Nadjar, J., Duron, J., Lippe, R. (2013) Analysis of Virion-Incorporated Host Proteins Required for Herpes Simplex Virus Type 1 Infection through a RNA Interference Screen, *PLoS one*, **8**, e53276.
60. Deshmane, S.L., Fraser, N.W. (1989) During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure, *Journal of virology*, **63**, 943–947.
61. Digard, P., Bebrin, W.R., Weisshart, K., Coen, D.M. (1993) The extreme C terminus of herpes simplex virus DNA polymerase is crucial for functional interaction with processivity factor UL42 and for viral replication, *Journal of virology*, **67**, 398–406.
62. Stow, N.D. (1993) Sequences at the C-terminus of the herpes simplex virus type 1 UL30 protein are dispensable for DNA polymerase activity but not for viral origin-dependent DNA replication, *Nucleic acids research*, **21**, 87–92.
63. Loregian, A., Piaia, E., Cancellotti, E., Papini, E., Marsden, H.S., Palu, G. (2000) The catalytic subunit of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase contains a nuclear localization signal in the UL42-binding region, *Virology*, **273**, 139–148.
64. Kuhn, F.J., Knopf, C.W. (1996) Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase. Mutational analysis of the 3'-5'-exonuclease domain, *The Journal of biological chemistry*, **271**, 29245–29254.
65. Crute, J.J., Lehman, I.R. (1989) Herpes simplex-1 DNA polymerase. Identification of an intrinsic 5'–3' exo-

- nuclease with ribonuclease H activity, *The Journal of biological chemistry*, **264**, 19266–19270.
66. Bogani, F., Boehmer, P.E. (2008) The replicative DNA polymerase of herpes simplex virus 1 exhibits apurinic/aprimidinic and 5'-deoxyribose phosphate lyase activities, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 11709–11714.
67. Bogani, F., Corredeira, I., Fernandez, V., Sattler, U., Rutvisuttinunt, W., Defais, M., Boehmer, P.E. (2010) Association between the herpes simplex virus-1 DNA polymerase and uracil DNA glycosylase, *The Journal of biological chemistry*, **285**, 27664–27672.
68. Terrell, S.L., Coen, D.M. (2012) The pre-NH(2)-terminal domain of the herpes simplex virus 1 DNA polymerase catalytic subunit is required for efficient viral replication, *Journal of virology*, **86**, 11057–11065.
69. Coen, D.M., Schaffer, P.A. (2003) Antiherpesvirus drugs: a promising spectrum of new drugs and drug targets, *Nature reviews Drug discovery*, **2**, 278–288.
70. De Clercq, E., Field, H.J. (2006) Antiviral prodrugs – the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy, *British journal of pharmacology*, **147**, 1–11.
71. Prusoff, W.H. (1959) Synthesis and biological activities of iododeoxyuridine, an analog of thymidine, *Biochimica et biophysica acta*, **32**, 295–296.
72. Elion, G.B., Furman, P.A., Fyfe, J.A., de Miranda, P., Beauchamp, L., Schaeffer, H.J. (1977) Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 5716–5720.
73. Schaeffer, H.J., Beauchamp, L., de Miranda, P., Elion, G.B., Baue, r D.J., Collins, P. (1978) 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group, *Nature*, **272**, 583–585.
74. Elion, G.B. (1993) Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity, *Journal of medical virology*, **Suppl 1**, 2–6.
75. Martin, J.C., Dvorak, C.A., Smeed, D.F., Matthews, T.R., Verheyden, J.P. (1983) 9-[(1,3-Dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine: a new potent and selective antiherpes agent, *Journal of medicinal chemistry*, **26**, 759–761.
76. Thust, R., Tomicic M., Klocking, R., Voutilainen, N., Wutzler, P., Kaina, B. (2000) Comparison of the genotoxic and apoptosis-inducing properties of ganciclovir and penciclovir in Chinese hamster ovary cells transfected with the thymidine kinase gene of herpes simplex virus-1: implications for gene therapeutic approaches, *Cancer gene therapy*, **7**, 107–117.
77. Boyd, M.R., Bacon, T.H., Sutton, D., Cole, M. (1987) Antiherpesvirus activity of 9-(4-hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl)guanine (BRL 39123) in cell culture, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **31**, 1238–1242.
78. Thackray, A.M., Field, H.J. (1998) Famciclovir and valaciclovir differ in the prevention of herpes simplex virus type 1 latency in mice: a quantitative study, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **42**, 1555–1562.
79. Oberg, B. (1989) Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium), *Pharmacology & therapeutics*, **40**, 213–285.
80. Helgstrand, E., Eriksson, B., Johansson, N.G., Lannerö, B., Larsson, A., Misiorny, A., Noren, J.O., Sjöberg, B., Stenberg, K., Stening, G., Stridh, S., Oberg, B. (1978) Trisodium phosphonoformate, a new antiviral compound, *Science*, **201**, 819–821.

