

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.113.6:546.824-31+578.282:578.825.1

# Эффективное ингибирование репликации вируса простого герпеса 1-го типа *in vitro* с помощью олигонуклеотид-содержащих нанокompозитов

М.Н. Репкова<sup>1</sup> , В.Ф. Зарытова<sup>1</sup> , О.Ю. Мазурков<sup>2</sup> , Н.А. Мазуркова<sup>2</sup> ,  
Е.В. Макаревич<sup>2</sup> , Е.И. Филиппова<sup>2</sup> , М.Д. Некрасов<sup>1</sup> ,  
М.С. Купрюшкин<sup>1</sup> , А.С. Левина<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: asl1032@yandex.ru

Борьба с герпесвирусными инфекциями является насущной проблемой общественно-го здравоохранения из-за широкой распространенности вируса простого герпеса, который вызывает целый ряд заболеваний, начиная от легких первичных поражений кожи и заканчивая тяжелым, а иногда и смертельным энцефалитом. Использование антисмысловых олигонуклеотидов (ON, oligonucleotide) для подавления репликации вируса простого герпеса является многообещающим направлением в этой области. Для доставки ON в клетки мы создали нанокompозиты, состоящие из антисмысловых ON, иммобилизованных на наночастицах TiO<sub>2</sub> в форме анатаза (Ans~ON). Мы исследовали противовирусную активность нескольких нанокompозитов, содержащих ON, нацеленные на различные участки генома вируса простого герпеса 1. В работе использовались немодифицированные ON и ON с метилсульфонилфосфорамидными межнуклеотидными группами. Наиболее эффективные нанокompозиты снижали репликацию вируса в культуре клеток на 3–3,5 порядка. Значения индекса селективности этих нанокompозитов были оценены как 90–110 в лечебном режиме.

**Ключевые слова:** нанокompозиты, антисмысловые олигонуклеотиды, TiO<sub>2</sub>-наночастицы (анатаз), противовирусный эффект, вирус простого герпеса

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-14

## Сокращения

Ans — наночастицы TiO<sub>2</sub> в кристаллической форме анатаз (от англ. anatase);

IC<sub>50</sub> — 50%-я эффективная концентрация образца, приводящая к ингибированию вируса на 50%;

MOI — среднее количество вирусных частиц на одну клетку (multiplicity of infection);

ON — олигонуклеотид (oligonucleotide);

PL — полилизин (polylysine);

ТС<sub>50</sub> — 50%-я токсическая концентрация образца, приводящая к гибели 50% неинфицированных клеток;

ВПГ-1 — вирус простого герпеса первого типа; ДМСИ — модифицированная Дульбекко среда Игла;

НК — нуклеиновая кислота;

ТЦД — тканевая цитопатическая доза;

ЭТС — эмбриональная телячья сыворотка.

## Введение

Вирус простого герпеса (ВПГ) вызывает целый ряд заболеваний, начиная от легких первичных поражений кожи, слизистых оболочек и эпителия роговицы и заканчивая тяжелыми, а иногда и смертельными эпизодами энцефалита. Широко используемые в настоящее время противогерпетические аналоги нуклеозидов (в первую очередь, ацикловир) имеют ряд недостатков: низкую растворимость в воде, высокую клеточную токсичность и резистентность к ним вновь появляющихся вирусных изолятов. Поэтому существует необходимость в поиске новых способов лечения герпесвирусных инфекций. Антисмысловые олигонуклеотиды (ON, oligonucleotide) потенциально могут быть использованы для подавления экспрессии мРНК генов, ответственных за размножение патогенов. Преимущества этих препаратов перед низкомолекулярными противовирусными средствами заключаются в следующем: они избирательно распознают целевые нуклеиновые кислоты (НК) посредством комплементарных взаимодействий, воздействуют на геном вируса, не затрагивая геном организма-хозяина, и могут быть быстро перенаправлены на любую целевую НК путем изменения последовательности нуклеотидов. Кроме того, ON хорошо растворимы в воде и менее токсичны, чем их нуклеозидные аналоги.

Концепция использования антисмысловых ON-препаратов была впервые предложена около 50 лет назад [1, 2]. Однако их применение в медицинской практике остается ограниченным из-за их слабого проникновения в клетки и низкой стабильности в клеточной среде. В последнее десятилетие антисмысловые ON изучались как потенциальные лекарственные средства от различных заболеваний, связанных с «вредными» нуклеиновыми кислотами [3]. Нусинерсен, будучи на сегодняшний день наиболее успешным препаратом на основе антисмысловых ON, продемонстрировал ценные терапевтические преимущества в клинике для лечения спинальной мышечной атрофии [4]. Показано, что ON эффективно ингибируют репликацию ВПГ в клеточной системе (более чем на 90%) [5, 6] и увеличивают выживаемость лабораторных животных [6, 7].

Использование наночастиц в качестве средств доставки лекарственных препаратов на основе НК является многообещающим подходом [8]. Наночастицы TiO<sub>2</sub> были идентифицированы как потенциальные носители фрагментов НК благодаря их способности проникать через плазматическую мембрану, стабильности и возможности модификации поверхности для иммобилизации различных соединений [9, 10].

