

Оригинальная статья / Original article

УДК 578.7; 578.828;615.281.8

DOI: 10.18470/1992-1098-2024-4-5



Противовирусная активность модифицированных олигонуклеотидов в лимфоидных клетках человека, инфицированных ВИЧ-1

Людмила Г. Готфрид¹, Анна С. Павлова², Максим С. Купрюшкин²,
Инна А. Пышная², Наталья М. Гашникова¹

¹ФБУН Центр Роспотребнадзора «Вектор», Кольцово, Россия

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Контактное лицо

Людмила Г. Готфрид, м.н.с., ФБУН ГНЦ ВБ
«Вектор» Роспотребнадзора; 630559 Россия,
рп. Кольцово, Новосибирская область.

Тел. +79134506795

Email gotfrid_lg@vector.nsc.ru

ORCID <https://orcid.org/0000-0001-5896-8231>

Формат цитирования

Готфрид Л.Г., Павлова А.С., Купрюшкин М.С.,
Пышная И.А., Гашникова Н.М. Противовирусная
активность модифицированных
олигонуклеотидов в лимфоидных клетках
человека, инфицированных ВИЧ-1 // Юг России:
экология, развитие. 2024. Т.19, N 4. С. 57-67.
DOI: 10.18470/1992-1098-2024-4-5

Получена 29 июня 2024 г.

Прошла рецензирование 24 августа 2024 г.

Принята 15 октября 2024 г.

Резюме

Цель – исследовать способность к проникновению в клетки и антиретровирусные свойства модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов, направленных на высоко консервативные участки генома ВИЧ-1. Исследование проводили с использованием модифицированных олигонуклеотидов, содержащих тиофосфатные, фосфорилгуанидиновые или додецильные остатки.

Изучение способности олигонуклеотидов к ингибированию вируса было проведено с использованием модели лимфоидной культуры клеток человека MT4, инфицированных охарактеризованным высокопродуктивным штаммом ВИЧ-1, относящимся к геноварианту субтипа А6, широко распространенного на территории Российской Федерации. Оценку проникновения олигонуклеотидов в клетки MT4 проводили методом конфокальной микроскопии.

Показано, что тиофосфат- и додецил-содержащие олигонуклеотиды способны проникать внутрь клеток без использования каких-либо дополнительных трансфецирующих агентов. Установлено, что тиофосфатные олигонуклеотиды, трансфецированные в составе дуплекса с додецил-содержащими производными, локализуются внутри клетки в ядре и ядрышке и способны подавлять репродукцию высокопродуктивного штамма ВИЧ-1. Для исследованных олигонуклеотидных производных определены 50%-ная токсичная доза (ТС50) и 50%-ная ингибирующая концентрация (IC50), значение которой в случае тиофосфатных олигонуклеотидов составило менее 0,5 мкМ.

Полученные данные свидетельствуют о возможности использования исследованных модифицированных олигонуклеотидов в качестве потенциальных противовирусных агентов в отношении ВИЧ-1.

Ключевые слова

ВИЧ, модифицированные олигонуклеотиды, доставка олигонуклеотидов, антиретровирусная активность модифицированных олигонуклеотидов.

Antiviral activity of modified oligonucleotides in human lymphoid cells infected with a strain of HIV-1

Ludmila G. Gotfrid¹, Anna S. Pavlova², Maxim S. Kupryushkin²,

Inna A. Pyshnaya² and Natalya M. Gashnikova¹

¹Vector State Research Centre of Virology and Biotechnology, Rospotrebnadzor, Koltsovo, Russia

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Principal contact

Ludmila G. Gotfrid, Junior Researcher, Vector State Research Centre of Virology and Biotechnology, ABK 12A, Koltsovo, Novosibirsk Oblast, Russia 630559.

Tel. +79134506795

Email gotfrid_lg@vector.nsc.ru

ORCID <https://orcid.org/0000-0001-5896-8231>

How to cite this article

Gotfrid L.G., Pavlova A.S., Kupryushkin M.S., Pyshnaya I.A., Gashnikova N.M. Antiviral activity of modified oligonucleotides in human lymphoid cells infected with a strain of HIV-1. *South of Russia: ecology, development*. 2024; 19(4):57-67. (In Russ.) DOI: 10.18470/1992-1098-2024-4-5

Received 29 June 2024

Revised 24 August 2024

Accepted 15 October 2024

Abstract

Aim. To investigate the cell entry and antiretroviral properties of modified oligodeoxyribonucleotides targeting highly conserved regions of the HIV-1 genome: the study was conducted using modified oligonucleotides containing phosphorothioate, phosphorylguanidine or dodecyl moieties.

The ability of oligonucleotides to inhibit the virus was studied using a model of lymphoid culture of human MT4 cells infected with a characterised high-productive strain of HIV-1 belonging to the subtype A6 genovariant widely spread in the Russian Federation. The entry of oligonucleotides into MT4 cells was assessed by confocal microscopy.

It was shown that phosphorothioate- and dodecyl-containing oligonucleotides are able to penetrate inside cells without the use of any additional transfection agents. It was found that phosphorothioate oligonucleotides transfected in duplex with dodecyl-containing derivatives were localized inside the cell in the nucleus and nucleolus and were able to inhibit the reproduction of a highly productive HIV-1 strain. A 50% toxic dose (TC50) and a 50% inhibitory concentration (IC50) were determined for the oligonucleotide derivatives studied, the value of which was less than 0,5 µM in the case of phosphorothioate oligonucleotides.

The data obtained indicate the ability of the modified oligonucleotides studied to be used as potential antiviral agents against HIV-1.

Key Words

HIV, modified oligodeoxyribonucleotides, oligonucleotides delivery, antiretroviral activity of modified oligonucleotides.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для лечения ВИЧ-инфекции применяют комбинированную антиретровирусную терапию, которая направлена на подавление репродукции вируса в организме человека до неопределяемого уровня РНК ВИЧ-1 в плазме крови (АРВП). Данная терапия продлевает жизнь пациента, но не в состоянии полностью избавить организм от вируса, который сохраняется в клетках в латентном состоянии. При этом применяемые препараты требуют обязательного пожизненного приема, который может включать в себя комбинации из двух, трех или более средств, направленных на разные этапы жизненного цикла вируса. Возможные побочные эффекты и, как следствие, низкая приверженность пациентов к терапии в комплексе со способностью обратной транскриптазы вируса к формированию мутаций могут приводить к образованию и распространению резистентных форм ВИЧ, не поддающихся лечению [1]. Все это делает поиск других антиретровирусных препаратов актуальным и требует изучения новых подходов к лечению пациентов с ВИЧ-инфекцией.

Известны различные подходы к использованию олигонуклеотидов (ОН) как средств генной терапии для борьбы с ВИЧ-инфекцией [2–4]. Комплексные терапевтические препараты против ВИЧ, имея разные мишени и механизмы реализации противовирусного действия, показывают высокую эффективность подавления репликации резистентных к современным АРВП ВИЧ-1 разных генетических вариантов вируса [5].

С развитием научных технологий появляются новые знания о полной структуре генома ВИЧ-1 с учетом сложной совокупности меж- и внутримолекулярных взаимодействий, которые являются важными медиаторами отдельных этапов его воспроизводства: репликации, ядерно-цитоплазматического транспорта, трансляции, димеризации, упаковки. Понимание множества последовательных взаимодействий РНК-РНК и РНК-белок позволяют определять новые мишени для воздействия на составляющие вируса с помощью малых молекул, пептидов, олигонуклеотидов [6–8].

