



## Олигорибонуклеотид-содержащие наноконструкции на основе наночастиц аминопропилсиланола как эффективные ингибиторы репликации вируса гриппа А

М.Н. Репкова<sup>1</sup> , О.Ю. Мазурков<sup>2</sup> , Е.И. Филиппова<sup>2</sup> , М.А. Проценко<sup>2</sup> ,  
Н.А. Мазуркова<sup>2</sup> , Б.П. Челобанов<sup>1</sup> , А.С. Левина<sup>1</sup> , В.Ф. Зарытова<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Сибирское отделение Российской академии наук, Россия, 630090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, д. 8;

<sup>2</sup>Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Россия, Новосибирская область, 630559, Кольцово

\*e-mail: zarytova@niboch.nsc.ru

Наночастицы диоксида титана или аминопропилсиланола являются эффективными средствами доставки олигодезоксирибонуклеотидов и дезоксирибозимов в клетки с целью их воздействия на нуклеиновые кислоты-мишени. В данной работе предложенный принцип доставки осуществлен в отношении олигорибонуклеотидов (ORN). Показано, что полученные ORN-содержащие наноконструкции (Si~NH<sub>2</sub>·ORN) на основе наночастиц аминопропилсиланола (Si~NH<sub>2</sub>) проникают в эукариотические клетки. Эти наноконструкции исследованы в качестве агентов для подавления репликации вируса гриппа А в клеточной системе. Показано, что ORN в составе наноконструкции, направленные на (+)РНК и (–)РНК 5-го сегмента вируса гриппа А, понижают титр вируса соответственно на 99,7% и 98,4%. Таким образом, олигорибонуклеотиды в составе наноконструкций (Si~NH<sub>2</sub>·ORN) эффективно ингибируют репликацию вируса гриппа А.

**Ключевые слова:** олигорибонуклеотиды, наночастицы аминопропилсиланола, наноконструкции, доставка в клетки, вирус гриппа А, противовирусная активность

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-4-8

### Введение

Нуклеиновые кислоты (НК) и их фрагменты (олигонуклеотиды, их производных и аналоги) являются перспективными соединениями, которые могут воздействовать на генетический материал патогенов, унаследованные дефектные гены или гены опухолей. НК плохо проникают в клетки, поэтому для их применения в терапии необходимы эффективные методы доставки.

Для создания систем доставки фрагментов НК в основном используется две стратегии: создание биоконъюгатов олигонуклеотидов и биогенных молекул (пептиды, полимеры, липофильные молекулы и др.) и фиксация олигонуклеотидов на наночастицах. Основной проблемой является низкая биодоступность конъюгатов и неблагоприятная фармакокинетика, что вместе с довольно высокой стоимостью получения таких препаратов в количествах, необходимых для достижения терапевтического эффекта, затрудняет их использование в клинике [1]. Серьезный успех с применени-

ем биоконъюгатов был достигнут в последнее время при использовании конъюгатов siRNA и N-ацетилгалактозамина (GalNAc), которые эффективно доставляются в гепатоциты путем связывания GalNAc с рецепторами печени [2]. В последние годы несколько препаратов siRNA были одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (США) или находятся на разных стадиях клинических испытаний [3].

Наиболее широко используемый и клинически продвинутый подход к доставке препаратов на основе РНК заключается в конъюгации их с липидными наночастицами [3]. Использование липидных наночастиц сопряжено со значительными затратами [4]. Такие частицы обычно состоят из четырех-пяти компонентов в различных соотношениях с различной токсичностью каждого компонента [5]. Кроме того, предлагаемые частицы вызывают токсические иммунные реакции и/или нецелевые побочные эффекты, приводящие

к провалу клинических испытаний. Безопасность и эффективность остаются жизненно важными для клинического успеха предлагаемых методов доставки фрагментов НК. Таким образом, несмотря на определенные успехи в разработке методов доставки фрагментов НК в клетки, проблему доставки нельзя считать окончательно решенной. Поэтому целесообразным является поиск других способов доставки.