Целью настоящего исследования была разработка эффективного подхода к подавлению ре-

пликации ВПГ 1-го типа (ВПГ-1). Для этой цели использованы наноконкомпозиты на основе наночастиц TiO<sub>2</sub>, которые содержат антисмысловые ON, воздействующие на геном вируса. В работе использовались немодифицированные ON и ON с метилсульфонилфосфамидными межнуклеотидными группами.

## Материалы и методы

В работе использовали пенициллин, стрептомицин и поли-L-лизин гидробромид (PL, poly-L-lysine hydrobromide; MW 15000–30000; Sigma-Aldrich, США); клетки VERO и ВПГ-1 штамм VR-3 (Вектор, Россия); модифицированную Дульбекко среду Игла (ДМСИ; Биолот, Россия); эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС; Gibco, США).

Наночастицы TiO<sub>2</sub> в форме анатаза (Ans, от англ. anatase; 5 нм) синтезированы, как описано ранее [11]. ON синтезировали амидофосфитным методом на ДНК-синтезаторе ASM-800 (Biosset, Россия) из соответствующих мономеров (Glen Research, США). Мезильные группы вводили в соответствии с ранее опубликованным протоколом [12].

Нативные и модифицированные ON очищали на хроматографе Agilent 1200 (Agilent Technologies, США), используя колонку Zorbax SB-C18 (5 мкм; 4,6 × 150 мм; Agilent Technologies, США), в градиенте ацетонитрила (0–50%), содержащего 20 мМ ацетат триэтиламония, pH 7,0.

Молекулярные массы ON (MW, molecular weight) определяли методом ESI-MS на масс-спектрометре Agilent G6410A (Santa Clara, США) в режиме детектирования отрицательных ионов. MW (расчет/эксперимент) для ON-10, ON-10a и ON-10b составили 6731,2/6729,6, 7963,2/7962,5 и 6432,0/6430,2 соответственно.

**Конъюгаты Ans/PL и наноконкомпозиты Ans/PL • ON** синтезированы, как описано ранее [11]. Водный раствор PL интенсивно перемешивали с наночастицами Ans в течение 30 мин с последующей промывкой и суспендированием в 0,1 М NaCl. Получали конъюгаты Ans/PL с концентрацией 1 мг/мл. Элементный анализ Ans/PL: Ti – 42,2%, N – 4,8% и C – 13,2%, что соответствует содержанию ~2 мкмоль аминокрупп на 1 мг TiO<sub>2</sub>. Ans/PL • ON (далее Ans~ON) получали после перемешивания Ans/PL (0,1 мг для наночастиц) и ON (2 нмоль) в течение 30 мин с последующей промывкой и суспендированием в 0,1 М NaCl. Наноконкомпозиты получены с практически количественным выходом (90–100%) с емкостью ~20 нмоль/мг по ON.

**Оценка значений МПК для наночастиц и наноконкомпозитов в клетках VERO.** Клетки VERO (10<sup>5</sup> кл/мл) инкубировали в течение 48 ч в среде ДМСИ в 96-луночных планшетах (100 мкл на лунку) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> и промывали питательной средой без сыворотки. Образцы исследуемых наночастиц и наноконкомпозитов разбавляли ДМСИ

до необходимой концентрации (5–100 мМ) и инкубировали с клетками VERO при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 ч. Деструктивные изменения в клетках после окрашивания трипановым синим оценивали с помощью инвертированного микроскопа [13]. За максимально переносимую концентрацию (МПК) принимали максимальную концентрацию образцов, при которой в клетках не наблюдалось существенных изменений.

**Вирулицидные свойства наночастиц и нанокомполитов.** Вирусную суспензию ВПГ-1 (100 мкл) смешивали с тестируемыми образцами (Ans, Ans~ON-10 или Ans~ON-1) в среде ДМСИ (100 мкл). Конечные концентрации наночастиц Ans и ON в нанокомпозитах Ans~ON составляли 0,25 мг/мл и 5 мкМ соответственно; тканевая цитопатическая доза (ТЦД), вызывающая гибель 50% инфицированных клеток, составляла 100 ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл. После инкубации (1 ч, 14°C) реакционные смеси разбавляли с шагом 10, вносили в культуру клеток VERO и инкубировали в течение 48 ч при 37°C. Титр ВПГ-1 выражали как lgТЦД<sub>50</sub>/мл. В качестве контроля использовали вирусную суспензию в питательной среде ДМСИ.

**Противовирусная активность нанокомпозитов.** Противовирусную активность образцов изучали на клетках VERO, инфицированных ВПГ-1. Клетки VERO (10<sup>5</sup> клеток/мл) в питательной среде ДМСИ, содержащей 10% ЭТС, высевали в 96-луночные планшеты (100 мкл на лунку) и инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и 100%-ной влажности.