Целью настоящей работы было исследование способности модифицированных ОН, направленных на высоко консервативные участки генома ВИЧ-1, к проникновению внутрь клеток без использования дополнительных трансфецирующих агентов и ингибированию репродукции вируса на модели культуры клеток человека МТ-4, инфицированной высокопродуктивным штаммом ВИЧ-1 геноварианта А6, широко распространенного на территории России.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточная культура МТ-4 получена из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Клетки МТ-4 культивировали на среде RPMI-1640, содержащей 0,2 % бикарбоната натрия с добавлением 10 % инактивированной фетальной сыворотки, 2 мМ L-глутамин и 20 мкг/мл гентамицина в закрытой культуральной посуде в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С и 5 % CO₂. Посадочная концентрация составляла 500 000 клеток на 1 мл среды.

В работе использовали штамм ВИЧ-1 субтипа А (при репродукции на МТ-4 вызывает 100 % гибель клеток) из лабораторной коллекции ФБУН ГНЦ ВБ

«Вектор» Роспотребнадзора. ВИЧ-1 предварительно нарабатывали на культуре клеток МТ-4 с концентрацией 400 000 клеток в 1 мл среды. Урожай инфекционного вируса получали на 5 сутки культивирования. Культуральную среду отбирали, клеточный дебрис удаляли центрифугированием, а супернатант разливали в криопробирки по 0,5–1,0 мл, замораживали при -70 °С и хранили в жидком азоте до использования.

Определение инфекционности наработанного вируса (TCID₅₀) проводили на 96-луночном планшете. Для тестирования использовали клетки МТ-4 в фазе логарифмического роста. Клетки в полной ростовой среде RPMI-1640 с концентрацией 300 000 в 1 мл разливали по лункам планшета в объеме 100 мкл. Вирус размораживали на водяной бане при 37 °С и готовили его последовательные разведения в отдельной посуде на среде RPMI-1640. Затем приготовленные разведения вируса (в 3-х повторях) в объеме 100 мкл добавляли в соответствующие лунки планшета с культурой клеток.

Далее инфицированные клетки на планшете культивировали в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °С и 5 % CO₂. Определение концентрации вирусного белка р24 в культуральной жидкости проводили на 5 сутки культивирования. TCID₅₀ вируса определяли методом Рида – Менча [9].

Исследование способности олигонуклеотидов к проникновению в клетки проводили на суспензионной культуре МТ-4. Конечная концентрация олигонуклеотидов в культуральной среде составляла 2 мкМ. Клеточную суспензию вносили в объеме 300 мкл на один колодец плашки (Eppendorf Cell Imaging Coverglass). Проводили трансфекцию в течение 16 часов с последующей отмывкой и фиксацией на плашках с помощью полилизина. После фиксации на полилизине (12 часов) культуральную среду из колодцев аккуратно удаляли и фиксировали монослой клеток охлажденным 4% параформальдегидом (400 мкл на колодец) в течение 20 минут. После удаления фиксирующего раствора в колодцы заливали фосфатный буфер (рН 7,2). Микроскопическое исследование проводили на лазерном сканирующем микроскопе LSM 780 NLO (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Для визуализации общего вида клеток использовали систему DIC контраста в проходящем свете. Клеточные ядра окрашивали с помощью DAPI (Servicebio, Китай). Для детекции клеточных ядер использовали лазер с длиной волны 405 нм. Для детекции олигонуклеотидов, меченных 6-карбоксихлорофлуоресцеином (FAM), использовали лазер с длиной волны 488 нм. Для получения и обработки изображений использовали программное обеспечение ZEN2010 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

Синтез олигонуклеотидов, в том числе содержащих тиофосфатные (^S, Рисунок 1) и фосфорилгуанидиновые модификации (^X, Рисунок 1), а также их производных с остатками додецил-содержащего нуклеотидного мономерного звена ([Dcy], Рисунок 1) и флуоресцентного красителя FAM (Рисунок 1), проводили твердофазным амидофосфитным методом на автоматическом НК-синтезаторе ACM-800 («Биоссет», Россия) с использованием реагентов и протоколов, в том числе постсинтетической очистки, описанных ранее [10; 11].

Растворы олигонуклеотидов и их дуплексов готовили разбавлением до указанных концентраций из стоковых растворов непосредственно перед тестированием. Препараты состояли из (i) одноцепочечных олигонуклеотидов (оцОН) или (ii) их дуплексов с додецил-содержащими производными. Дуплексы готовили, смешивая оцОН с соответствующим комплементарным ему додецил-содержащим производным (1:1), затем добавляли PBS (10x) из расчета 10 % к конечному объему смеси. Далее смесь нагревали 3 мин при 90 °С и охлаждали до комнатной температуры.

Исследование противовирусной активности олигонуклеотидов проводили на суспензионной культуре клеток МТ-4 в отношении российского штамма ВИЧ-1 субтипа А6. Серии разведений оцОН или их дуплексов (в трех повторах) переносили на 96-ти луночный планшет, предварительно засеянный клетками. Инкубация олигонуклеотидов с клетками МТ-4 до внесения ВИЧ-1 составляла 24 часа. Через 24 часа культуру клеток инфицировали постоянной дозой вируса, соответствующей 300 TCID₅₀. Инкубация с вирусом составляла 5 суток в CO₂ инкубаторе при температуре 37 °С и 5 % CO₂. В конце инкубации вируса с препаратами отбирали пробы культуральной среды для количественного исследования белка р24 методом иммуноферментного анализа (ИФА), данные собирали для трех независимых постановок, приведенные в статье значения представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение.

Определение цитотоксичности исследуемых ОН препаратов методом МТТ-теста проводили на 96-луночном планшете. В лунки планшета вносили по 40 000 клеток МТ-4 в 100 мкл полной ростовой среды RPMI-1640. Титрование ОН производили с шагом разведения – три, по 3 повтора для каждого ОН, которые добавляли в соответствующие лунки планшета с культурой клеток. Инкубацию клеток МТ-4 с исследуемыми разведениями ОН проводили 5 суток в CO₂ инкубаторе при температуре 37 °С и 5 % CO₂. После этого в каждую лунку с образцами ОН и в контроль клеток добавляли раствор МТТ-реагента в объеме 20 мкл. Через 2 часа дополнительного инкубирования в термостате из лунок планшета удаляли культуральную среду, а образовавшийся осадок формазана растворяли в изопропанолу при встряхивании в течение 30 минут. После растворения кристаллов в изопропанолу интенсивность синего окрашивания измеряли с помощью спектрофотометра (Varioscanner LUX, Thermo Fisher Scientific, США) на двух длинах волн (540 и 690 нм). Жизнеспособность клеток оценивали по интенсивности превращения ими растворимого МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) в кристаллы формазана.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основе изучения полиморфизма нуклеотидной последовательности генома ВИЧ-1 с учетом функциональной значимости областей генома были выбраны консервативные районы вируса – потенциальные мишени для воздействия, расположенные в гене *pol* (фрагменты областей, кодирующих интегразу и обратную транскриптазу вируса), в области праймер-связывающего сайта (*Pbs*), в гене *gag* ВИЧ-1. В Таблице 1 приведены последовательности олигонуклеотидов, направленные на данные участки генома ВИЧ-1.