Ранее мы показали, что наночастицы аминопропилсиланола ( $\text{Si}\sim\text{NH}_2$ ) способны доставлять олигодезоксирибонуклеотиды (ODN) в эукариотические клетки [6]. Биологический эффект предложенных наноконструктов продемонстрирован на примере подавления репликации вируса гриппа А (influenza A virus, IAV) *in vitro* [6], а также для коррекции гипертензии на модели крыс НИСАГ (крыс с наследуемой индуцируемой стрессом артериальной гипертензией) [7, 8].

Целью данной работы было получение наноконструктов на основе аминопропилсиланола, несущих олигорибонуклеотиды (ORN), которые являются составными частями коротких интерферирующих РНК (siRNA), и изучение их активности против вируса гриппа А в культуре клеток.

### Материалы и методы

В работе были использованы: аминопропилтриэтоксисилан (APTES, (3-aminopropyl)triethoxysilane), трипсин, флуоресцеинизотиоцианат, пенициллин, стрептомицин и L-глутамин (Sigma-Aldrich, США); среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium); фетальная телячья сыворотка (Gibco, США); эритроциты петуха, клетки MDCK и HeLa, вирус гриппа A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и куриные эмбрионы (ГНЦ ВБ «Вектор», Россия).

Олигорибонуклеотиды и их производные синтезировали амидофосфитным методом на ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (Biosset, Россия) с использованием соответствующих мономеров (Glen Research, США). Оптическое поглощение олигорибонуклеотидов измеряли на спектрофотометре Shimadzu U-1800 (Shimadzu, Япония). В работе использовали олигорибонуклеотиды CUCCGAAGAAAUAAGAUC (dT) ( $\text{ORN}_1$ ) и GGAUCUUAUUUCUUCGGAG (dT) ( $\text{ORN}_2$ ).

**Синтез наночастиц и наноконструктов.** Наночастицы  $\text{Si}\sim\text{NH}_2$  синтезированы, как описано ранее [6]. APTES добавляли по каплям в горячую воду, и смесь перемешивали при этой температуре в течение 15 ч с последующим охлаждением до комнатной температуры. Конечная концентрация  $\text{Si}\sim\text{NH}_2$  составляла 0,26 М. Размер наночастиц (~1 нм) определяли методом динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Nano ZS Plus Instrument (Malvern, Великобритания) в водном растворе. Ранее было показано [7], что полученные наночастицы не склонны к агрегации и могут храниться в течение нескольких месяцев.

Для мечения наночастиц флуоресцентной меткой раствор  $\text{Si}\sim\text{NH}_2$  (2 мкмоль) и флуоресцеинизотиоцианат (0,1 мкмоль) в 40 мкл воды выдерживали в течение 1 ч при 60°C и получали частицы аминопропилсиланола, содержащие остаток флуоресцеина ( $\text{Si}\sim\text{NH}_2^{\text{Flu}}$ ) в концентрации 50 мМ по аминогруппам и 2,7 мМ по остатку флуоресцеина (концентрацию последнего оценивали спектрофотометрически с использованием молярного коэффициента поглощения флуоресцеина в максимуме поглощения,  $\epsilon_{495} = 74000 \text{ см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$ ).

ORN иммобилизовали на наночастицах  $\text{Si}\sim\text{NH}_2$  за счет электростатического взаимодействия между отрицательно заряженными межнуклеотидными фосфатными группами (p) в ORN и положительно заряженными аминогруппами ( $\text{NH}_2$ ) в наночастицах, как описано ранее [6], и получали наноконструкты  $\text{Si}\sim\text{NH}_2 \cdot \text{ORN}$  при соотношении  $\text{NH}_2/\text{p} = 100$ . Наноконструкты  $\text{Si}\sim\text{NH}_2 \cdot \text{ORN}_1^{\text{Flu}}$  получали, используя флуоресцентно меченый олигорибонуклеотид  $\text{ORN}_1^{\text{Flu}}$ .