81. De Clercq, E., Andrei, G., Snoeck, R., De Bolle, L., Naesens, L., Degreve, B., Balzarini, J., Zhang, Y., Schols, D., Leysen, P., Ying, C., Neyts, J. (2001) Acyclic/carbocyclic guanosine analogues as anti-herpesvirus agents, *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, **20**, 271–285.
82. Иванов А.В., Андропова В.Л., Галегов Г.А., Ясько М.В. (2005) Синтез и антигерпетическая активность Z- и E-изомеров 9-(3-фосфометоксипроп-1-ен-1-ил)аденина, *Биоорганическая химия*, **31**, 65–72.
83. Коровина А.Н., Ясько М.В., Иванов А.В., Хандажинская А.Л., Крамаров Э.В., Корнилаева Г.В., Куханова М.К. (2008) Новые ингибиторы репликации вирусов герпеса и иммунодефицита человека на основе фосфонатных аналогов нуклеозидов, *Вестник московского университета Серия 2 Химия*, **49**, 108–111.
84. Karpenko, I.L., Jasko, M.V., Andronova, V.L., Ivanov, A.V., Kukhanova, M.K., Galegov, G.A., Skoblov, Y.S. (2003) Synthesis and antiherpetic activity of acyclovir phosphonates, *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*, **22**, 319–328.
85. Skoblov, Y.S., Karpenko, I.L., Jasko, M.V., Kukhanova, M.K., Andronova, V.L., Galegov, G.A., Sidorov, G.V., Myasoedov, N.F. (2007) Cell metabolism of acyclovir phosphonate derivatives and antiherpesvirus activity of their combinations with alpha2-interferon, *Chemical biology & drug design*, **69**, 429–434.
86. Sanchez, R.M., Erhard, K., Hardwicke, M.A., Lin, H., McSurdy-Freed, J., Plant, R., Raha, K., Rominger, C.M., Schaber, M.D., Spengler, M.D., Moore, M.L., Yu, H., Luengo, J.I., Tedesco, R., Rivero, R.A. (2012) Synthesis and structure-activity relationships of 1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(3H)-ones as novel series of potent beta isoform selective phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **22**, 3198–3202.
87. Deev, S.L., Yasko, M.V., Karpenko, I.L., Korovina, A.N., Khandazhinskaya, A.L., Andronova, V.L., Galegov, G.A., Shestakova, T.S., Ulomskii, E.N., Rusinov, V.L., Chupakhin, O.N., Kukhanova, M.K. (2010) 1,2,4-Triazoloazine derivatives as a new type of herpes simplex virus inhibitors, *Bioorganic chemistry*, **38**, 265–270.
88. Revankar, G.R., Robins, R.K. (1975) Synthesis and biological activity of some nucleosides resembling guanosine: imidazo(1,2-alpha)pyrimidine nucleosides, *Annals of the New York Academy of Sciences*, **255**, 166–176.
89. Kleymann, G., Fischer, R., Betz, U.A., Hendrix, M., Bender, W., Schneider, U., Handke, G., Eckenberg, P., Hewlett, G., Pevzner, V., Baumeister, J., Weber, O., Henninger, K., Keldenich, J., Jensen, A., Kolb, J., Bach, U., Popp, A., Maben, J., Frappa, I., Haebich, D., Lockhoff, O., Rubsamen-Waigmann, H. (2002) New helicase-primase inhibitors as drug candidates for the treatment of herpes simplex disease, *Nature medicine*, **8**, 392–398.
90. Baumeister, J., Fischer, R., Eckenberg, P., Henninger, K., Rubebsamen-Waigmann, H., Kleymann, G. (2007) Superior efficacy of helicase-primase inhibitor BAY 57-1293 for herpes infection and latency in the guinea pig model of human genital herpes disease, *Antiviral chemistry & chemotherapy*, **18**, 35–48.
91. Crute, J.J., Grygon, C.A., Hargrave, K.D., Simoneau, B., Faucher, A.M., Bolger, G., Kibler, P., Liuzzi, M., Cordingley, M.G. (2002) Herpes simplex virus helicase-primase inhibitors are active in animal models of human disease, *Nature medicine*, **8**, 386–391.
92. Katsumata, K., Chono, K., Sudo, K., Shimizu, Y., Kontani, T., Suzuki, H. (2011) Effect of ASP2151, a herpesvirus helicase-primase inhibitor, in a guinea pig model of genital herpes, *Molecules*, **16**, 7210–7223.

93. Sergerie, Y., Boivin, G. (2008) Hydroxyurea enhances the activity of acyclovir and cidofovir against herpes simplex virus type 1 resistant strains harboring mutations in the thymidine kinase and/or the DNA polymerase genes, *Antiviral research*, **77**, 77–80.