На первом этапе были синтезированы и исследованы 21-22-звенные олигодезоксирибонуклеотиды, направленные на участки генома ВИЧ-1, кодирующие фермент интегразу, под номерами I, II, III (Таблица 1). В качестве средств доставки данных олигонуклеотидов внутрь клеток использовали соответствующие комплементарные им короткие 13-звенные олигонуклеотиды, содержащие три додецильных остатка ([DcyI], Рисунок 1) в своей структуре: **DI**, **DII**, **DIII** (Таблица 1).

Противовирусная активность олигонуклеотидов была изучена на клетках человека МТ-4, инфицированных ВИЧ-1, определены показатели 50 % ингибирующей концентрации (IC₅₀), как описано в материалах и методах (Таблица 2).

По результатам исследований наилучшие показатели IC₅₀ ВИЧ-1 концентрации были выявлены для ОН III (Таблица 2). Основываясь на полученных данных, на следующем этапе был осуществлен синтез олигонуклеотида III, содержащего различные модификации, для сравнительного изучения их противовирусной активности:

- олигодезоксирибонуклеотид, на 3'-конец которого были введены две фосфорилгуанидиновые модификации (Рисунок 1, X) для повышения устойчивости ОН к действию нуклеаз [12] (**III(O)**, Таблица 1);

- гапмерный олигодезоксирибонуклеотид, который содержит по семь фосфорилгуанидиновых модификаций с 5'- и 3'-концов (**III(XOX)**, Таблица 1);

- полностью модифицированный фосфорилгуанидиновый ОН, содержащий два дополнительных тимидина на 5'-конце, присоединенных посредством фосфодиэфирных связей для лучшей растворимости ОН в воде (**III(X)**, Таблица 1);

- полностью тиофосфат-модифицированный (Рисунок 1, S) олигодезоксирибонуклеотид (**III(S)**, Таблица 1), поскольку известно, что наличие тиофосфатных модификаций способствует проникновению ОН внутрь различных клеток [13–19];

- олигорибонуклеотид, содержащий как 2'-ОМЕ модификации на протяжении всего остова, так и две фосфорилгуанидиновые модификации на 3'-конце (**III(OME)**, Таблица 1).

Согласно полученным результатам, среди данных исследованных производных наилучшую активность в ингибировании ВИЧ-1 проявил ОН III(S) (Таблица 2).

Помимо ОН производных, направленных на фермент интегразу, далее были синтезированы 35-звенные олигодезоксирибонуклеотиды **R** и **RS** (Таблица 1), направленные на ингибирование обратной транскриптазы ВИЧ-1. В олигодезоксирибонуклеотид **R** на 3'-конец были введены две фосфорилгуанидиновые модификации для защиты от нуклеаз, а на 5'-конец были присоединены три додецильных остатка для улучшения проникновения в клетки. Также был синтезирован его тиофосфатный аналог **RS**. Исследование противовирусной активности **R** и **RS** показало, что ОН **RS** обладает схожей активностью с **III(S)** (Таблица 2), тогда как для **R** значение IC₅₀ было больше, чем в 2 раза, в сравнении с таковым для **RS**.

Ввиду этого на следующем этапе работы мы синтезировали 20- и 30-звенные тиофосфатные производные, нуклеотидная последовательность которых была направлена на консервативные участки генома ВИЧ-1 в области праймер-связывающего сайта (*Pbs*) для

обратной транскрипции и гена *gag*: **PbS-1**, **PbS-2**, **Gag-1** и **Gag-2** (Таблица 1). Было получено, что наименьшее значение IC50 характерно для ОН **Gag-2** (Таблица 2). Кроме этого, было отмечено, что более протяженные

ОН, направленные на один и тот же участок генома ВИЧ-1, имеют более высокую эффективность в ингибировании ВИЧ-1 в сравнении со своими укороченными вариантами.

Таблица 1. Последовательности олигодезоксирибонуклеотидов**, исследованных в данной работе

Table 1. Sequences of oligodeoxyribonucleotides** studied in this work

Обозначение олигонуклеотида Oligonucleotide designation	Последовательность 5'-3' Sequence 5'-3'
Олигонуклеотидные производные, направленные на консервативные участки генома ВИЧ-1 в области экспрессии фермента интегразы: Oligonucleotide derivatives targeting conserved regions of the HIV-1 genome in the integrase enzyme expression domain:	
I	CCAATCCCCCTTTTCTTTAA-NH ₂
II	AATACTGCCATTTGTACTGCT-NH ₂
III	CTTGACTTTGGGGATTGTAGGG-NH ₂
Олигонуклеотидные производные для доставки I, II, III в клетки: Oligonucleotide derivatives for delivery of I, II, III into cells:	
DI	T[Dcy][Dcy][Dcy]TAAAAGAAAAGGG
DII	T[Dcy][Dcy][Dcy]AGCAGTACAAATG
DIII	T[Dcy][Dcy][Dcy]CTACAATCCCCAA
Олигонуклеотидные производные на основе последовательности III, содержащие различные комбинации модификаций: Sequence III-based oligonucleotide derivatives containing various combinations of modifications:	
III(O)	CTTGACTTTGGGGATTGTAG ^X G ^X G
III(XOX)	C ^X T ^X T ^X G ^X A ^X C ^X T ^X TTGGGGATT ^X G ^X T ^X A ^X G ^X G ^X G
III(X)	TTCT ^X T ^X G ^X A ^X C ^X T ^X T ^X G ^X G ^X G ^X A ^X T ^X G ^X T ^X A ^X G ^X G ^X G
III(S)	C ^S T ^S T ^S G ^S A ^S C ^S T ^S T ^S G ^S G ^S G ^S A ^S T ^S T ^S G ^S A ^S G ^S G ^S G
III(OMe)	<i>CUUGACUUUGGGGAUUGUAG^XG^XG</i>
Олигонуклеотидные производные, направленные на консервативный участок генома ВИЧ-1 в области экспрессии фермента обратной транскриптазы: Oligonucleotide derivatives targeting a conserved region of the HIV-1 genome in the reverse transcriptase enzyme expression domain:	
R	T[Dcy][Dcy][Dcy]CCTCCAATCCCCCTATCATTTTTGGTTCC ^X A ^X T
RS	C ^S C ^S T ^S C ^S A ^S A ^S T ^S C ^S C ^S C ^S C ^S T ^S A ^S T ^S C ^S A ^S T ^S T ^S T ^S G ^S T ^S T ^S C ^S A ^S T
Олигонуклеотидные производные, направленные на консервативные участки генома ВИЧ-1 в области праймер-связывающего сайта для обратной транскрипции и гена <i>gag</i>: Oligonucleotide derivatives targeting conserved regions of the HIV-1 genome in the primer-binding site region for reverse transcription and the <i>gag</i> gene:	
PbS-1	G ^S T ^S C ^S C ^S C ^S T ^S G ^S T ^S T ^S C ^S G ^S G ^S G ^S C ^S C ^S A ^S C ^S T
PbS-2	G ^S T ^S C ^S C ^S C ^S T ^S G ^S T ^S T ^S C ^S G ^S G ^S G ^S C ^S C ^S A ^S C ^S T ^S G ^S C ^S T ^S A ^S G ^S A ^S G ^S A ^S T
Gag-1	T ^S C ^S G ^S C ^S A ^S C ^S C ^S A ^S T ^S C ^S T ^S C ^S T ^S C ^S T ^S T
Gag-2	T ^S C ^S G ^S C ^S A ^S C ^S C ^S A ^S T ^S C ^S T ^S C ^S T ^S C ^S T ^S T ^S C ^S T ^S A ^S G ^S C ^S C ^S T ^S C ^S G
Контрольные олигонуклеотиды для эксперимента по изучению проникновения в клетки: Control oligonucleotides for cell penetration experiment:	
FAM-ON	[FAM]A ^S G ^S T ^S C ^S T ^S C ^S G ^S A ^S C ^S T ^S G ^S C ^S T ^S A ^S C ^S C
DON	T[Dcy][Dcy][Dcy]-GGTAGCAAGTCGAGA ^X C ^X T