**Выживаемость клеток MDCK при воздействии наночастиц  $\text{Si}\sim\text{NH}_2$ .** Клетки MDCK в логарифмической фазе роста ( $10^5$  кл/мл) рассеивали в 96-луночные планшеты в питательной среде DMEM (100 мкл/луночка) и инкубировали при 37°C и 5%  $\text{CO}_2$ . Через 2 сут после образования сплошного монослоя клетки промывали питательной средой без сыворотки ( $3 \times 200$  мкл). Исследуемые образцы наночастиц разбавляли средой DMEM до нужной концентрации (5–100 мМ) и инкубировали с клетками MDCK при 37°C и 5%  $\text{CO}_2$  в течение 48 ч. Деструктивные изменения в клетках оценивали с помощью инвертированного микроскопа. Клетки окрашивали трипановым синим [9]; число живых клеток считали в камере Горяева. Максимальную концентрацию веществ, при которой отсутствовали грубые изменения клеток, принимали за максимально переносимую концентрацию (МПК).

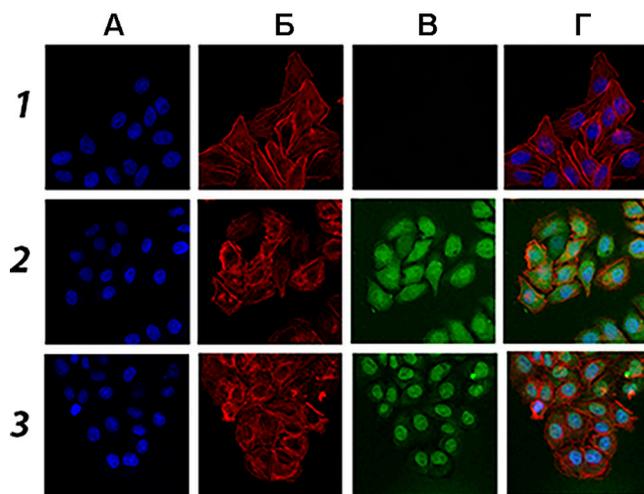
**Проникновение наночастиц и наноконструктов в клетки.** Для конфокальной микроскопии клетки HeLa культивировали в полной среде DMEM в 8-луночных камерах Nunc Lab-Tek Chamber Slide System (Thermo Fisher Scientific, США) до достижения 70%-ного монослоя, после чего полную среду заменяли на среду без сыворотки, содержащую исследуемые флуоресцентно меченые образцы  $\text{ORN}_1^{\text{Flu}}$ ,  $\text{Si}\sim\text{NH}_2^{\text{Flu}}$  и  $\text{Si}\sim\text{NH}_2 \cdot \text{ORN}_1^{\text{Flu}}$  в концентрации 5 мкМ по остатку флуоресцеина. Концентрацию по остатку флуоресцеина оценивали спектрофотометрически, используя значение  $\epsilon_{495} = 74000 \text{ см}^{-1} \times \text{М}^{-1}$ . После 4 ч инкубации клетки отмывали фосфатно-солевым буфером, фиксировали 3,7%-ным формальдегидом, окрашивали красителями Phalloidin-TRITC (Sigma-Aldrich, США) и Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США), наслаивали среду для поддержания флуоресценции Dako Fluorescence Mounting Medium (Dako, США) и накрывали покровным стеклом. Препараты ана-

лизировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Inc., Германия). Использовали три лазерные линии – с длиной волны 405 нм (для обнаружения ядер клеток), 561 нм (для актиновых микрофиламентов) и 488 нм (для наноконструкций, меченных флуоресцеином). Полученные изображения обрабатывали и анализировали при помощи программы ZEN 2 (Carl Zeiss, Inc., Германия).