**Профилактический режим.** После получения ~80% монослоя среду удаляли, а исследуемые образцы Ans~ON (2 мкМ или 5 мкМ в расчете на ON) добавляли в лунки в 100 мкл ДМСИ, содержащей 2% ЭТС. В качестве контроля использовали среду ДМСИ без добавления исследуемого образца. После инкубации клеток (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, влажность 100%, 4 ч) добавляли суспензию ВПГ-1; множественность инфицирования (MOI, multiplicity of infection) составляла 0,001 ТЦД<sub>50</sub>/кл. Клетки инкубировали в течение 48 ч в тех же условиях. Вирусингибирующий эффект исследованных образцов выражали в lgТЦД<sub>50</sub>/мл.

**Лечебный режим.** После достижения ~80%-го монослоя клеток VERO среду удаляли и к клеткам добавляли суспензию ВПГ-1 в среде ДМСИ, содержащей 2% ЭТС, в объеме 100 мкл/лунку (MOI 0,001 ТЦД<sub>50</sub>/кл). После инкубации в стандартных условиях в течение 1 ч исследуемые образцы (2 мкМ или 5 мкМ в расчете на ON) добавляли в лунки в 100 мкл ДМСИ. Титр вируса оценивали через 48 ч, как описано выше для профилактического режима.

**Оценка значений 50%-ной токсической концентрации (ТС<sub>50</sub>) и 50%-ной эффективной концентрации (IC<sub>50</sub>) для Ans~ON.** Цитотоксичность и противовирусную эффективность исследуемых образцов оценивали колориметрическим методом по опти-

ческой плотности раствора красителя, поглощаемого живыми клетками в монослой [14].

Для оценки *цитотоксичности* исследуемые образцы в среде ДМСИ (0,1 мл, 0,025–50,0 мкМ для ON) вносили в лунки 96-луночных планшетов с клетками VERO. Контролем служили клетки в среде ДМСИ. После инкубации клеток (48 ч, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) среду удаляли и МТТ-краситель (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолийбромид) в буфере (фосфатная соль Дульбекко; 0,75 мл, 1 мг/мл) вносили в каждую лунку. После инкубации клеток (90 мин, 37°C) раствор красителя удаляли, добавляли диметилсульфоксид (0,1 мл) и через 10 мин измеряли оптическое поглощение в каждой лунке на спектрофотометре Emax (Molecular Devices, США) при 540 нм, что является показателем количества жизнеспособных клеток в монослой.

**Противовирусную активность** образцов изучали в лечебном режиме. Клетки VERO в монослой на 96-луночных планшетах инфицировали вирусосодержащей жидкостью (0,1 мл) при MOI 0,001 ТЦД<sub>50</sub>/кл. После адсорбции вируса (1 ч) вирусосодержащую жидкость удаляли и в каждую лунку добавляли исследуемые образцы (0,1 мл; 0,025–3 мкМ в расчете на ON). В качестве контроля использовали клетки, к которым не добавляли образец в ДМСИ. После инкубации клеток (48 ч, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) культуральную среду удаляли. Цитопатическое действие образцов оценивали по жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста, как описано выше. Значения ТС<sub>50</sub> и IC<sub>50</sub> для каждого образца рассчитаны с помощью компьютерной программы SoftMaxPro-4.0 из зависимости оптического поглощения от концентрации исследуемого образца.

**Статистический анализ** проводили с использованием программы Statistica 12. Титр вируса в контроле и эксперименте рассчитывали по методу Спирмена–Кербера и выражали в lgТЦД<sub>50</sub>/мл. Различия между результатами с экспериментальными и контрольными образцами считались статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

**Синтез нанокомпозитов Ans~ON.** Ранее мы продемонстрировали успешное использование TiO<sub>2</sub>-наночастиц для доставки ON в клетки. Показано, что ON-содержащие нанокомпозиты на основе таких наночастиц эффективно подавляют репликацию вируса гриппа A *in vitro* [11, 15] и *in vivo* [16, 17]. Нанокомпозиты этого типа использовались также для коррекции артериальной гипертензии на модели крыс НИСАГ (крыс с наследуемой индуцируемой стрессом артериальной гипертензией) [18].

В настоящей работе мы использовали тот же подход для подавления репликации ВПГ-1. Для получения ON-содержащих нанокомпозитов мы

использовали TiO<sub>2</sub>-наночастицы в кристаллической форме анатаза [11]. Наночастицы были предварительно покрыты PL с последующей иммобилизацией ON за счет электростатического взаимодействия между отрицательно заряженными межнуклеотидными фосфатными группами ON и положительно заряженными аминоклассами полилизина. Таким образом были получены наноконпозиты Ans~ON [11].

**Выбор эффективного ON для ингибирования репликации ВПГ-1.** Эффективность использования антисмысловых ON зависит не только от их успешной доставки в клетки, но и от выбора подходящей мишени в геноме вируса. Мишенями обычно являются мРНК, которые соответствуют сайтам инициации трансляции или сайтам сплайсинга непосредственно ранних генов ВПГ-1. ON может связываться с комплементарным участком мРНК гена-мишени, что приводит либо к механическому блокированию мРНК, либо к ее деградации под действием РНКазы Н. Связывание с сайтами сплайсинга может модулировать альтернативный сплайсинг, что приводит к появлению различных вариантов белка. В обоих случаях ингибируется экспрессия соответствующего гена [19].