Примечание: [Dcy] – ненуклеотидное додецил-содержащее звено; NH₂ – гексаметиленовый линкер; ^X – фосфорилгуанидиновая модификация; ^S – тиофосфатная модификация; FAM – остаток красителя 6-карбоксихлорофлуоресцеина. ** – за исключением III(OMe) – олигорибонуклеотида, содержащего 2'-Оме модификации на протяжении всего остова, обозначен курсивом
Note: [Dcy] – non-nucleotide dodecyl-containing unit; NH₂ – hexamethylene linker; ^X – phosphorylguanidine modification; ^S – phosphorothioate modification; FAM – 6-carboxyfluorescein dye residue. ** – III(OMe), an oligoribonucleotide containing 2'-OMe modifications throughout the backbone, is indicated in italics

Для соединений, показавших наилучшие показатели IC50, была определена 50% токсичная доза (TC50) методом МТТ-теста. Все исследованные ОН продемонстрировали низкую цитотоксичность (Таблица 3).

Известно, что тиофосфатные ОН могут самостоятельно проникать в отдельные типы клеток без использования дополнительных трансфицирующих агентов [10–14]. Мы провели исследование способности тиофосфатных ОН проникать внутрь клеток МТ-4 с

использованием контрольного неспецифического ОН **FAM-ON** (Таблица 1), содержащего на 5'-конце остаток флуоресцентного красителя. Было показано, что ОН **FAM-ON** эффективно проникает (Рисунок 2) и регистрируется внутри клеток МТ-4 (Рисунок 3). Затем проникновение ОН **FAM-ON** было исследовано также в дуплексе с частично комплементарным ему олигонуклеотидом-доставщиком (**DON**, Таблица 1), содержащим на 5'-конце три додецильных остатка

(Таблица 1). Анализ полученных изображений показал, что на оптических срезах, проходящих через ядро клетки и цитоплазму, распределение флуоресцентного сигнала от дуплекса **FAM-ON/DON** фиксируется не только в цитоплазме и ядре клетки, но и в ядрышке (Рисунок 5), что свидетельствует о высокой трансфе-

цирующей способности ОН, имеющих в своем составе додецильные остатки. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными о высокой эффективности проникновения додецил-содержащих олигонуклеотидов внутрь клеток [10].

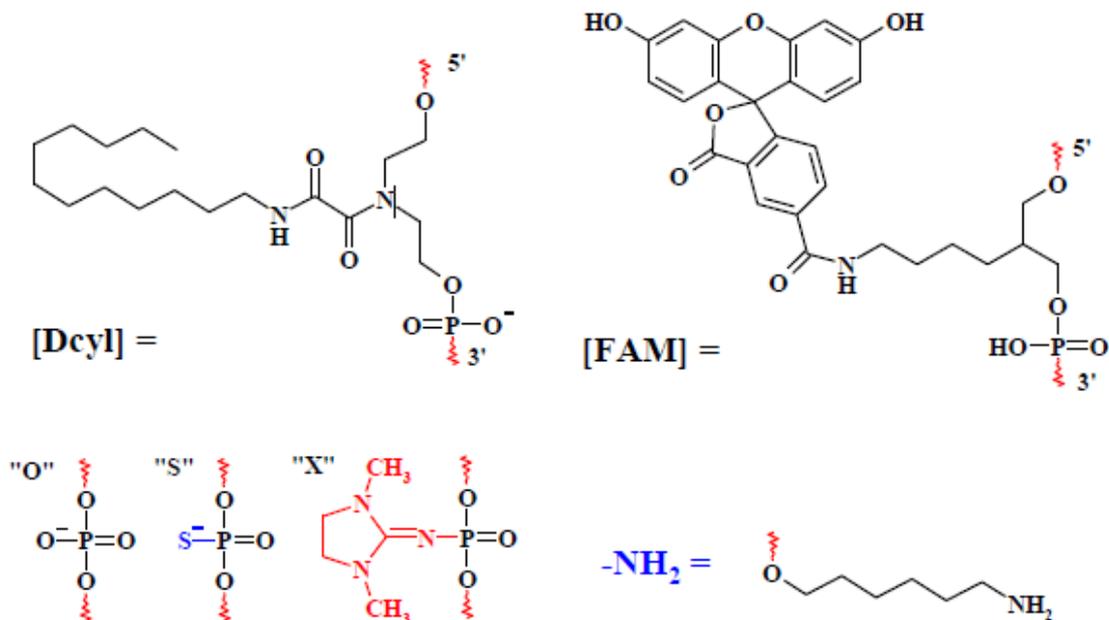


Рисунок 1. Структуры ненуклеотидных звеньев и межнуклеотидных фосфатных групп: [Dcyl] – додецил-содержащего звена, [FAM] – 6-карбоксифлуоресцеин-содержащего звена, "O" – структура фосфодиэфирной группы в остове олигонуклеотида, "S" – структура тиофосфатной группы в остове олигонуклеотида, "X" – структура фосфорилгуанидиновой группы в остове олигонуклеотида, -NH₂ – структура 3'-концевого гексаметиленового аминлинкера

Figure 1. Structures of non-nucleotide units and internucleotide phosphate groups: [Dcyl] – dodecyl-containing unit, [FAM] – 6-carboxyfluorescein-containing unit, "O" – structure of the phosphodiester group in the backbone of the oligonucleotide, "S" – structure of the phosphorothioate group in the backbone of the oligonucleotide, "X" – structure of the phosphoroguanidine group in oligonucleotide backbone, -NH₂ – structure of the 3'-terminal hexamethylene amino linker

Таблица 2. Данные по оценке противовирусной активности олигонуклеотидов на клетках человека MT-4, инфицированных ВИЧ-1

Table 2. Data on the assessment of the antiviral activity of oligonucleotides on human MT-4 cells infected with HIV-1

Обозначение олигонуклеотида Oligonucleotide designation	IC50, мкМ IC50, μM
I*	5,30 ± 0,11
II*	5,60 ± 0,15
III*	2,20 ± 0,11
III(O)*	1,90 ± 0,04
III(X)*	7,10 ± 0,20
III(XOX)*	7,80 ± 0,16
III(S)*	0,09 ± 0,01
III(OME)*	4,00 ± 0,12
R	0,29 ± 0,01
RS	0,10 ± 0,04
PbS-1	0,45 ± 0,05
PbS-2	0,09 ± 0,01
Gag-1	0,15 ± 0,02
Gag-2	0,04 ± 0,01