**Противовирусная активность исследуемых образцов.** Вирус гриппа А/Н5N1 выращивали в аллантоисной полости 10-дневных куриных эмбрионов при температуре 37°C. Аллантоисную жидкость собирали в течение 48 ч после инокуляции вирусом, делили на части и хранили при температуре –80°C. Клетки MDCK в логарифмической фазе ( $10^5$  кл/мл) высевали в питательной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (Gibco, США), в 96-луночные планшеты (100 мкл/лунка) и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности. После достижения ~80% монослоя среду удаляли, и в лунки добавляли исследуемые образцы ORN и Si~NH<sub>2</sub>·ORN (0,1 мкМ по ORN) в 100 мкл среды DMEM. Контрольным образцом была та же среда без образца. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности в течение 4 ч с последующей промывкой клеток той же средой. Затем клетки инфицировали вирусом А/Н5N1 в среде DMEM, содержащей трипсин (2 мкг/мл) (по 100 мкл в каждую лунку), при множественности заражения (МОИ) 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл. Множественность заражения означает количество ТЦД<sub>50</sub> на одну клетку (ТЦД<sub>50</sub> – тканевая цитопатическая доза вируса, вызывающая гибель 50% клеток). После 1 ч инкубации при комнатной температуре содержащую вирус среду удаляли и добавляли ту же среду DMEM (100 мкл в каждую лунку). После инкубации в течение 48 ч проводили последовательные десятикратные разведения (от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-8</sup>) содержащей вирус жидкости из каждой лунки. Полученные растворы (каждое разведение) наносили на 4 лунки с выращенным монослоем клеток MDCK и инкубировали 48 ч для оценки титра вируса. Присутствие вируса определяли по реакции гемагглютинации с 1%-ной суспензией эритроцитов петуха. Титр вируса выражали в единицах logТЦД<sub>50</sub>/мл.

### Результаты и обсуждение

Неагломерированные наночастицы Si~NH<sub>2</sub> синтезированы путем гидролиза АРТЕS. Полученные частицы в виде прозрачного раствора использованы для иммобилизации ORN за счет электростатического взаимодействия положительно заряженных аминогрупп аминопропилсиланола с отрицательно заряженными межнуклеотидными фосфатными группами олигорибонуклеотидов. В результате получены наноконструкты Si~NH<sub>2</sub>·ORN.



**Рис. 1.** Конфокальная лазерная флуоресцентная микроскопия клеток HeLa после инкубации в течение 4 ч с (1) ORN<sub>1</sub><sup>Flu</sup>, (2) Si~NH<sub>2</sub><sup>Flu</sup>, (3) Si~NH<sub>2</sub>·ORN<sub>1</sub><sup>Flu</sup>. (А) Ядра клеток, окрашенные DAPI (синий канал); (Б) актиновые филаменты, окрашенные Phalloidin-TRITC (красный канал); (В) образцы, меченные флуоресцеином (зеленый канал); (Г) суперпозиция каналов А, Б и В.

В наших предыдущих работах показано, что олигонуклеотид-содержащие наноконструкты на основе наночастиц диоксида титана или аминопропилсиланола проникают в разные типы эукариотических клеток (MDCK, VERO, HeLa, и A549 human lung adenocarcinoma cells [6, 10, 11]). В данной статье мы использовали клетки HeLa для демонстрации проникновения в клетки наночастиц аминопропилсиланола и олигорибонуклеотид-содержащих наноконструктов на их основе. На рис. 1 представлены изображения клеток HeLa, полученные с помощью конфокального микроскопа, после их инкубации с флуоресцентно мечеными образцами ORN<sub>1</sub><sup>Flu</sup>, Si~NH<sub>2</sub><sup>Flu</sup> и Si~NH<sub>2</sub>·ORN<sub>1</sub><sup>Flu</sup>.

Несвязанные с наночастицами молекулы ORN<sub>1</sub><sup>Flu</sup> в клетках не детектируются (1 на рис. 1). Флуоресцентно меченные наночастицы равномерно распределяются по всей клетке (2 на рис. 1). Меченные молекулы ORN<sub>1</sub><sup>Flu</sup>, доставляемые в клетки в виде наноконструкта Si~NH<sub>2</sub>·ORN<sub>1</sub><sup>Flu</sup>, обнаруживаются в основном в ядрах клеток (3 на рис. 1).

Полученные результаты свидетельствуют об успешном использовании наночастиц аминопропилсиланола в качестве доставщиков ORN в клетки.

Доставка РНК в ядра клеток показана также в других работах. Например, авторы одной из работ [12] для этой цели использовали золотые наночастицы, несущие siRNA и сигнальные пептиды ядерной локализации.