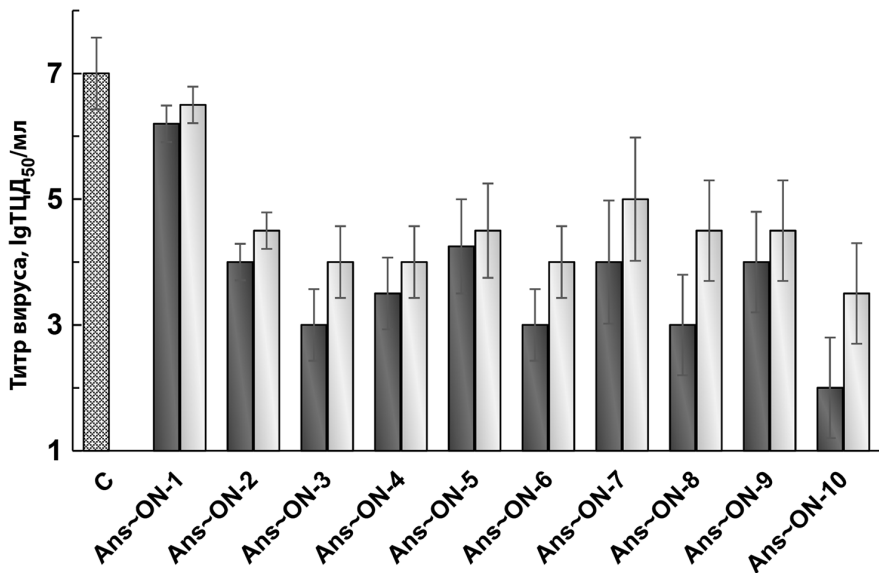
На основе анализа литературных данных [20] мы выбрали девять олигонуклеотидных последовательностей (ON-2 – ON-10), которые показали 90%-ное подавление репликации ВПГ-1. В качестве контрольного ON использовали ON-1, некомплементарный вирусному геному.

- 5'-ACGAGCGTGTACTTCTGCG (ON-1) [21];
- 5'-GCGGGGCTCCATGGGGGTCG (ON-2) [22];
- 5'-ACGAGGGCGTTCCTCCTGCG (ON-3) [21];
- 5'-ACGTTCTCCTGCGGGAA (ON-4) [23];

- 5'-GGTCGTATGCGGCTGGAGGGTTCG (ON-5) [7];
- 5'-GGTGTCGGATATGGCCTCTGGTGG (ON-6) [7];
- 5'-ACCGAGGTCCATGTGCGTACGC (ON-7) [24];
- 5'-GCGGGTGAGCCCC (ON-8) [25];
- 5'-CGTTCCTCCTGCG (ON-9) [26];
- 5'-GCCGAGGTCCATGTCGTACGC (ON-10) [5].

**Сравнение противогерпетической активности Ans~ON.** Значения МПК для наночастиц и наноконпозитов в отношении клеток VERO были оценены как 0,5 мг/мл для Ans и 0,75 мг/мл для Ans~ON. Противовирусную активность наноконпозитов Ans~ON изучали при меньших, т.е. нетоксических концентрациях (0,05–0,25 мг/мл). При этом концентрации ON в наноконпозитах Ans~ON составляли соответственно 1–5 мкМ с учетом емкости наноконпозита по ON (20 нмоль/мг).

Все исследованные наноконпозиты, содержащие ON, комплементарные различным мРНК-мишеням генома ВПГ-1, оказались достаточно эффективными. Они подавляли репликацию вируса в профилактическом режиме на 1–5 и 0,5–3,5 порядка при концентрации ON в наноконпозитах 5 мкМ и 2 мкМ соответственно (рис. 1). Наиболее активным оказался наноконпозит, содержащий ON-10, нацеленный на сайт инициации трансляции мРНК гена, кодирующего белок UL13. Важно отметить, что этот ON может быть использован для подавления не только ВПГ-1, но также вируса герпеса второго типа (ВПГ-2) благодаря гомологичным нуклеотидным последовательностям их генов-мишеней [5]. Этот ON был выбран для дальнейших исследований.



**Рис. 1.** Противовирусная активность наноконпозитов Ans~ON в отношении ВПГ-1 в профилактическом режиме. Концентрации ON в наноконпозитах составляли 5 мкМ (темные столбцы) и 2 мкМ (светлые столбцы). Титр вируса в клетках без добавления образца, С. Представленные средние значения, стандартные отклонения и различия в значениях титра вируса были рассчитаны с использованием метода Спирмена-Кербера. Разница между значениями титра в контроле и образцах с наноконпозитами при  $p \leq 0,05$ .