Примечание: * – данные олигонуклеотиды доставляли в клетки в дуплексах с соответствующими им комплементарными додецил-содержащими олигонуклеотидами

Note: * – these oligonucleotides were delivered into cells in duplexes with their corresponding complementary dodecyl-containing oligonucleotides

Таблица 3. Результаты исследования цитотоксического воздействия олигонуклеотидов на клетки МТ-4 через 5 суток после их добавления в культуральную среду

Table 3. Results of the study of cytotoxic effects of oligonucleotides on MT-4 cells 5 days after their addition to the culture medium

Обозначение олигонуклеотида Oligonucleotide designation	ТС50, мкМ IC50, μM
III(O)	$117 \pm 7,8$
III(S)	$78,5 \pm 5,5$
R	>90,0
RS	>90,0
PbS-1	
PbS-2	
Gag-1	>133,0
Gag-2	

Примечание: ТС50 – 50 % токсичная доза

Note: TC50 – 50 % toxic dose

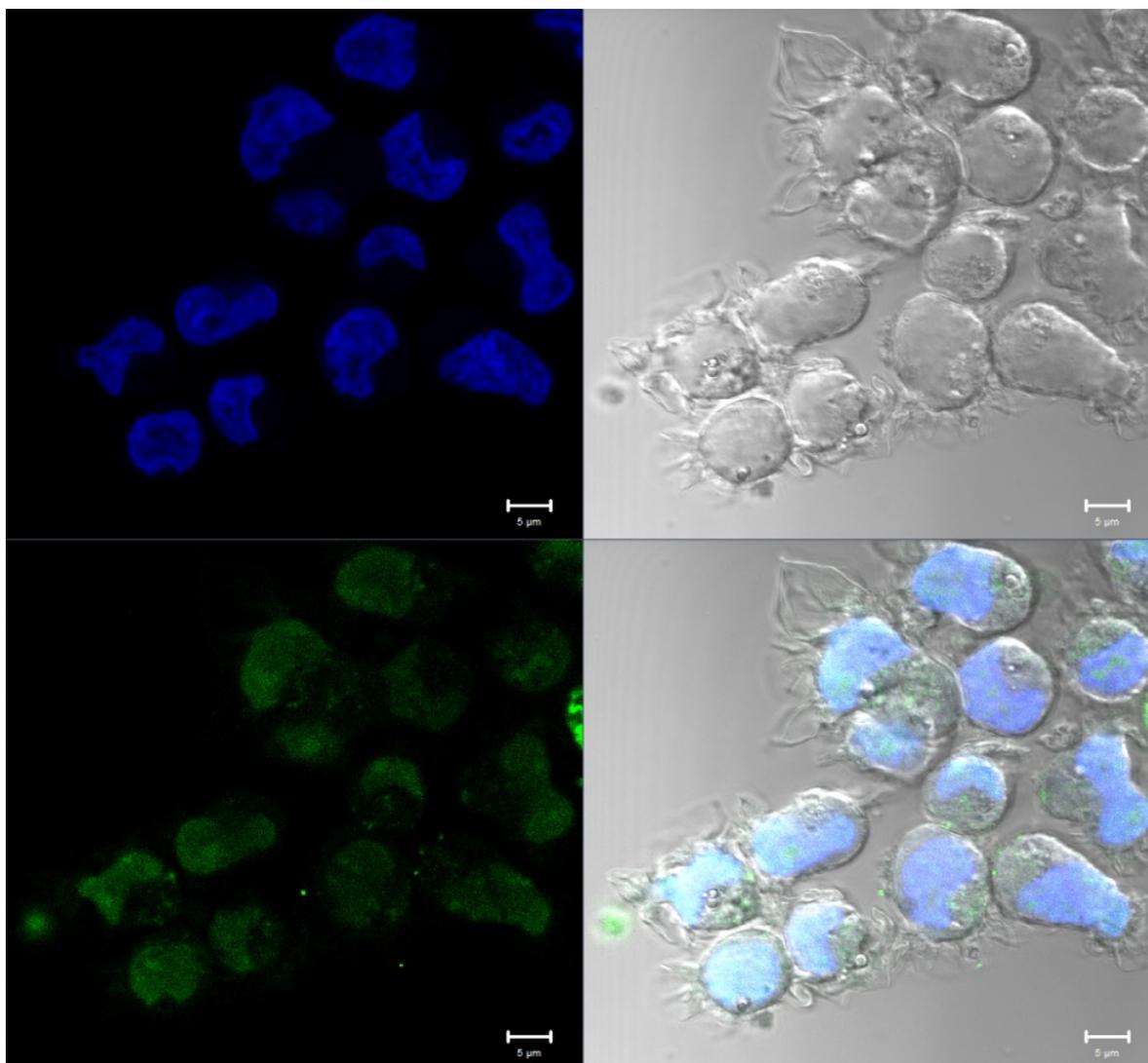


Рисунок 2. Изображение клеток МТ-4 после инкубации с **FAM-ON**, полученное методом конфокальной микроскопии. Изображение клеток получены: сверху слева – с использованием лазера с длиной волны 405 нм (синий – DAPI); сверху справа – в системе DIC контраста; внизу слева – с использованием лазера с длиной волны 488 нм (зелёный – **FAM-ON**); внизу справа – совмещение всех трёх каналов

Figure 2. Confocal microscopy image of MT-4 cells after incubation with **FAM-ON**. Images of cells were obtained: top left - using a 405 nm laser (blue – DAPI); top right - in the DIC contrast system; bottom left - using a 488 nm laser (green – **FAM-ON**); bottom right – combination of all three channels

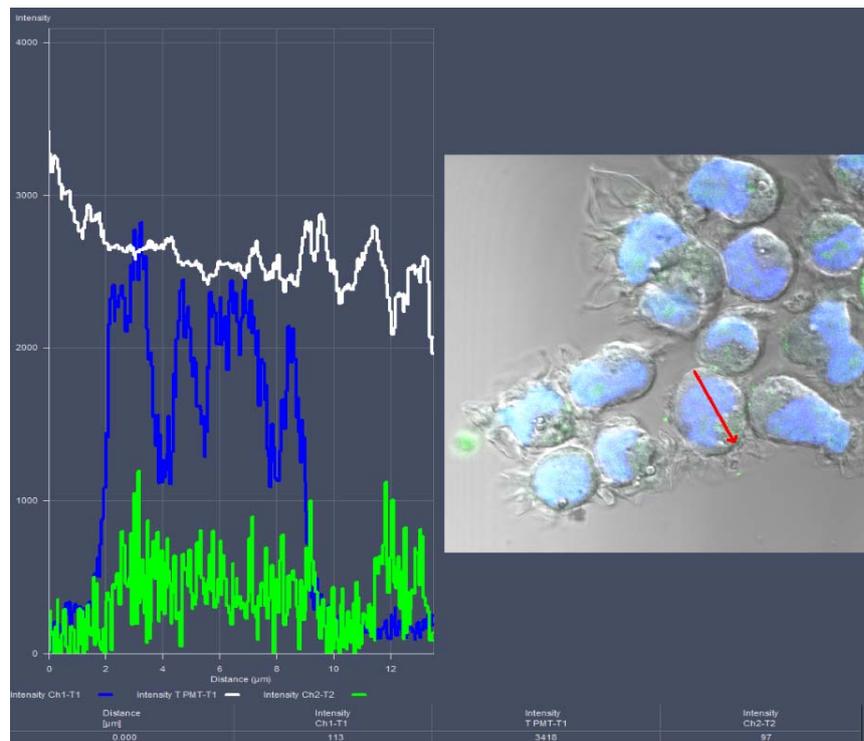


Рисунок 3. Профили сигналов интенсивности флуоресценции (синий – DAPI, ядро; зеленый – FAM) в клетках MT-4 после инкубации с **FAM-ON**
Figure 3. Signal fluorescence intensity profiles (blue – DAPI, nucleus; green – FAM) in MT-4 cells after incubation with **FAM-ON**