Мы исследовали способность предлагаемых наноконструктов воздействовать на нуклеиновые кислоты-мишени внутри клеток на примере ингибирования репликации IAV. Как и многие другие исследователи [13, 14], мы выбрали сегмент 5 IAV

в качестве мишени для воздействия на репликацию вируса. Этот сегмент кодирует нуклеопротеин, который играет ключевую роль в проникновении вирусного генома в ядра клеток инфицированного организма и, тем самым, обеспечивает дальнейшую репликацию и сборку вирусных частиц. В данной работе мы использовали  $ORN_1$ , направленный на кодирующую область вблизи 3'-конца (+)РНК 5-го сегмента IAV (1496–1516 нт), и комплементарный ему  $ORN_2$ , направленный на соответствующую область (-)РНК 5-го сегмента IAV. Комплементарные друг другу  $ORN_1$  и  $ORN_2$  являются составными компонентами короткой интерферирующей РНК (siRNA). В ряде работ показано, что упомянутая область 5-го сегмента IAV наиболее чувствительна к воздействию siRNA [13, 15].

Мы оценили МПК наночастиц  $Si\sim NH_2$ , не вызывающую деструкцию используемой культуры клеток MDCK, как 20 мМ. При исследовании противовирусной активности препаратов мы использовали наночастицы и наноконструкции с концентрацией по наночастицам 0,2 мМ, т.е. на 2 порядка меньшую по сравнению МПК.

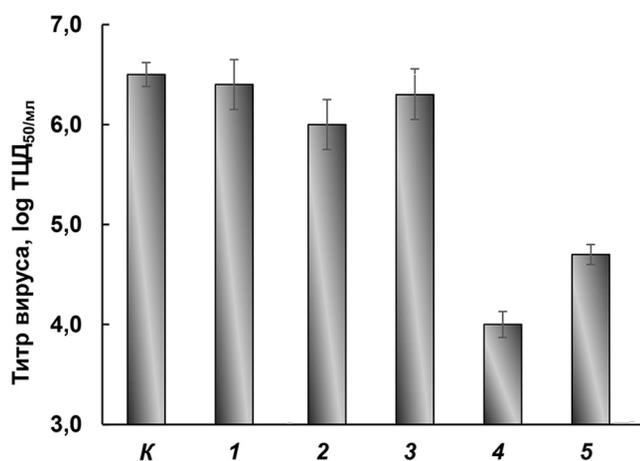


Рис. 2. Противовирусная активность исследуемых образцов. 1 –  $Si\sim NH_2$ ; 2 –  $ORN_1$ ; 3 –  $ORN_2$ ; 4 –  $Si\sim NH_2\cdot ORN_1$ ; 5 –  $Si\sim NH_2\cdot ORN_2$ . К – титр вируса в зараженных клетках без добавления образцов. Концентрация ORN в образцах 0,1 мкМ.

Таблица 1

Противовирусная активность исследуемых образцов

| Образец                    | logTЦД <sub>50/мл</sub> | TЦД <sub>50/мл</sub> | Подавление, % <sup>а)</sup> |
|----------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------------|
| К Контроль <sup>б)</sup>   | 6,5 ± 0,12              | 3162278              |                             |
| 1 $Si\sim NH_2$            | 6,4 ± 0,25              | 2511886              | 20,6                        |
| 2 $ORN_1$                  | 6,0 ± 0,25              | 1000000              | 68,4                        |
| 3 $ORN_2$                  | 6,3 ± 0,25              | 1995262              | 36,9                        |
| 4 $Si\sim NH_2\cdot ORN_1$ | 4,0 ± 0,13              | 10000                | 99,7                        |
| 5 $Si\sim NH_2\cdot ORN_2$ | 4,7 ± 0,10              | 50119                | 98,4                        |

<sup>а)</sup> Подавление репликации вируса в % вычисляли по формуле:  $[TЦД_{50/мл}(контроль) - TЦД_{50/мл}(образец)] / TЦД_{50/мл}(контроль)$ .