Наноккомпозит Ans~ON-1, содержащий ON, некомплементарный мРНК вирусного генома, оказался практически неактивным. Это указывает на избирательное действие ON, нацеленных на специфические участки вирусных мРНК.

**Вирулицидность наночастиц Ans и нанокомпозитов Ans~ON.** Мы проверили вирулицидные свойства наночастиц Ans и нанокомпозита Ans~ON-10 в бесклеточной системе. Для сравнения использовали нанокомпозит Ans~ON-1.

Титр вируса в бесклеточной системе после обработки наночастицами или нанокомпозитами практически не изменялся по сравнению с контролем (вирус без образцов) независимо от того, использовался ли в нанокомпозитах антисмысловый или контрольный ON (данные не приведены). Следовательно, ни наночастицы, ни нанокомпозиты не проявляют вирулицидных свойств в бесклеточных экспериментах даже при высоких концентрациях (20 мкМ для ON), которые значительно превышают концентрацию, приводящую к эффективному подавлению репликации вируса в клетках. Следовательно, вирус недоступен для воздействия до попадания в клетку, т.е. наночастицы не разрушают вирусную оболочку и не позволяют ON проникать внутрь вируса. Внутри клетки вирусный геном может высвободиться из вирусной оболочки, после чего его дальнейшие трансформации приводят к образованию вирусной мРНК, уязвимой для антисмысловых ON. Таким образом, только в клеточной системе ON может влиять на репликацию вируса.

**Сравнение противогерпетического действия нативных и модифицированных ON.** Для усиления биологического действия ON многие исследователи модифицируют их различными способами, что позволяет повысить устойчивость олигомеров к клеточным нуклеазам, изменить их взаимодействие с НК-мишенями, повысить способность проникать через цитоплазматическую мембрану и т.д. Мы сравнили противогерпетическую эффективность нативных и модифициро-

ванных ON при использовании нанокомпозитов Ans~ON.

Мы выбрали метилсульфонильную (мезильную) фосфамидную группу [12] для модификации сахарофосфатного остова ON-10. Эта модификация может обеспечить лучшую стабильность по отношению к клеточным нуклеазам, а также сохранение отрицательного заряда ON, необходимого для взаимодействия с аминокислотными группами полилизина при иммобилизации на наночастицах Ans/PL. Кроме того, этот тип модификации не исключает вовлечения РНКазы H в механизм действия антисмыслового ON [27].

Мы использовали ON-10a с гапмер-подобной модификацией, когда модифицированы по две межнуклеотидные группы на обоих концах ON (четыре мезил-содержащие группы), и ON-10b с полностью модифицированным остовом (20 мезил-содержащих групп). Мы также использовали гапмер-версию контрольного ON-1a.

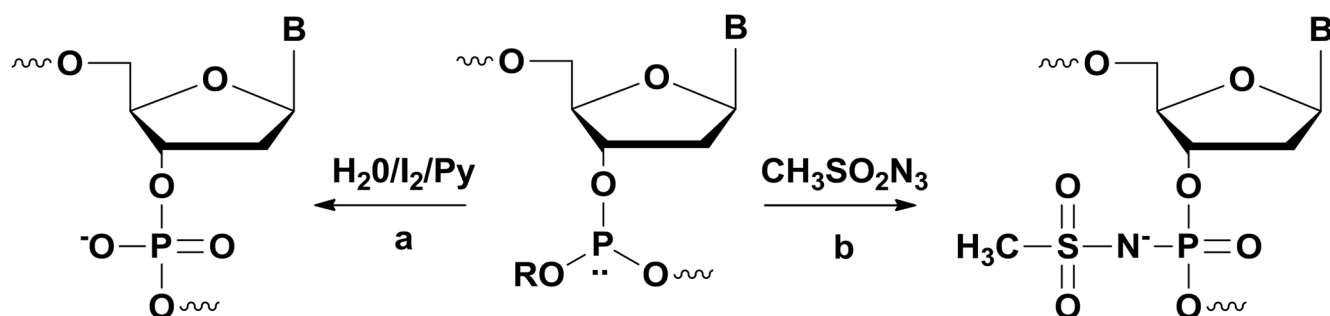
5'-G\*C\*CGAGGTCCATGTCGTAC\*G\*C ON-10a;  
5'-G\*C\*C\*G\*A\*G\*G\*T\*C\*C\*A\*T\*G\*T\*C\*  
G\*T\*A\*C\*G\*C ON-10b;

5'-A\*C\*GAGCGTGTACTTCTG\*C\*G ON-1a;

\* метилсульфонилфосфамидные (мезилфосфамидные) межнуклеотидные группы.