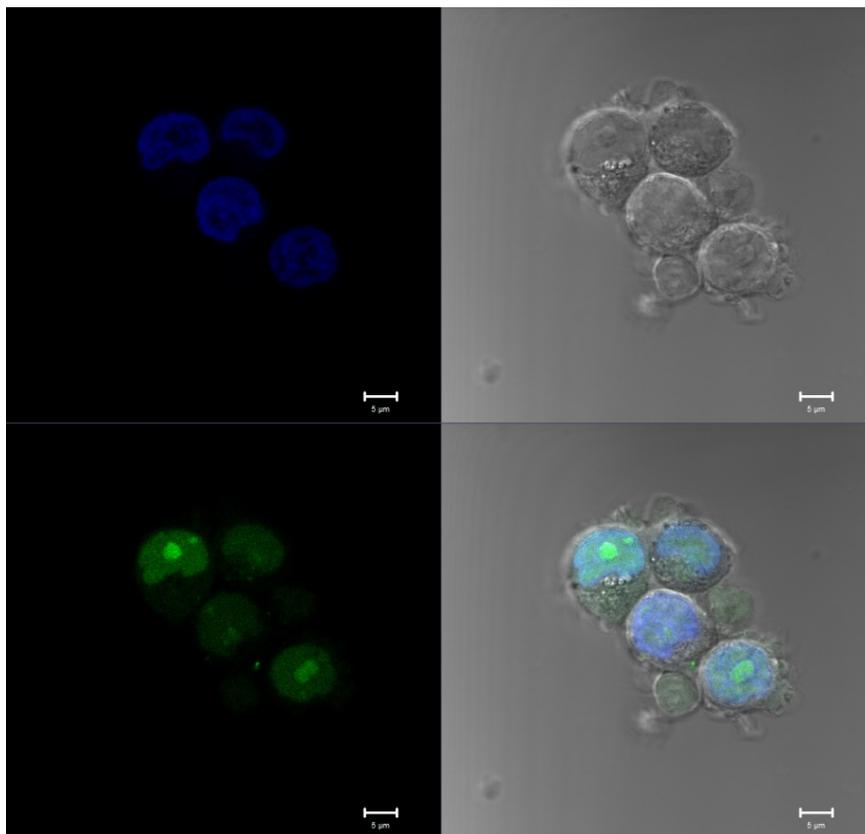


Рисунок 4. Изображение клеток MT-4 после инкубации с дуплексом **FAM-ON/DON**, полученное методом конфокальной микроскопии. Изображение клеток получены: сверху слева – с использованием лазера с длиной волны 405 нм (синий – DAPI); сверху справа – в системе DIC контраста; внизу слева – с использованием лазера с длиной волны 488 нм (зелёный – **FAM-ON/DON**); внизу справа – совмещение всех трёх каналов
Figure 4. Image of MT-4 cells after incubation with the **FAM-ON/DON** duplex obtained by confocal microscopy. Images of cells were obtained: top left – using a 405 nm laser (blue - DAPI); top right – in the DIC contrast system; bottom left – using a 488 nm laser (green – **FAM-ON/DON**); bottom right – combination of all three channels

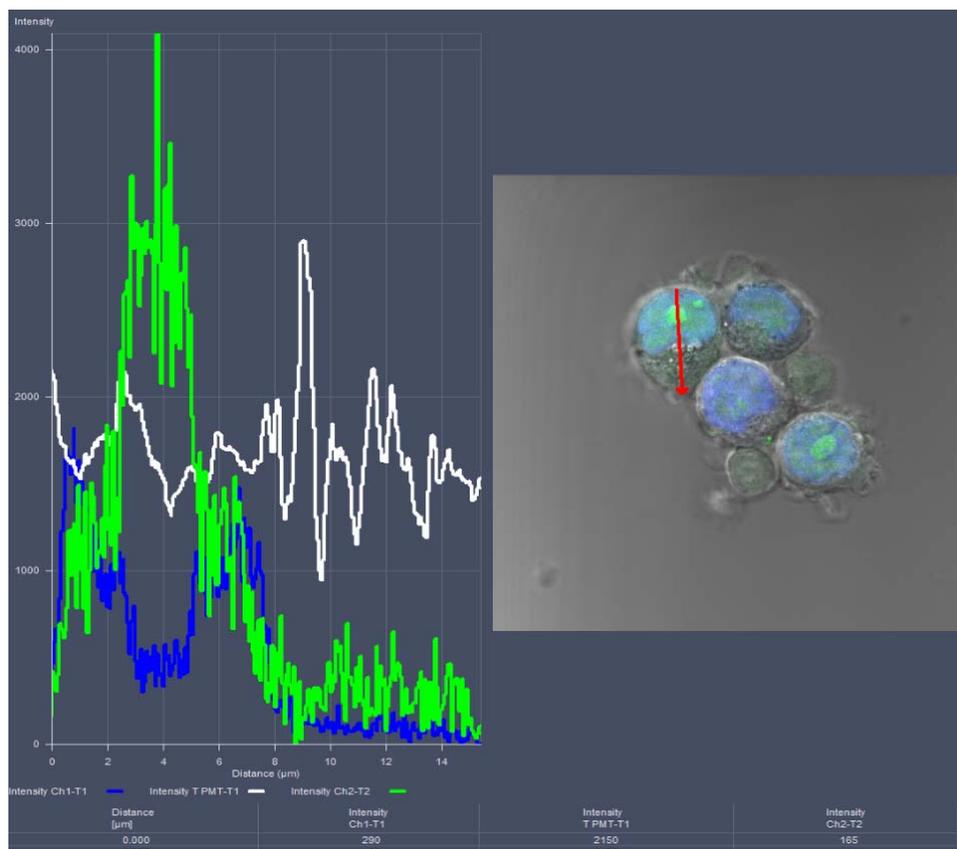


Рисунок 5. Профили сигналов интенсивности флуоресценции (синий – DAPI, ядро; зеленый – FAM) в клетках MT-4 после инкубации с дуплексом **FAM-ON/DON**
Figure 5. Signal fluorescence intensity profiles (blue – DAPI, nucleus; green – FAM) in MT-4 cells after incubation with the **FAM-ON/DON** duplex

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует отметить, что большинство исследований антиретровирусной активности выполняют на моделях [20–22], использующих молекулярные клоны ВИЧ и специализированные генетически модифицированные клеточные линии. В настоящей работе для оценки антиретровирусной эффективности ОН была использована максимально приближенная к реальному процессу инфекции модель культуры клеток человека MT-4, инфицированная высокопродуктивным штаммом ВИЧ российского геноварианта А6.