94. Duan, J., Liuzzi, M., Paris, W., Lambert, M., Lawetz, C., Moss, N., Jaramillo, J., Gauthier, J., Deziel, R., Cordingley, M.G. (1998) Antiviral activity of a selective ribonucleotide reductase inhibitor against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 in vivo, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **42**, 1629–1635.
95. Ekblad, M., Adamiak, B., Bergefall, K., Nenonen, H., Roth, A., Bergstrom, T., Ferro, V., Trybala, E. (2007) Molecular basis for resistance of herpes simplex virus type 1 mutants to the sulfated oligosaccharide inhibitor PI-88, *Virology*, **367**, 244–252.
96. Ekblad, M., Adamiak, B., Bergstrom, T., Johnstone, K.D., Karoli, T., Liu, L., Ferro, V., Trybala, E. (2010) A highly lipophilic sulfated tetrasaccharide glycoside related to muparfostat (PI-88) exhibits virucidal activity against herpes simplex virus, *Antiviral research*, **86**, 196–203.
97. Johansson, M.E., Gustafsson, J.K., Sjoberg, K.E., Petersson, J., Holm, L., Sjoval, H., Hansson, G.C. (2010) Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model, *PLoS one*, **5**, e12238.
98. Yasin, B., Wang, W., Pang, M., Cheshenko, N., Hong, T., Waring, A.J., Herold, B.C., Wagar, E.A., Lehrer, R.I. (2004) Theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry, *Journal of virology*, **78**, 5147–5156.
99. Berlutti, F., Pantanella, F., Natalizi, T., Frioni, A., Paesano, R., Polimeni, A., Valenti, P. (2011) Antiviral properties of lactoferrin-a natural immunity molecule. *Molecules*, **16**, 6992–7018.
100. Coen, D.M. (1991) The implications of resistance to antiviral agents for herpesvirus drug targets and drug therapy, *Antiviral research*, **15**, 287–300.
101. Andrei, G., Georgala, A., Topalis, D., Fiten, P., Aoun, M., Opdenakker, G., Snoeck, R. (2013) Heterogeneity and evolution of thymidine kinase and DNA polymerase mutants of herpes simplex virus type 1: implications for antiviral therapy, *The Journal of infectious diseases*, **207**, 1295–1305.
102. Коровина А.Н., Гуськова А.А., Скоблов М.Ю., Андронova В.Л., Галегов Г.А., Кочетков С.Н., Куханова М.К., Скоблов Ю.С. (2010) Анализ мутаций в генах ДНК-полимераз и тимидинкиназ клинических изолятов вируса простого герпеса, резистентных к антигерпетическим препаратам, Молекулярная биология, **44**, 488–496.
103. Suzutani, T., Saijo, M., Nagamine, M., Ogasawara, M., Azuma, M. (2000) Rapid phenotypic characterization method for herpes simplex virus and Varicella-Zoster virus thymidine kinases to screen for acyclovir-resistant viral infection, *J Clin Microbiol*, **38**, 1839–1844.
104. Hwang, Y.T., Smith, J.F., Gao, L., Hwang, C.B. (1998) Mutations in the Exo III motif of the herpes simplex virus DNA polymerase gene can confer altered drug sensitivities, *Virology*, **246**, 298–305.
105. Gus'kova, A.A., Skoblov, M.Y., Korovina, A.N., Yasko, M.V., Karpenko, I.L., Kukhanova, M.K., Andronova, V.L., Galegov, G.A., Skoblov, Y.S. (2009) Antiherpetic properties of acyclovir 5'-hydrogenphosphonate and the mutation analysis of herpes virus resistant strains, *Chemical biology & drug design*, **74**, 382–389.
106. Suzutani, T., Ishioka, K., De Clercq, E., Ishibashi, K., Kaneko, H., Kira,

- T., Hashimoto, K., Ogasawara, M., Ohtani, K., Wakamiya, N., Saijo, M. (2003) Differential mutation patterns in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus type 1 clones passaged in the presence of acyclovir or penciclovir, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **47**, 1707–1713.
107. Bestman-Smith, J., Boivin, G. (2003) Drug resistance patterns of recombinant herpes simplex virus DNA polymerase mutants generated with a set of overlapping cosmids and plasmids, *Journal of virology*, **77**, 7820–7829.
108. Matthews, J.T., Carroll, R.D., Stevens, J.T., Haffey, M.L. (1989) In vitro mutagenesis of the herpes simplex virus type 1 DNA polymerase gene results in altered drug sensitivity of the enzyme, *Journal of virology*, **63**, 4913–4918.
109. Matthews, J.T., Terry, B.J., Field, A.K. (1993) The structure and function of the HSV DNA replication proteins: defining novel antiviral targets, *Antiviral research*, **20**, 89–114.
110. Vere Hodge, R.A., Field, H.J. (2013) Antiviral agents for herpes simplex virus, *Advances in pharmacology*, **67**, 1–38.