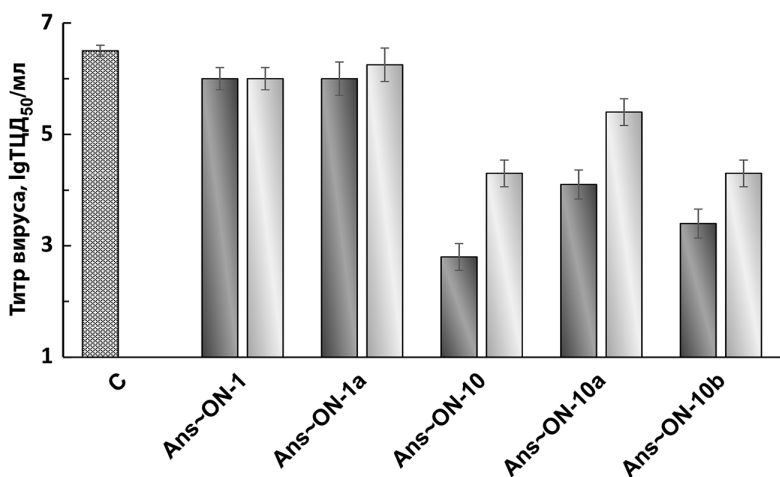
На рис. 2 представлены структуры нуклеотидного звена после автоматизированного твердофазного олигонуклеотидного синтеза, включающего обычные (а) или альтернативные (б) стадии окисления фосфиттриэфирного звена, которые приводят к образованию фосфодиэфирной или мезилфосфамидной межнуклеотидных групп соответственно.

Мы сравнили противогерпетическую активность нанокомпозитов Ans~ON-10, Ans~ON-10a и Ans~ON-10b, содержащих нативные и модифицированные ON, в лечебном режиме, который более целесообразен в практическом смысле для лечения герпеса, чем профилактический режим. Результаты представлены на рис. 3.



B – нуклеиновое основание; R – цианоэтильная группа.

**Рис. 2.** Схема автоматизированного твердофазного синтеза ON, включающего обычные (а) или альтернативные (б) стадии окисления фосфиттриэфирного звена, которые приводят к образованию фосфодиэфирной или мезилфосфамидной межнуклеотидных групп соответственно.



**Рис. 3.** Противовирусная активность нанокompозитов Ans~ON в отношении вируса ВПГ-1 в лечебном режиме. Концентрации ON в нанокompозитах составляли 2 мкМ (темные столбцы) и 1 мкМ (светлые столбцы); титр вируса в клетках без добавления образца, С. Представленные средние значения, стандартные отклонения и различия в значениях титра вируса были рассчитаны с использованием метода Спирмена-Кербера. Разница между значениями титра в контроле и образцах с нанокompозитами при  $p \leq 0,05$ .

Как и в предыдущих экспериментах, нанокompозиты, содержащие контрольные ON-1 и ON-1a, практически не подавляли репликацию вируса, что подтверждает избирательное действие антисмысловых ON. Присутствие четырех модифицирующих групп в ON-10a привело к снижению противовирусной активности, тогда как полностью модифицированный ON-10b проявил сравнимую активность с немодифицированным ON-10. При концентрации 1 мкМ подавление репликации вируса в обоих случаях произошло на два порядка, а при концентрации 2 мкМ – на 3,0 и 3,5 порядка соответственно. Вероятно, модификация всех межнуклеотидных групп компенсирует пониженную активность гапмера. Возможно, изменение схемы модификации позволит оптимизировать противовирусное действие антисмысловых ON, поскольку показано, что паттерн модификации, т.е. взаимное расположение модифицирующих групп вдоль олигонуклеотидной цепи, может радикально влиять на биологическую активность [28].

Таким образом, мы продемонстрировали, что модифицирующие группы в структуре ON не препятствуют проявлению их противовирусной активности. Можно предположить, что модифицированные ON будут более активны *in vivo*, как это было показано в нашей предыдущей работе [16].

**Оценка значений  $IC_{50}$ ,  $TC_{50}$  и индекса селективности (SI) для исследуемых нанокompозитов.** Для оценки токсического и противовирусного действия нанокompозитов Ans~ON-10, Ans~ON-10a и Ans~ON-10b мы использовали колориметрический метод [29], изучив жизнеспособность клеток VERO после их обработки нанокompозитами в различных концентрациях в отсутствие и в присутствии ВПГ-1 соответственно. Противовирусное действие оценивали в лечебном режиме. Значения 50%-ной токсической концентрации ( $TC_{50}$ ) и 50%-ной ингибирующей концентрации ( $IC_{50}$ ) для исследуемых нанокompозитов позволили рассчитать соответствующие значения SI ( $SI = TC_{50}/IC_{50}$ ) (таблица). Достаточно высокие значения SI позволяют рассматривать исследованные нанокompозиты в качестве антисмысловых агентов для подавления репликации ВПГ-1.

**Заключение**

Продемонстрировано успешное использование предложенных нанокompозитов, содержащих как нативные, так и модифицированные антисмысловые ON, для подавления репликации вируса ВПГ-1. Наиболее эффективный нанокompозит, содержащий ON, нацеленный на удачно выбранную мишень в геноме ВПГ-1, снижал репликацию вируса в культуре клеток на 3,5 порядка при концентрации 2 мкМ. Индекс селективности этого нанокompозита был оценен как ~100 в лечебном режиме.