С помощью современных методов флуоресцентной микроскопии было показано, что введение тиофосфатных модификаций позволяет ОН проникать внутрь лимфоидных клеток человека MT-4 без использования дополнительных трансфецирующих агентов. При этом использование тиофосфатных модификаций и додецил-содержащих производных в одной транспортной конструкции (**FAM-ON/DON**) позволяет ОН проникать не только в ядро клетки, но и в ядрышко, что можно считать одним из основных преимуществ для дальнейшей разработки антиретровирусных конструкций на основе олигонуклеотидов. Показано, что олигонуклеотиды, содержащие тиофосфатные модификации, имеют антиретровирусную активность, при этом их противовирусный эффект сопоставим с эффектом ОН, имеющих в своем составе додецил-содержащие звенья (Таблица 2). Учитывая, что значимые процессы жизненного цикла ВИЧ проходят и в ядре клетки (процесс интеграции с хозяйской ДНК), полученные результаты свидетельствуют о высоком потенциале

использования данного подхода для разработки средств генной терапии и профилактики против ВИЧ-инфекции.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Исследование выполнено в рамках ГЗ 1/23 ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Авторы выражают благодарность Байбородину С.И., к.б.н., заведующему ЦКП ИЦиГ СО РАН, за получение изображений клеток методом конфокальной микроскопии.

ACKNOWLEDGEMENT

State Assignment no. 1/23 (FBRI SRC VB “Vector” Rospotrebnadzor) supported this research. The authors gratefully acknowledge the contribution of S.I. Baiborodin, Centre for Collective Use of Microscopic Analysis of Biological Objects (Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia) in obtaining images of cells by confocal microscopy.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Ожмегова Е.Н., Бобкова М.Р. Лекарственная устойчивость ВИЧ: прежние и современные тенденции // Вопросы вирусологии. 2022. Т. 67. N 3. С. 193–205. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-113>
- Xun J. et al. Editing out HIV: application of gene editing technology to achieve functional cure // Retrovirology. 2021. V. 18. N 1. P. 39. <https://doi.org/10.1186/s12977-021-00581-1>

3. Del Corpo O. et al. A U1i RNA that enhances HIV-1 RNA splicing with an elongated recognition domain is an optimal candidate for combination HIV-1 gene therapy // *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2019. V. 18. P. 815–830. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.10.011>
4. Virgilio A. et al. Novel monomolecular derivatives of the anti-HIV-1 G-quadruplex-forming Hotoda's aptamer containing inversion of polarity sites // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020. V. 208. Article id: 112786. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112786>
5. Cena-Diez R. et al. Novel naturally occurring dipeptides and single-stranded oligonucleotide act as entry inhibitors and exhibit a strong synergistic anti-HIV-1 profile // *Infectious Diseases and Therapy*. 2022. V. 11. N 3. P. 1103–1116. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00626-8>
6. Torbett B., Goodsell D., Richman D. Targeting the HIV RNA Genome: High-Hanging Fruit Only Needs a Longer Ladder // *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2015. V. 389. P. 147–169. https://doi.org/10.1007/82_2015_434
7. Virgilio A. et al. Novel monomolecular derivatives of the anti-HIV-1 G-quadruplex-forming Hotoda's aptamer containing inversion of polarity sites // *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2020. V. 208. Article id: 112786. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112786>
8. Пашков Е.А., Пак А.В., Пашков Е.П., Быков А.С., Буданова Е.В., Поддубиков А.В., Свитич О.А., Зверев В.В. Перспектива применения препаратов на основе явления РНК-интерференции против ВИЧ-инфекции // *Вопросы вирусологии*. 2022. Т. 67. N 4. С. 278–289. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-124>
9. Lj R. A simple method of estimating fifty per cent endpoints // *Am J Hyg*. 1938. V. 27. P. 493–495. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
10. Markov O.V. et al. Transport Oligonucleotides—A Novel System for Intracellular Delivery of Antisense Therapeutics // *Molecules*. 2020. V. 25. N 16. Article id: 3663. <https://doi.org/10.3390/molecules25163663>
11. Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A. Phosphoryl guanidines: a new type of nucleic acid analogues // *Acta Naturae*. 2014. V. 6. N 4 (23). P. 116–118. <https://doi.org/10.32607/20758251-2014-6-4-116-118>
12. Lomzov A.A. et al. Diastereomers of a mono-substituted phosphoryl guanidine triphosphate: isolation and properties // *Biochemical and biophysical research communications*. 2019. V. 513. N 4. P. 807–811. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.024>
13. Crooke S.T. et al. The interaction of phosphorothioate-containing RNA targeted drugs with proteins is a critical determinant of the therapeutic effects of these agents // *Journal of the American Chemical Society*. 2020. V. 142. N 35. P. 14754–14771. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c04928>
14. Crooke S.T., Vickers T.A., Liang X. Phosphorothioate modified oligonucleotide–protein interactions // *Nucleic acids research*. 2020. V. 48. N 10. P. 5235–5253. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa299>
15. Juliano R.L. The delivery of therapeutic oligonucleotides // *Nucleic acids research*. 2016. V. 44. N 14. P. 6518–6548. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw236>
16. Graham M.J. et al. In vivo distribution and metabolism of a phosphorothioate oligonucleotide within rat liver after intravenous administration // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1998. V. 286. N 1. P. 447–458.
17. Crooke S.T. et al. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides // *Nature biotechnology*. 2017. V. 35. N 3. P. 230–237. <https://doi.org/10.1038/nbt.3779>
18. Iversen P.L. et al. Cellular uptake and subcellular distribution of phosphorothioate oligonucleotides into cultured cells // *Antisense research and development*. 1992. V. 2. N 3. P. 211–222.
19. Lorenz P. et al. Nucleocytoplasmic shuttling: a novel in vivo property of antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides // *Nucleic Acids Research*. 2000. V. 28. N 2. P. 582–592. <https://doi.org/10.1093/nar/28.2.582>
20. Turner J.J., Arzumanov A.A., Gait M.J. Synthesis, cellular uptake and HIV-1 Tat-dependent trans-activation inhibition activity of oligonucleotide analogues disulphide-conjugated to cell-penetrating peptides // *Nucleic acids research*. 2005. V. 33. N 1. P. 27–42. <https://doi.org/10.1093/nar/gki142>
21. Takahashi M. et al. Dual mechanisms of action of self-delivering, anti-HIV-1 FANA oligonucleotides as a potential new approach to HIV therapy // *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2019. V. 17. P. 615–625. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.07.001>
22. Zhou J., Satheesan S., Li H., Weinberg M.S., Morris K.V., Burnett J.C., Rossi J.J. Cell-Specific RNA Aptamer against Human CCR5 Specifically Targets HIV-1 Susceptible Cells and Inhibits HIV-1 Infectivity // *Chemistry & Biology*. 2015. V. 22. N 3. P. 379–390. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.01.005>