<sup>б)</sup> Титр вируса в зараженных клетках без добавления образцов

Мы оценили активность предложенных наноконструкций  $Si\sim NH_2\cdot ORN$  в отношении высокопатогенного вируса гриппа А/Н5N1 и сравнили ее с контрольными образцами (рис. 2, табл. 1).

Титр вируса в клетках после инкубации с наночастицами  $Si\sim NH_2$  (1, рис. 2) или  $ORN_1$  и  $ORN_2$ , не связанными с наночастицами (2 и 3, рис. 2), практически не отличается от контроля. Однако те же олигорибонуклеотиды в составе наноконструкций  $Si\sim NH_2\cdot ORN_1$  и  $Si\sim NH_2\cdot ORN_2$  подавляют репликацию вируса на 99,7% и 98,4%, т.е. являются высокоэффективными противовирусными агентами (4 и 5, рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют не только об успешном использовании наночастиц аминопропилсиланола в качестве переносчиков ORN, но и о способности доставленных ORN эффективно взаимодействовать с РНК-мишенями.

Идеальные носители для доставки фрагментов НК должны соответствовать таким критериям, как простота приготовления и модификации (для введения функциональных групп), эффективность иммобилизации НК, высокая биосовместимость, низкая токсичность и высокая эффективность проникновения через клеточную мембрану. Наночастицы диоксида кремния рассматриваются как перспективные носители для доставки нуклеиновых кислот в клетки [16]. Диоксид кремния привлекателен как функциональный, биосовместимый, нетоксичный и инертный материал, который можно легко синтезировать и модифицировать [17]. Использование наночастиц  $SiO_2$  в качестве невирусных нановекторов для доставки плазмидной ДНК и их более низкая токсичность по сравнению с широко используемым трансфекционным агентом липофектамин были показаны ранее [18]. Органически модифицированные наночастицы диоксида кремния известны своей низкой токсичностью и биосовместимостью и могут быть использованы для терапии [19]. Такие наночастицы биоинертны и менее токсичны по сравнению с катионными полимерами, используемыми для доставки НК; они гораздо более стабильны в физиологических условиях, чем липосомы и другие подобные транспортирующие наноконструкции.

Синтез аminosодержащих наночастиц диоксида кремния описан во многих работах [17, 18, 20]. Чаще всего их получают сополимеризацией при гидролизе алкил- (или арил)триэтокси- (или метокси-) силанов в присутствии аминопропилтриэтоксисилана [17].

Предлагаемый способ доставки олигорибонуклеотидов имеет ряд преимуществ по сравнению с наиболее часто используемыми в настоящее время методами. Синтез наночастиц аминопропилсиланола проще, быстрее и дешевле, чем получение других кремниевых или липидных наночастиц. Используемые наночастицы не агломе-

рируют и представляют собой прозрачный раствор, что может расширить возможности их применения. Они способствуют доставке олигорибонуклеотидов в цитоплазму и ядра клеток без использования дополнительных агентов. Предлагаемые наночастицы Si~NH<sub>2</sub> обладают низкой цитотоксичностью. Олигорибонуклеотид-содержащие наноконплексы на их основе проявляют достаточно высокую биологическую активность, что показано на примере подавления репликации вируса гриппа А.

### Заключение

На основании полученных данных можно сделать вывод о целесообразности применения наночастиц аминопропилсиланола для доставки олигорибонуклеотидов в эукариотические клет-

ки. В работе показано проникновение наноконплексов Si~NH<sub>2</sub>·ORN в клетки и их успешное использование для высокоэффективного подавления репликации вируса гриппа А в клеточной системе.