Авторы благодарны докт. С. Яшник (Институт Катализа СО РАН) за предоставление наночастиц TiO<sub>2</sub>. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №23-24-00184). Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Таблица

Значения  $TC_{50}$ ,  $IC_{50}$  и SI для исследованных нанокompозитов

| Образец    | $TC_{50}$ , мкМ <sup>a)</sup> | $IC_{50}$ , мкМ <sup>a)</sup> | SI    |
|------------|-------------------------------|-------------------------------|-------|
| Ans~ON-10  | 25,6                          | 0,28                          | 91,4  |
| Ans~ON-10a | 24,1                          | 0,34                          | 72,0  |
| Ans~ON-10b | 16,4                          | 0,15                          | 111,6 |

Концентрации (мкМ) для ON в нанокompозитах.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Belikova A.M., Zarytova V.F., Grineva N.I. Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues. *Tetrahedron Lett.* 1967;8(37):3557–3562.
2. Zamecnik P., Stephenson M. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1978;75(1):280–284.
3. Amado D.A., Davidson B.L. Gene therapy for ALS: A review. *Mol. Ther.* 2021;29(12):3345–3358.
4. Kulkarni J.A., Witzigmann D., Chen S., Cullis P.R., van der Meel R. Lipid nanoparticle technology for clinical translation of siRNA therapeutics. *Acc. Chem. Res.* 2019;52(9):2435–2444.
5. Draper K.G., Ecker D.J., Mirabelli C.K., Crooke S.T. Oligonucleotide therapies for modulating the effects of herpesviruses. Patent US 6310044 B1, 2001;30.10.2001.
6. Eide K., Moerdyk-Schauwecker M., Stein D.A., Bildfell R., Koelle D.M., Jin L. Reduction of herpes simplex virus type-2 replication in cell cultures and in rodent models with peptide-conjugated morpholino oligomers. *Antivir. Ther.* 2010;15(8):1141–1149.
7. Moerdyk-Schauwecker M., Stein D.A., Eide K., Blouch R.E., Bildfell R., Iversen P., Jin L. Inhibition of HSV-1 ocular infection with morpholino oligomers targeting ICP0 and ICP27. *Antiviral Res.* 2009;84(2):131–141.
8. Weng Y., Huang Q., Li C., Yang Y., Wang X., Yu J., Huang Y., Liang X.J. Improved nucleic acid therapy with advanced nanoscale biotechnology. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2020;19(1):581–601.
9. Haghighi F.H., Mercurio M., Cerra S., Salamone T.A., Bianymotlagh R., Palocci C., Spica V.R., Fratoddi I. Surface modification of TiO<sub>2</sub> nanoparticles with organic molecules and their biological applications. *J. Mater. Chem. B.* 2023;11(11):2334–2366.
10. Chelobanov B.P., Repkova M.N., Bayborodin S.I., Ryabchikova E.I., Stetsenko D.A. Nuclear delivery of oligonucleotides via nanocomposites based on TiO<sub>2</sub> nanoparticles and polylysine. *Mol. Biol. (Mosc.)*. 2017;51(5):797–808.
11. Levina A.S., Repkova M.N., Shatskaya N.V., Zarytova V.F., Ismagilov Z.R., Shikina N.V., Zagrebelnyi S.N., Baiborodin S.I. Design of TiO<sub>2</sub>-DNA nanocomposites for penetration into cells. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2013;39(1):77–86.
12. Zharkov T.D., Markov O.V., Zhukov S.A., Khodyreva S.N., Kupryushkin M.S. Influence of combinations of lipophilic and phosphate backbone modifications on cellular uptake of modified oligonucleotides. *Molecules*. 2024;29(2):452.
13. 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.
14. Smee D.F., Morrison A.C., Barnard D.L., Sidwell R.W. Comparison of colorimetric and visual methods for determining anti-influenza (H1N1 and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. *J. Virol. Methods*. 2002;106(1):71–79.
15. Levina A.S., Repkova M.N., Bessudnova E.V., Filipova E.I., Zarytova V.F. High antiviral effect of TiO<sub>2</sub>-PL-DNA nanocomposites targeted to conservative regions of (–)RNA and (+)RNA of influenza A virus in cell culture. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2016;7(4):1166–1173.
16. Levina A., Repkova M., Shikina N., Ismagilov Z., Kupryushkin M., Pavlova A., Mazurkova N., Pyshnyi D., Zarytova V. Pronounced therapeutic potential of oligonucleotides fixed on inorganic nanoparticles against highly pathogenic H5N1 influenza A virus *in vivo*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2021;162:92–98.
17. Repkova M.N., Levina A.S., Ismagilov Z.R., Mazurkova N.A., Mazurkov O.Ju., Zarytova V.F. Effective inhibition of newly emerged A/H7N9 virus with oligonucleotides targeted to conserved regions of the virus genome. *Nucleic Acid Ther.* 2021;31(6):436–442.
18. Repkova M.N., Levina A.S., Seryapina A.A., Shikina N.V., Bessudnova E.V., Zarytova V.F., Markel A.L. Toward gene therapy of hypertension: experimental study on hypertensive ISIAH rats. *Biochemistry (Mosc.)*. 2017;82(4):454–457.
19. Shen X., Corey D.R. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(4):1584–1600.
20. Levina A.S., Repkova M.N., Zarytova V.F. Therapeutic nucleic acids against Herpes simplex viruses (a review). *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2023;49(6):1243–1262.
21. Shoji Y., Norimatsu M., Shimada J., Mizushima Y. Limited use of cationic liposomes as tools to enhance the antiherpetic activities of oligonucleotides in Vero cells infected with herpes simplex virus Type 1. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 1998;8(4):255–263.
22. Birch-Hirschfeld E., Knorre C.M., Stelzner A., Schmidtke M. Antiviral activity of antisense oligonucleotides against various targets of herpes simplex virus 1 (Hsv1) and Cocksackievirus B3 (Cvb3) genome. *Nucleos. Nucleot.* 1997;16(5–6):623–628.
23. Blumenfeld M., Meguenni S., Poddevin B., Vasseur M. Antisense oligonucleotides against herpes simplex virus types 1 and 2. Patent WO1995004141A1, 1995;09.02.1995.
24. Hoke G.D., Draper K., Freier S.M., Gonzalez C., Driver V.B., Zounes M.C., Ecker D.J. Effects of phosphorothioate capping on antisense oligonucleotide stability, hybridization and antiviral efficacy versus herpes simplex virus infection. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(20):5743–5748.
25. Shoji Y., Ishige H., Tamura N., Iwatani W., Norimatsu M., Shimada J., Mizushima Y. Enhancement of anti-Herpetic activity of antisense phosphorothioate oligonucleotides 5'-end modified with geraniol. *J. Drug Target.* 1998;5(4):261–273.
26. Vinogradov S.V., Suzdaltseva Y., Alakhov V.Y., Kabanov A.V. Inhibition of herpes simplex virus 1 reproduction with hydrophobized antisense oligonucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994;203(2):959–966.
27. Miroshnichenko S.K., Patutina O.A., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fokina A.A., Vlassov V.V., Altman S., Zenkova M.A., Stetsenko D.A. Methyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2019;116(4):1229–1234.
28. Kandasamy P., McClorey G., Shimizu M., et al. Control of backbone chemistry and chirality boost oligonucleotide splice switching activity. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(10):5443–5466.