REFERENCES

1. Ozhmegova E.N. et al. HIV drug resistance: past and current trends. *Problems of Virology*, 2022, vol. 67, no. 3, pp. 193–205. (In Russian) <https://doi.org/10.36233/0507-4088-113>
2. Xun J. et al. Editing out HIV: application of gene editing technology to achieve functional cure. *Retrovirology*, 2021, vol. 18, no. 1, pp. 39. <https://doi.org/10.1186/s12977-021-00581-1>
3. Del Corpo O. et al. A U1i RNA that enhances HIV-1 RNA splicing with an elongated recognition domain is an optimal candidate for combination HIV-1 gene therapy. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2019, vol. 18, pp. 815–830. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.10.011>
4. Virgilio A. et al. Novel monomolecular derivatives of the anti-HIV-1 G-quadruplex-forming Hotoda's aptamer containing inversion of polarity sites. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, vol. 208, article id: 112786. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112786>
5. Cena-Diez R. et al. Novel naturally occurring dipeptides and single-stranded oligonucleotide act as entry inhibitors and exhibit a strong synergistic anti-HIV-1 profile. *Infectious Diseases and Therapy*, 2022, vol. 11, no. 3, pp. 1103–1116. <https://doi.org/10.1007/s40121-022-00626-8>
6. Torbett B., Goodsell D., Richman D. Targeting the HIV RNA Genome: High-Hanging Fruit Only Needs a Longer Ladder. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 389, pp. 147–169. https://doi.org/10.1007/82_2015_434
7. Virgilio A. et al. Novel monomolecular derivatives of the anti-HIV-1 G-quadruplex-forming Hotoda's aptamer containing inversion of polarity sites. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, vol. 208, article id: 112786. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112786>
8. Pashkov E.A., Pak A.V., Pashkov E.P., Bykov A.S., Budanova E.V., Poddubikov A.V., Svitich O.A., Zverev V.V. Perspektiva primeneniya preparatov na osnove yavleniya RNK-interferentsii protiv HIV-infektsii. *Voprosy virusologii*, 2022, vol. 67, no. 4, pp. 278–289. (In Russian) <https://doi.org/10.36233/0507-4088-124>

9. Lj R. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg*, 1938, vol. 27, pp. 493–495. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
10. Markov O.V. et al. Transport Oligonucleotides—A Novel System for Intracellular Delivery of Antisense Therapeutics. *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 16, article id: 3663. <https://doi.org/10.3390/molecules25163663>
11. Kupryushkin M.S., Pyshnyi D.V., Stetsenko D.A. Phosphoryl guanidines: a new type of nucleic acid analogues. *Acta Naturae*, 2014, vol. 6, no. 4 (23), pp. 116–118. <https://doi.org/10.32607/20758251-2014-6-4-116-118>
12. Lomzov A.A. et al. Diastereomers of a mono-substituted phosphoryl guanidine trideoxyribonucleotide: isolation and properties. *Biochemical and biophysical research communications*, 2019, vol. 513, no. 4, pp. 807–811. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.024>
13. Crooke S.T. et al. The interaction of phosphorothioate-containing RNA targeted drugs with proteins is a critical determinant of the therapeutic effects of these agents. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, vol. 142, no. 35, pp. 14754–14771. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c04928>
14. Crooke S.T., Vickers T.A., Liang X. Phosphorothioate modified oligonucleotide–protein interactions. *Nucleic acids research*, 2020, vol. 48, no. 10, pp. 5235–5253. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa299>
15. Juliano R.L. The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic acids research*, 2016, vol. 44, no. 14, pp. 6518–6548. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw236>
16. Graham M.J. et al. In vivo distribution and metabolism of a phosphorothioate oligonucleotide within rat liver after intravenous administration. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1998, vol. 286, no. 1, pp. 447–458.
17. Crooke S.T. et al. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides. *Nature biotechnology*, 2017, vol. 35, no. 3, pp. 230–237. <https://doi.org/10.1038/nbt.3779>
18. Iversen P.L. et al. Cellular uptake and subcellular distribution of phosphorothioate oligonucleotides into cultured cells. *Antisense research and development*, 1992, vol. 2, no. 3, pp. 211–222.
19. Lorenz P. et al. Nucleocytoplasmic shuttling: a novel in vivo property of antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Research*, 2000, vol. 28, no. 2, pp. 582–592. <https://doi.org/10.1093/nar/28.2.582>
20. Turner J.J., Arzumanov A.A., Gait M.J. Synthesis, cellular uptake and HIV-1 Tat-dependent trans-activation inhibition activity of oligonucleotide analogues disulphide-conjugated to cell-penetrating peptides. *Nucleic acids research*, 2005, vol. 33, no. 1, pp. 27–42. <https://doi.org/10.1093/nar/gki142>
21. Takahashi M. et al. Dual mechanisms of action of self-delivering, anti-HIV-1 FANA oligonucleotides as a potential new approach to HIV therapy. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2019, vol. 17, pp. 615–625. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.07.001>
22. Zhou J., Satheesan S., Li H., Weinberg M.S., Morris K.V., Burnett J.C., Rossi J.J. Cell-Specific RNA Aptamer against Human CCR5 Specifically Targets HIV-1 Susceptible Cells and Inhibits HIV-1 Infectivity. *Chemistry & Biology*, 2015, vol. 22, no. 3, pp. 379–390. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.01.005>

КРИТЕРИИ АВТОРСТВА

Наталья М. Гашникова и Инна А. Пышная сформировали концепцию и методологию исследования. Максим С. Купрюшкин синтезировал олигонуклеотиды и их производные. Анна С. Павлова и Максим С. Купрюшкин выделили, очистили и проанализировали олигонуклеотиды и их производные. Людмила Г. Готфрид провела эксперименты на клетках. Людмила Г. Готфрид, Анна С. Павлова и Максим С. Купрюшкин написали текст статьи. Наталья М. Гашникова и Инна А. Пышная редактировали текст статьи. Наталья М. Гашникова руководила исследованием и средствами финансирования. Все авторы в равной степени несут ответственность при обнаружении плагиата, самоплагиата и других неэтических проблем.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Natalya M. Gashnikova and Inna A. Pyshnaya conceived the study and its methodology. Maxim S. Kupryushkin undertook oligonucleotides synthesis. Anna S. Pavlova and Maxim S. Kupryushkin carried out oligonucleotides post-synthetic isolation, purification and analysis. Ludmila G. Gotfrid undertook cell culture investigations. Ludmila G. Gotfrid, Anna S. Pavlova and Maxim S. Kupryushkin participated in the writing of the manuscript. Natalya M. Gashnikova and Inna A. Pyshnaya edited the text of the manuscript. Natalya M. Gashnikova was responsible for supervision and funding acquisition. All authors are equally responsible for plagiarism, self-plagiarism and other ethical transgressions.

NO CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

The authors declare no conflict of interest

ORCID

Людмила Г. Готфрид / Ludmila G. Gotfrid <https://orcid.org/0000-0001-5896-8231>
 Анна С. Павлова / Anna S. Pavlova <https://orcid.org/0000-0001-7889-6319>
 Максим С. Купрюшкин / Maxim S. Kupryushkin <https://orcid.org/0000-0002-2300-7809>
 Инна А. Пышная / Inna A. Pyshnaya <https://orcid.org/0000-0002-7559-2376>
 Наталья М. Гашникова / Natalya M. Gashnikova <https://orcid.org/0000-0002-0891-0880>