Авторы благодарны Центру коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов Сибирского отделения Российской академии наук (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) за предоставленное оборудование.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00230). Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chernikov I.V., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Current development of siRNA bioconjugates: from research to the clinic. *Front. Pharmacol.* 2019;10:444.
- Fabrega C., Aviñó A., Navarro N., Jorge A.F., Grijalvo S., Eritja R. Lipid and peptide-oligonucleotide conjugates for therapeutic purposes: from simple hybrids to complex multifunctional assemblies. *Pharmaceutics.* 2023;15(2):320.
- Lim S.A., Cox A., Tung M., Chung E.J. Clinical progress of nanomedicine-based RNA therapies. *Bioact. Mater.* 2022;12:203–213.
- Kanasty R., Dorkin J.R., Vegas A., Anderson D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nat. Mater.* 2013;12(11):967–977.
- Juliano RL. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(14):6518–6548.
- Levina A.S., Repkova M.N., Shikina N.V., Ismagilov Z.R., Yashnik S.A., Semenov D.V., Savinovskaya Y.I., Mazurkova N.A., Pyshnaya I.A., Zarytova V.F. Non-agglomerated silicon-organic nanoparticles and their nanocomplexes with oligonucleotides: synthesis and properties. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2018;9:2516–2525.
- Levina A.S., Repkova M.N., Klimov L.O., Ryazanova M.A., Markel A.L., Zarytova V.F. Antisense oligonucleotides immobilized on silicon-organic nanoparticles as a tool for prolonged correction of hypertensive states. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2019;167(1):116–119.
- Levina A., Repkova M., Kupryushkin M., Seryapina A., Shevelev O., Pyshnyi D., Zarytova V. *In vivo* hypotensive effect of aminosilanol-based nanocomposites bearing antisense oligonucleotides. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2022;75:103612.
- Osano E., Kishi J., Takahashi Y. Phagocytosis of titanium particles and necrosis in TNF-alpha-resistant mouse sarcoma L929 cells. *Toxicol. In Vitro.* 2003;17(1):41–47.
- Levina A.S., Ismagilov Z.R., Repkova M.N., Shikina N.V., Baiborodin S.I., Shatskaia N.V., Zagrebel'nyĭ S.N., Zarytova V.F. TiO<sub>2</sub>-DNA nanocomposites capable of penetrating into cells. *Russian J. Bioorg. Chem.* 2013;39(1):77–86.
- Repkova M., Levina A., Chelobanov B., Ismagilov Z., Shatskaya N., Baiborodin S., Filippova E., Mazurkova N., Zarytova V. Efficient inhibition of influenza A viral replication in cells by deoxyribozymes delivered by nanocomposites. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2017;49(6):703–708.
- Li N., Yang H., Yu Z., Li Y., Pan W., Wang H., Tang B. Nuclear-targeted siRNA delivery for long-term gene silencing. *Chem. Sci.* 2017;8(4):2816–2822.
- Ge Q., Pastey M., Kobasa D., Puthavathana P., Lupfer C., Bestwick R.K., Iversen P.L., Chen J., Stein D.A. Inhibition of multiple subtypes of influenza A virus in cell cultures with morpholino oligomers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50(11):3724–3733.
- Zhang T., Wang T., Zhao P., Liang M., Gao Y., Yang S., Qin C., Wang C., Xia X. Antisense oligonucleotides targeting the RNA binding region of the NP gene inhibit replication of highly pathogenic avian influenza virus H5N. *Int. Immunopharmacol.* 2011;11(12):2057–2061.
- Stoppani E., Bassi I., Dotti S., Lizier M., Ferrari M., Lucchini F. Expression of a single siRNA against a conserved region of NP gene strongly inhibits *in vitro* replication of different influenza A virus strains of avian and swine origin. *Antiviral Res.* 2015;120:16–22.
- Liu Y., Lou C., Yang H., Shi M., Miyoshi H. Silica nanoparticles as promising drug/gene delivery carriers and fluorescent nano-probes: recent advances. *Curr. Cancer Drug Targets* 2011;11(2):156–163.
- Lieberman A., Mendez N., Trogler W.C., Kummel A.C. Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine. *Surf. Sci. Rep.* 2014;69(2–3):132–158.
- Cheang T.Y., Tang B., Xu A.W., Chang G.Q., Hu Z.J., He W.L., Xing Z.H., Xu J.B., Wang M., Wang S.M. Promising plasmid DNA vector based on APTES-modified silica nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine.* 2012;7:1061–1067.
- Mahajan S.D., Law W.C., Aalinker R., Reynolds J.L., Nair B.B., Sykes D.E., Yong K.T., Roy I., Prasad P.N., Schwartz S.A. Anti-HIV-1 nanotherapeutics: promises and challenges for the future. *Int. J. Nanomed.* 2012;7:5301–5314.
- Chen G., Roy I., Yang C., Prasad P.N. Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy. *Chem. Rev.* 2016;116(5):2826–2885.