Поступила в редакцию 12.08.2024

После доработки 28.11.2024

Принята в печать 03.12.2024

## RESEARCH ARTICLE

# Effective in vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication by oligonucleotide-containing nanocomposites

M.N. Repkova<sup>1</sup> , V.F. Zarytova<sup>1</sup> , O.Yu. Mazurkov<sup>2</sup> , **N.A. Mazurkova<sup>2</sup>** ,  
E.V. Makarevich<sup>2</sup> , E.I. Filippova<sup>2</sup> , M.D. Nekrasov<sup>1</sup> ,  
M.S. Kupryushkin<sup>1</sup> , A.S. Levina<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*

The control of herpesvirus infections is a pressing public health issue because of the widespread prevalence of herpes simplex virus (HSV), which causes a variety of diseases ranging from mild primary skin lesions to severe and sometimes fatal encephalitis. The use of antisense oligonucleotides (ONs) to suppress HSV replication is a promising development in this field. To overcome one of the major obstacles in delivering ONs into cells, we have prepared nanocomposites, which are composed of antisense oligonucleotides immobilized on titanium dioxide nanoparticles in the form of anatase (Ans-ON). We have investigated the antiviral activity of several nanocomposites bearing oligonucleotides targeting different regions of the HSV-1 genome. Unmodified oligonucleotides and oligonucleotides with methylsulfonyl phosphoramidate internucleotide groups have been used in the work. The most effective nanocomposites reduced virus replication in the cell culture by 3–3.5 orders of magnitude. The selectivity index values of these nanocomposites have been evaluated as 90–110 in the post-infection mode.

**Keywords:** *nanocomposites; antisense oligonucleotides; TiO<sub>2</sub> nanoparticles (anatase); antiviral effect, herpes simplex virus*

**Funding:** The research was funded by the Russian Science Foundation, project number 23-24-00184.

## 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>

*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>

*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>

**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>

*Макаревич Елена Викторовна* — канд. биол. наук, науч. сотр. ГНЦ ВБ «Вектор». Тел.: 8-383-363-47-00; e-mail: elenasazmakarevich@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5146-8979>

*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>

*Некрасов Михаил Дмитриевич* — науч. сотр. ИХБФМ СО РАН. Тел.: 8-383-363-51-23; e-mail: shuenja@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6510-499X>

*Купрюшкин Максим Сергеевич* — канд. хим. наук, ст. науч. сотр. ИХБФМ СО РАН. Тел.: 8-383-363-51-23; e-mail: kuprummax@niboch.nsc.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2300-7809>

*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>