Поступила в редакцию 25.09.2023

После доработки 25.01.2024

Принята в печать 01.02.2024

## RESEARCH ARTICLE

# Oligoribonucleotide-containing nanocomplexes based on aminopropylsilanol nanoparticles as effective inhibitors of influenza A virus replication

M.N. Repkova<sup>1</sup> , O.Yu. Mazurkov<sup>2</sup> , E.I. Filippova<sup>2</sup> , M.A. Procenko<sup>2</sup> ,  
N.A. Mazurkova<sup>2</sup> , B.P. Chelobanov<sup>1</sup> , A.S. Levina<sup>1</sup> , V.F. Zarytova<sup>1, \*</sup> 

<sup>1</sup>*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, 8 Lavrent'eva pr., Novosibirsk, 630090, Russia;*

<sup>2</sup>*State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector," Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russia  
\*e-mail: asl1032@yandex.ru*

Titanium dioxide or aminopropylsilanol nanoparticles were shown to be effective vehicles for delivering oligodeoxyribonucleotides and deoxyribozymes to cells to affect target nucleic acids. In this paper, the proposed principle of the delivery has been implemented in relation to oligoribonucleotides (ORN), components of short interfering RNAs (siRNAs). It has been shown that the obtained ORN-containing nanocomplexes (Si~NH<sub>2</sub>·ORN) based on aminopropylsilanol nanoparticles penetrate eukaryotic cells. These nanocomplexes have been investigated as agents for suppressing the replication of influenza A virus (IAV) in the cellular system. It has been shown that the ORN strands targeted to (+)RNA and (–)RNA of the IAV 5th segment reduces the titer of the virus by 99.7% and 98.4%, respectively. Thus, oligoribonucleotides in the Si~NH<sub>2</sub>·ORN nanocomplexes effectively inhibit the replication of the influenza A virus.

**Keywords:** *oligoribonucleotides, aminopropylsilanol nanoparticles, nanocomplexes, cell delivery, influenza A virus, antiviral activity*

**Funding:** The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 23-25-00230.

## Сведения об авторах

*Репкова Марина Николаевна* – канд. хим. наук, науч. сотр. ИХБФМ СО РАН. Тел.: 8-383-363-51-23; e-mail: repk56@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7108-9036>

*Мазурков Олег Юрьевич* – канд. биол. наук, науч. сотр. ГНЦ ВБ «Вектор». Тел.: 8-383-363-47-00; e-mail: mazurkov\_oleg@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8164-4091>

*Филиппова Екатерина Игоревна* – канд. биол. наук, науч. сотр. ГНЦ ВБ «Вектор». Тел.: 8-383-363-47-00; e-mail: filippova.ekaterina.89@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9554-4462>

*Проценко Мария Анатольевна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ГНЦ ВБ «Вектор». Тел.: 8-383-363-47-00; e-mail: mpbioteh@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1005-7588>

*Мазуркова Наталья Алексеевна* – докт. биол. наук, зав. лаб. ГНЦ ВБ «Вектор». Тел.: 8-383-363-47-00; e-mail: mazurkova@vector.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1896-2684>

*Челобанов Борис Павлович* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ИХБФМ СО РАН. Тел.: 8-383-363-51-23; e-mail: boris.p.chelobanov@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2958-2580>

*Левина Ася Сауловна* – канд. хим. наук, ст. науч. сотр. ИХБФМ СО РАН. Тел.: 8-383-363-51-23; e-mail: asl1032@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2423-3805>

*Зарытова Валентина Филипповна* – докт. хим. наук, гл. науч. сотр. ИХБФМ СО РАН. Тел.: 8-383-363-51-23; e-mail: zarytova@niboch.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9579-9972>